

EFFECTES DEL PÈPTID ANTIMICROBIÀ PROTEGRINA 1 (PG1) SOBRE LA VIABILITAT I LA CÀRREGA BACTERIANA DE SEMEN DE PORCÍ

Eva Bussalleu^{1*}, Sílvia Sancho¹, M. Dolors Briz¹, Marc Yeste¹, Sergi Bonet¹

¹Bioteconologia de la Reproducció Animal i Humana (TechnoSperm), Departament de Biologia, Institut de Tecnologia Agroalimentària, Universitat de Girona, 17003 Girona, Catalunya.

eva.bussalleu@udg.edu; silvia.sancho@udg.edu; mailo.briz@udg.edu; marc.yeste@udg.edu; sergi.bonet@udg.edu

Resum

La presència de bacteris afecta negativament la qualitat espermàtica de porcí. Una manera de controlar-la és la utilització d'antibiòtics en la formulació dels diluents, però s'han descrit moltes resistències microbianes a aquests antibiòtics. Actualment es busquen alternatives a l'ús d'antibiòtics, i una de les més prometedores són els pèptids antimicrobians. En aquest estudi es van avaluar els efectes del pèptid antimicrobià protegrina 1 (PG1) sobre la viabilitat espermàtica i sobre la càrrega bacteriana de dosis seminals de porcí. Es van assajar tres concentracions diferents de PG1 (2.5 µg/ml; 25 µg/ml i 100 µg/ml). Els resultats obtinguts mostraren que la PG1 és eficient per controlar la càrrega bacteriana a totes les concentracions provades, per bé que afecten de manera significativa la viabilitat espermàtica, essent els efectes més notoris a les concentracions més altes del pèptid antimicrobià. Tot i aquests resultats, no es pot descartar l'ús de la PG1 com a alternativa als antibiòtics, ja que calen més estudis utilitzant aquest pèptid en la seva forma truncada.

Paraules clau: pèptids antimicrobians, protegrina 1, viabilitat espermàtica, càrrega bacteriana, semen porcí.

Abstract

The presence of bacteria adversely affects boar sperm quality. The most common measure to control is the use of antibiotics in the formulation of semen extender; however, a great microbial resistance to these antibiotics has been described. One of the most promising alternative to antibiotics are the antimicrobial peptides. In this study, the effects of the antimicrobial peptide protegrin 1 (PG1) on the sperm viability and on the bacterial load of boar semen doses were evaluated. Three different concentrations of PG1 were tested (2.5 µg/mL, 25 µg/ml and 100 µg/ml). The results showed that PG1 is effective in controlling the bacterial load in all the assessed concentrations, although it significantly affects the sperm viability, being the most evident effects at the higher concentrations of the antimicrobial peptide. Despite these results, the use of PG1 as an alternative to antibiotics can not be totally discarded, as further studies using the truncated form of this peptide are needed.

Key words: antimicrobial peptides, protegrin 1, sperm viability, bacterial load, boar semen.

INTRODUCCIÓ

La presència de microorganismes en el semen de porcí es coneix com bacteriospermia, i actualment és un dels principals problemes existents en la indústria porcina i en els centres d'inseminació artificial (Bussalleu i Torner, 2013). Els efectes adversos de la bacteriospermia no només poden causar una mala qualitat del semen, sinó que també poden incloure la infertilitat (temporal) i la reducció de la producció d'esperma en els mascles, així com afectar la capacitat fecundant dels espermatozoides (i conseqüentment un menor rendiment reproductiu en les granges), endometritis, a més a més de poder provocar diverses malalties en les femelles receptores. Per controlar la bacteriospermia hi ha diverses op-

cions que poden ser eficaces. El primer mètode per minimitzar la contaminació bacteriana del semen diluït es troba en l'àmbit de la higiene individual i general (Kuster i Althouse, 2016). La segona opció, i la més utilitzada per tal de controlar la bacteriospermia, és la selecció d'antibiòtics amb un ampli espectre bactericida, que s'inclouen en la formulació dels diluents (Althouse *et al.*, 2000; Bussalleu i Torner, 2013).

No obstant això, alguns estudis han demostrat que més del 90% dels bacteris aïllats de dosis seminals són resistents als antibiòtics comuns (Bolarin, 2011; Schulze *et al.*, 2014).

En aquest escenari que mostra una augment dramàtic de la resistència als antibiòtics, urgeix trobar alternatives als antibiòtics convencionals.

En les últimes dècades s'ha fet un gran esforç en la producció de nous agents antimicrobians, com ara els anomenats pèptids antimicrobians (AMP) (Hancock i Patrzykat, 2002; Peters *et al.*, 2010; Schulze *et al.*, 2014). La majoria d'aquests pèptids s'han obtingut de diverses fonts com poden ser els neutròfils, leucòcits o cèl·lules epitelials (Peters *et al.*, 2010). Els pèptids antimicrobians poden eliminar amb èxit els bacteris Gram-negatius i Gram-positius, fongs, virus i fins i tot les cèl·lules de càncer *in vitro*. Tot i així, l'activitat dels pèptids antimicrobians pot resultar tòxica per a les cèl·lules sanes de l'hoste i, per tant, abans de la seva aplicació, és important determinar si l'AMP en qüestió té algun efecte citotòxic sobre les cèl·lules eucariotes (Hancock i Patrzykat, 2002; Schulze *et al.*, 2014).

També se sap que cada AMP interacciona de manera específica i diferencial amb la membrana plasmàtica de les cèl·lules eucariotes, observant-se efectes molt diversos sobre la qualitat espermàtica de porcí depenent de cada AMP (Schulze *et al.*, 2014).

La Protegrina 1 (PG1) és l'AMP estudiat en aquest treball; és un pèptid que pertany a la família de les catelicidines, format per 18 aminoàcids i que presenta una amida modificada a l'extrem C terminal. La PG1 té un ampli espectre d'activitat i és capaç d'inactivar nombrosos bacteris Gram-negatius i Gram-positius, fongs i alguns virus.

Així doncs, segons l'exposat anteriorment, els objectius d'aquest treball foren analitzar l'efecte d'un AMP, la PG1, sobre la viabilitat espermàtica de dosis seminals de porcí per conèixer si aquest pèptid antimicrobià té algun efecte citotòxic sobre els espermatozoides de porcí. Alhora, es va determinar l'efectivitat de la PG1 en el control del creixement bacterià de dosis seminals de porcí, per tal de conèixer si aquest pèptid pot ser usat com a substitut dels antibiòtics en el semen diluït i conservat en fresc, mimetitzant les condicions normals d'emmagatzematge del semen de porcí a 15-17°C.

MATERIAL I MÈTODES

El disseny experimental es mostra a la Figura 1. Pel que fa a l'anàlisi estadística dels resultats, i per tal de comparar els resultats obtinguts entre els diferents tractaments i els controls, així com per avaluar l'efecte del temps de durada dels tractaments, es va utilitzar el paquet estadístic IBM SPSS per a Windows (Versió 23; Chicago, IL, EUA). Inicialment, es va determinar si es complien les hipòtesis de normalitat i d'homogeneïtat de variàncies amb els testos Shapiro-Wilk i Levene, respectivament. Les dades a estudiar no seguien les hipòtesis de normalitat i homogeneïtat necessàries; per tant, es va aplicar estadística no paramètrica mitjançant el test de Friedman, seguit del de Wilcoxon. El nivell de significació es va establir en $P \leq 0.05$.

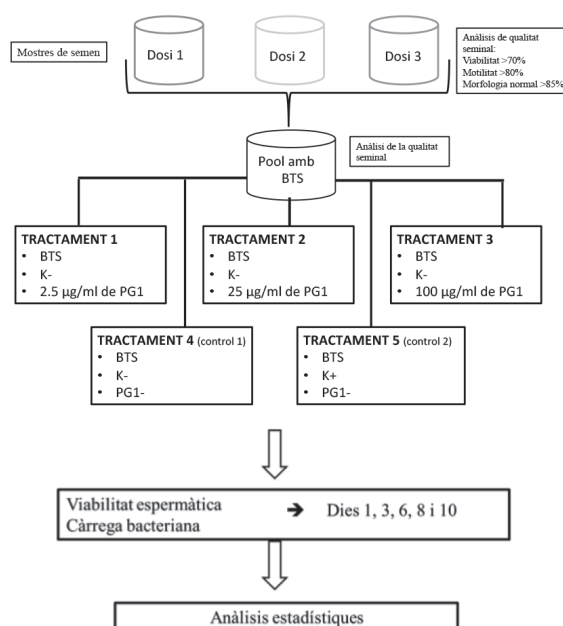


Figura 1. Disseny experimental seguit en aquest estudi. (BTS: Beltsville Thawing Solution; K: kanamicina; PG1: protegrina 1).

RESULTATS

L'evolució del creixement bacterià al llarg dels 10 dies d'estudi, es mostra a la Figura 2.

Dins de cada tractament, quan el dia 0 (4×10^2 ufc·mL⁻¹) era comparat amb el dia 10, es van observar diferències significatives en tots els tractaments amb PG1 (T1, T2 i T3), així com en els grups control (T4 i T5), essent la càrrega bacteriana final de 6.6×10^1 ufc·mL⁻¹ a T1; 0 ufc·mL⁻¹ a T2; 1×10^1 a T3; 2.6×10^2 ufc·mL⁻¹ a T4 i 1×10^3 ufc·mL⁻¹ a T5 ($P < 0.05$). Quan els tractaments foren comparats entre ells, sí que es van observar diferències significatives en els dies 1, 3, 8 i 10 entre els controls (T4 i T5) i els tractaments T1, T2 i T3 ($P < 0.05$).

A l'inici de l'estudi, el percentatge d'espermatozoides viables era del 86% en tots els casos (Fig.3). Al llarg de l'experiment, es va observar una davallada del percentatge d'espermatozoides viables en tots els temps dins de cada un dels tractaments, essent el dia 10 del $36\% \pm 5.51$ en el T1, $27\% \pm 1.41$ en el T2, $17\% \pm 0.00$ en T3, $66.67\% \pm 2.08$ en el T4 i $68.50\% \pm 0.71$ en el T5 respectivament ($P < 0.05$; en tots els casos) de manera que els valors de viabilitat eren superiors en els tractaments control (T4 i T5).

Quan es van comparar els tractaments entre ells, es van observar diferències significatives entre T1 i T2 en els dies 1 i 6 de l'experiment (T1, dia 1: $71\% \pm 4.58$ i dia 6: $44.33\% \pm 1.15$; T2, dia 1: $56\% \pm 3$ dia 6: $34\% \pm 1.73$; $P < 0.05$).

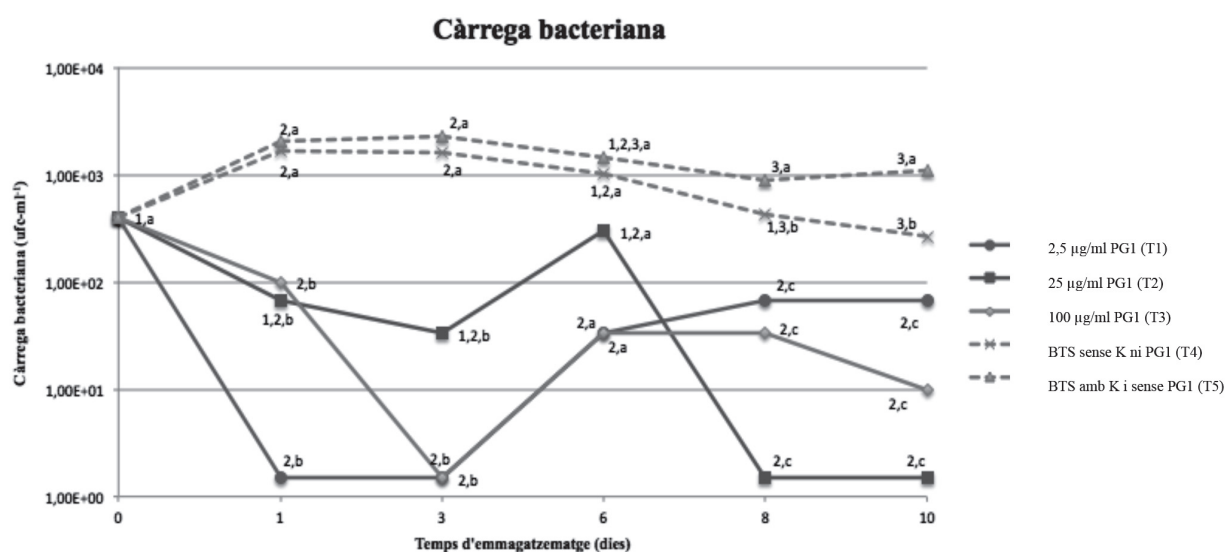


Figura 2. Càrrega bacteriana (ufc x ml⁻¹) després de 10 dies d'emmagatzematge a 17°C. Diferents lletres (a, b, c) mostren diferències significatives ($P < 0.05$) entre tractaments, mentre que diferents números (1, 2, 3) mostren diferències significatives ($P < 0.05$) dins d'un mateix tractament.

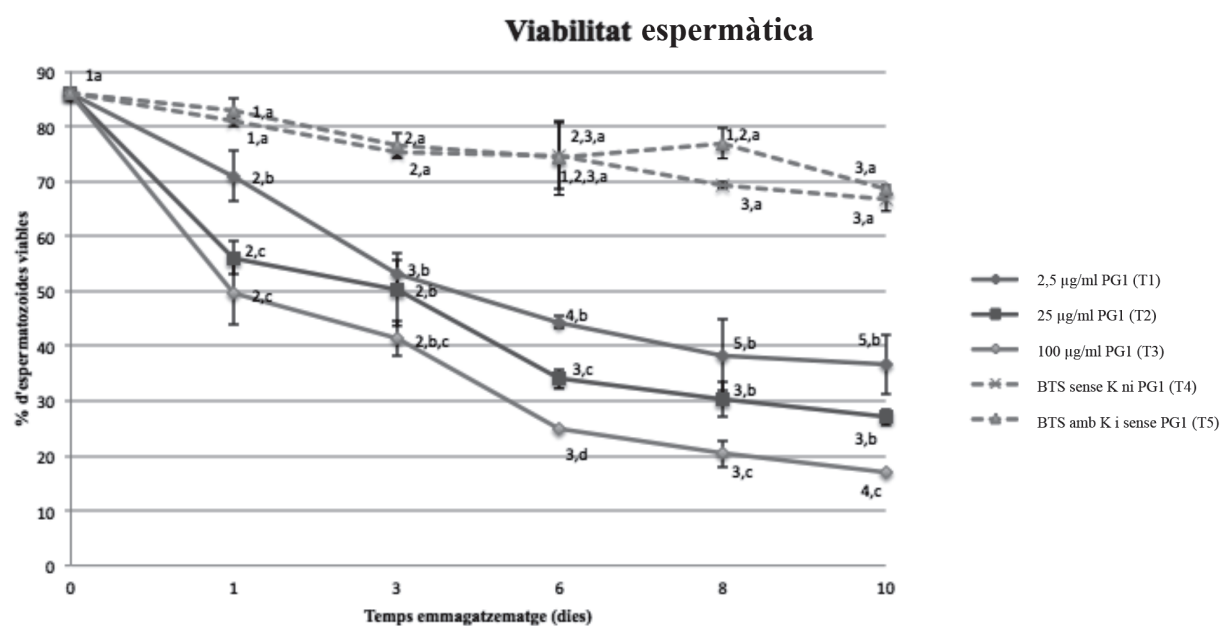


Figura 3. Percentatge d'espermatozoides viables (mitjana±SEM) després de 10 dies d'emmagatzematge a 17°C. Diferents lletres (a, b, c, d) mostren diferències significatives ($P < 0.05$) entre tractaments, mentre que diferents números (1, 2, 3, 4, 5) mostren diferències significatives ($P < 0.05$) dins d'un mateix tractament.

DISCUSSIÓ

L'estudi dut a terme va mostrar que la presència de PG1, a qualsevol de les concentracions estudiades, va ser

efectiva per controlar el creixement bacterià, mostrant millors resultats que els diluents que contenen kanamicina o que no contenen cap tipus de substància antimicrobiana. Tot i que hi ha diversos mecanismes d'acció

pels quals els AMPs actuen contra els microorganismes, sembla ser que, de manera general, els pèptids antimicrobians actuen ràpidament reduint el nombre de cèl·lules viables durant els primers minuts d'interacció (Hancock i Patrzykat, 2002). Es tracta d'un procés específic que es basa en la composició diferencial de les membranes dels bacteris i dels eucariotes. En els primers, es troba un major contingut de fosfolípids aniònics a la cara extracitoplasmàtica de la membrana plasmàtica respecte a la dels eucariotes, on aquests fosfolípids es troben majoritàriament a la cara citoplasmàtica de la membrana, fent-los inaccessible al pèptid (Zasloff, 2002). A més a més, la presència de colesterol en les membranes de les cèl·lules eucariotes animals, actua com a reductor del potencial citotòxic dels AMPs (Hancock i Patrzykat, 2002; Giuliani *et al.*, 2007).

La viabilitat espermàtica al final de l'experiment va ser millor en els dos grups control que en els tractaments que contenien el pèptid antimicrobià. Cal esmentar, però, que la concentració més baixa de PG1 (2.5 µg/ml; T1), va mostrar millors resultats respecte a la viabilitat final dels espermatozoides que la concentració mitjana (25 µg/ml; T2) o la concentració més elevada (100 µg/ml; T3). Altres estudis ja descriuen que alguns AMPs poden tenir varis efectes citotòxics sobre els espermatozoides, dependents del temps i la concentració i que, per tant, poden provocar efectes espermicides i espermiostàtics (Schulze *et al.*, 2016). La citotoxicitat de la PG1 sobre els espermatozoides de porcí es podria explicar pel fet que, tot i tractar-se de cèl·lules eucariotes, aquestes presenten un contingut més baix en colesterol en les seves membranes plasmàtiques respecte als espermatozoides d'altres espècies de mamífers, cosa que afavoriria la seva interacció amb el pèptid PG1, afectant-ne la seva motilitat i viabilitat (Cross, 1998). S'ha proposat que l'efecte lític dels AMPs prové de la seva habilitat per induir canvis estructurals en la membrana, resultant en la formació de porus. Aquests porus resultants podrien ser una estructura similar a la que es forma en els models d'acció proposats pels AMPs, els models de barril o toroïdal (Lam *et al.*, 2012).

El model de barril consisteix en la inserció perpendicular i l'agregació d'un nombre relativament petit de pèptids dins de la membrana que indueixen la formació d'un porus transmembrana o canal amb una estructura cilíndrica (Hancock i Patrzykat, 2002; Giuliani *et al.*, 2007). El pas inicial en la formació del porus, en aquest model de barril, consisteix en la unió del pèptid a la superfície de la membrana, gràcies a interaccions electrostàtiques que faciliten aquest procés (Giuliani *et al.*, 2007). Quan el pèptid unit arriba a un llinar de concentració, s'insereix més profundament en el nucli hidrofòb de la membrana. Es creu que els canals formats per aquest procés provoquen una fuga de material cel·lular

i, per tant, la mort cel·lular (Hancock i Patrzykat, 2002; Giuliani *et al.*, 2007). Els porus que es formen són una estructura dinàmica que varia la seva mida en funció del reclutament o pèrdua de la quantitat de pèptid. No obstant això, cal dir que encara hi ha relativament pocs pèptids pels quals hi ha evidència convincent del model de barril (Hancock i Patrzykat, 2002).

Els estudis més recents (Lam *et al.*, 2012) donen major suport al model de porus toroïdal (Yang *et al.*, 2001), tot i que es tracta de models predictius que encara no han estat demostrats (Giuliani *et al.*, 2007). Aquest model és una extensió de l'anterior, en el qual els porus estan revestits per pèptids i lípids. La presència de fosfolípids carregats negativament en el revestiment del porus, redueix les interaccions de repulsió a causa de l'alta densitat de càrregues positives del pèptid i fan que l'estructura sigui molt més estable (Giuliani *et al.*, 2007).

La formació de porus induïts per PG1 en la bicapa lipídica de la membrana d'eucariotes s'ha observat directament utilitzant un microscopi de forces atòmiques, suggerint que el model toroïdal és el més probable per a l'acció de PG1. Així, a mida que augmenta la concentració de PG-1, va provocant primerament una inestabilitat a les vores de la bicapa, seguida de la formació d'un porus al centre per acabar amb la formació d'estructures en forma de cuc (Lam *et al.*, 2012).

És interessant comentar el fet que el grup control T4, sense antibiòtic ni pèptid, va obtenir els millors resultats en el control del creixement bacterià en comparació amb el control T5, amb kanamicina. Això es podria explicar per la presència de soques resistents a la kanamicina presents a les dosis seminals utilitzades en aquest estudi. Paral·lelament a aquest estudi, es van aïllar i identificar aquestes soques microbianes, resultant ésser *Proteus* spp. i *Streptococcus* spp. En conclusió, i tenint en compte els resultats de l'estudi, la PG1 a baixa concentració (2.5 µg/ml) mostra millors resultats que els grups control en evitar el creixement bacterià, així com millors resultats en la viabilitat final que els tractaments amb concentració intermèdia (25 µg/ml) i alta concentració (100 µg/ml) de PG1. Tot i així, la viabilitat al final de l'experiment (dia 10) va ser millor en els dos grups control. Així doncs, el pèptid antimicrobià PG1, no sembla la millor opció com a possible substitut dels antibiòtics en els diluents de semen, ja que ha demostrat ser citotòxic pels espermatozoides de porcí. Tot i així, no es pot descartar la PG1 per complet tenint en compte que, altres estudis han avaluat l'efecte de pèptids antimicrobians truncats, observant que el seu efecte citotòxic pot variar per complet (Tamamura *et al.*, 1995). Seria necessari la realització de més estudis per estudiar l'efecte de la PG1 en la seva forma de pèptid truncat.

BIBLIOGRAFIA

- Althouse, G.C. [et al.] (2000). «Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen». *Theriogenology*, vol. 53, p. 1167-1176.
- Bolarín, G. (2011). «Bacteriología en semen de porcino». *Avances en tecnología porcina*, vol. 8, núm. 79, p. 20-30.
- Bussalleu, E.; Torner, E. (2013). «Quality improvement of boar seminal doses». A: Bonet, S., Casas, I., Holt, W.V., Yeste, M. (Eds). *Boar Reproduction. Fundamentals and New Biotechnological Trends*. Springer-Verlag, Heidelberg, p. 517-550.
- Cross, N.L. (1998). «Role of cholesterol in sperm capacitation». *Biol. Reprod.*, vol. 59, p. 7-11.
- Giuliani, A. [et al.] (2007). «Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics». *Central European Journal of Biology*, vol. 2, núm.1, p.1-33.
- Hancock, R.E.; Patrzykat, A. (2002). «Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics». *Curr. Drug Targets-Infect. Disord.*, vol. 2, p. 79-83.
- Kuster, C.E.; Althouse, G.C. (2016). «The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance». *Theriogenology*, vol. 85, núm. 1, p. 21-26.
- Lam, K.L. [et al.] (2012). «Mechanism of structural transformations induced by antimicrobial peptides in lipid membranes». *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 1818, núm.2, p. 194-204.
- Peters, B.M. [et al.] (2010). «Antimicrobial Peptides: primeval molecules or future drugs?». *Plos Pathogens*, vol.6, núm. 10, e1001067.
- Schulze, M. [et al.] (2014). «Effects of cationic antimicrobial peptides on liquid-preserved boar spermatozoa». *PLoS One*, vol. 9, núm. 6, p. 96:e100490.
- Schulze, M. [et al.] (2016). «Liquid storage of boar semen: Current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders». *Theriogenology*, vol. 88, núm. 1, p. 39-46.
- Tamamura, H. [et al.] (1995). «Synthesis of protegrin-related peptides and their antibacterial and anti-human immunodeficiency virus activity». *Chem. Pharm. Bull.*, vol.43, núm. 5, p.853-858.
- Yang, L. [et al.] (2001). «Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores». *Biophys J.*, vol. 81, núm. 3, p.1475-1485.
- Zasloff, M. (2002). «Antimicrobial peptides of multicellular organisms». *Nature*, vol. 415, núm. 6870, p.389-395.

