

PHOSPHOLIPID HYDROPEROXIDE GLUTATHIONE PEROXIDASE (PHGPx) NEL SEME E NEL TESTICOLO DI TORELLI DI RAZZA CHIANINA, MARCHIGIANA E ROMAGNOLA: UN MARKER DI POTENZIALE FERTILITÀ?

Stradaioi G. (1), Sylla L. (2), Parillo F. (3), Gargiulo A.M. (3), Monaci M. (2)

(1) *Dipartimento di Scienze Animali - Università di Udine - Via delle Scienze 208 - 33100 Udine, Italia*

(2) *Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria - Università di Perugia - Via S. Costanzo, 4 - 06126 Perugia, Italia*

(3) *Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie - Università di Perugia - Via S. Costanzo, 4 - 06126 Perugia, Italia*

RIASSUNTO - La ricerca è stata condotta per valutare l'attività enzimatica e l'immunolocalizzazione della selenoproteina PHGPx negli spermatozoi e nei testicoli di bovini delle razze italiane da carne mettendola in relazione con alcuni parametri qualitativi del seme. L'attività enzimatica dei campioni seminali è risultata correlata positivamente con le percentuali di spermatozoi mobili ($r = 0,45$; $P < 0,05$) ed inversamente con la percentuale di cellule anomale ($r = -0,44$; $P < 0,05$). Al microscopio ottico gli spermatozoi sono risultati positivi a livello della testa e del tratto intermedio. Al TEM numerose particelle d'oro erano presenti a livello della membrana nucleare, della cromatina, dei corpi cromatoidi e dell'acrosoma. Nel tratto intermedio, la reazione anticorpale era presente a livello dei mitocondri. Tali dati dimostrano l'esistenza di una positiva correlazione tra alcuni indici qualitativi del seme e la PHGPx.

PAROLE CHIAVE: Bovino, PHGPx, Seme, Testicolo, Fertilità, Immunocitochimica.

INTRODUZIONE

La PHGPx è una selenoproteina con funzione di protezione delle membrane biologiche dai danni ossidativi, che contiene la maggior parte del selenio presente a livello dei testicoli. L'enzima, tramite la catalisi di una reazione antiossidante, porta alla riduzione dei lipoperossidi a spese del glutatione; gioca inoltre un ruolo chiave nel modulare la sintesi degli eicosanoidi, l'apoptosi e le fasi finali della spermatogenesi. Esistono tre varianti di questa proteina: citosolica, mitocondriale e nucleare. Nel testicolo dei roditori è altamente espressa ed è stata localizzata a livello del citoplasma, dei mitocondri e del nucleo degli spermatidi e degli spermatozoi. Tuttavia la sua attività enzimatica risulta molto ridotta negli spermatozoi maturi, dove acquisisce un importante ruolo strutturale costituendo una gran parte della capsula mitocondriale (Ursini *et al.*, 1999). Recentemente, inoltre, un ridotto contenuto di PHGPx è stato riscontrato sia nel seme di uomini ipofertili (Foresta *et al.*, 2002) sia in quello di tori con ridotte caratteristiche qualitative del seme (Stradaioi *et al.*, 2004). Il nostro obiettivo è stato quello di misurare l'attività enzimatica e localizzare immunistochimicamente la presenza della proteina nel testicolo e negli spermatozoi eiaculati di tori con diverse caratteristiche seminali.

MATERIALI E METODI

L'esperimento ha previsto l'impiego di ventisette giovani tori di razza Chianina, Marchigiana e Romagnola selezionati tramite un esame clinico della fertilità e assegnati in base alle caratteristiche seminali a due classi di potenziale fertilità: soddisfacente (gruppo S; n=17), e incerto-insoddisfacente (gruppo I; n=10). Aliquote di seme di ciascun toro, sono state sospese in PBS, centrifugate due volte (600 x g) e i pellets sono stati conservati a -80° C fino al

momento dell'analisi. L'attività enzimatica è stata determinata con il metodo precedentemente descritto da (Roveri *et al.*, 2002).

Campioni di testicolo e di seme sono stati prelevati da cinque tori normofertili e da un bovino affetto da teratozoospermia, processati per l'immunoistochimica al microscopio ottico ed elettronico utilizzando un anticorpo policlonale anti-PHGPx fornito dal Prof. Ursini, Università degli Studi di Padova. I siti di legame sono stati evidenziati utilizzando come cromogeno la diaminobenzidina per la microscopia ottica e particelle d'oro ($\phi = 10\text{nm}$) per il TEM.

L'analisi dei dati è stata effettuata con il pacchetto statistico SPSS (8), utilizzando un modello lineare generalizzato ponendo come fattori principali il gruppo (S vs I). Le differenze sono state considerate significative con $P < 0,05$.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

La percentuale di spermatozoi progressivamente mobili ($62,4 \pm 2,8$ vs $24,0 \pm 3,7$ $P < 0,001$), quella delle anomalie del tratto intermedio ($4,7 \pm 1,0$ vs $8,9 \pm 1,3$; $P < 0,05$) e delle teste staccate ($4,4 \pm 1,3$ vs $8,1 \pm 1,7$ per il gruppo S e I rispettivamente; $P < 0,1$) sono risultate significativamente diverse nei due gruppi. L'attività enzimatica riscontrata, è risultata diversa nei due gruppi ed al limite della significatività statistica ($P < 0,07$). Il gruppo I ha presentato un'attività inferiore ($138 \pm 45,5$ mU/mg) rispetto a quello S ($247,7 \pm 34,9$ mU/mg). L'attività enzimatica misurata è risultata correlata positivamente con la percentuale di spermatozoi progressivamente mobili ($r = 0,45$; $P < 0,05$) ed inversamente con quella degli spermatozoi con distacco della testa ($r = -0,44$; $P < 0,05$).

I risultati ottenuti al microscopio ottico su campioni di testicolo di toro normofertile hanno rivelato una forte positività all'anticorpo localizzata nel citoplasma delle cellule spermatogeniche in via di maturazione presenti nel compartimento apicale dei tubuli. Gli strisci dei campioni seminali hanno mostrato una positività a livello della testa e del tratto intermedio degli spermatozoi mentre le code risultavano negative (Fig. 1). Al TEM numerose particelle d'oro erano presenti a livello della membrana nucleare, della cromatina e della membrana acrosomiale. In corrispondenza del tratto intermedio la reazione anticorpale era presente a livello mitocondriale per lo più localizzata in corrispondenza della membrana esterna (Fig. 2). I controlli risultavano costantemente negativi. I siti di legame della PHGPx nel testicolo di toro sono risultati simili a quelli descritti da (Haraguchi *et al.*, 2003) nel ratto. Infatti, al microscopio ottico abbiamo riscontrato immunoreattività negli spermatidi e negli spermatozoi. L'impiego del TEM ha fornito informazioni più dettagliate sulla localizzazione della PHGPx negli spermatozoi. La localizzazione delle particelle d'oro è stata riscontrata a livello della cromatina, dell'acrosoma e dei mitocondri. Nel testicolo del bovino teratozoospermico è stata riscontrata una debole positività localizzata a livello dell'acrosoma solo di alcuni sporadici spermatidi, mentre negli strisci dei campioni seminali una ridotta immunoreattività era presente solo a livello della testa degli spermatozoi.

Questi risultati sono in accordo con quanto osservato nel ratto da Godeas *et al.* (1997), i quali hanno ipotizzato che la PHGPx cromatinica oltre ad avere una funzione protettiva nei confronti del DNA dai danni ossidativi, potrebbe svolgere anche una importante funzione nel processo di stabilizzazione del nucleo catalizzando l'ossidazione degli aminoacidi solforati delle protamine. Tale processo proteggerebbe il nucleo dall'azione dei mutageni e la cromatina dall'autolisi e inoltre favorirebbe la penetrazione dello spermatozoo attraverso la zona pellucida durante la fecondazione. Anche la presenza della PHGPx a livello dell'acrosoma svolgerebbe una azione antiossidante al momento della reazione acrosomiale (Haraguchi *et al.*, 2003). L'associazione della PHGPx con le membrane nucleare e mitocondriale esterna negli spermatozoi maturi, indicherebbe la perdita della sua attività enzimatica e l'acquisizione di una funzione strutturale. La ridotta fertilità associata alla carenza di selenio nei riproduttori maschi, sarebbe infatti connessa ad una diminuita e/o aberrante presenza della proteina nello spermatozoo (Ursini *et al.*, 1999). Tale sindrome è associata ad un incremento delle anomalie morfologiche degli

spermatozoi, particolarmente evidenti a carico del tratto intermedio dove la proteina serve da stabilizzante delle strutture del citoscheletro (Olson *et al.*, 2004).

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti suggeriscono che anche nel bovino esiste una stretta relazione tra il contenuto di PHGPx degli spermatozoi maturi e la loro integrità morfologica e funzionale.

Figura 1. – Colorazione immunoistochimica della PHGPx. La testa ed il tratto intermedio dello spermatozoo sono immunoreattivi.

Figure 1 – PHGPx immunoistochemistry. The head and the midpiece of spermatozoa are immunostained.

Figura 2. – Al TEM particelle d'oro sono presenti nella membrana nucleare, nella cromatina, nella membrana acrosomiale e a livello mitocondriale.

Figure 2. – Electron microscopy revealed gold particles in the nuclear envelope, chromatin, and in the outer mitochondrial membrane.

Figura 1
Figure 1

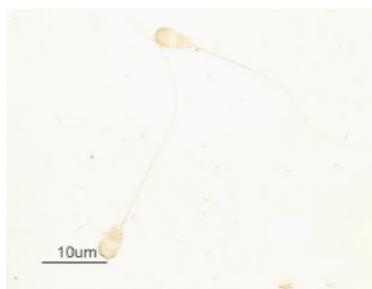


Figura 2.
Figure 2.



Tabella 1 – Caratteristiche seminali dei tori oggetto della prova (Media stimata ± DS), nel gruppo soddisfacente (S) ed in quello incerto-insoddisfacente (I).

Table 1 - Seminal characteristics of experimental bulls (LS Mean ± SD), in the satisfactory (S) and Unsatisfactory or Questionable (UQ) groups.

Variabile <i>Parameter</i>	Gruppo S <i>Group S</i> (n = 17)	Gruppo I <i>Group UQ</i> (n = 10)	P
Attività della PHGPx (mU/mg proteine) <i>PHGPx activity (mU/mg protein)</i>	247.7 ± 34.9	138 ± 45.5	0.07
Volume (ml) <i>Volume</i>	3.6 ± 1.6	4.0 ± 1.7	-
Motilità totale (%) <i>Total motility</i>	62.4 ± 7.3	24.0 ± 16.6	0.001
Spermatozoi anomali (%) <i>Abnormal spermatozoa</i>	26.8 ± 18.9	28.0 ± 15.9	-
Gocce citoplasmatiche prossimali (%) <i>Proximal cytoplasmic droplet</i>	10.0 ± 15.7	4.8 ± 9.5	-
Gocce citoplasmatiche totali (%) <i>Total cytoplasmic droplet</i>	14 ± 16.1	5.2 ± 9.6	-
Anomalie del tratto intermedio (%) <i>Abnormal mid-piece</i>	4.7 ± 3.6	8.9 ± 4.9	0.01
Teste e code staccate (%) <i>Detached heads and tails</i>	4.4 ± 5.1	8.1 ± 6.0	0.05

BIBLIOGRAFIA- REFERENCES

- Foresta C., Flohe L., Garolla A., Roveri A., Ursini F., Maiorino M. 2002. Biol. Reprod. 67:967-971.
- Godeas C., Tramer F., Micali F., Soranzo M., Sandri G., Panfili E. 1997. Biol. Reprod. 57: 1502-1508.
- Haraguchi C.M., Mabuchi T., Hirata S., Shoda T., Yamada A.T., Hoshi K., Yokota S. 2003. Biol. Reprod. 69: 885-895.
- Olson G.E., Winfrey V.P., Hill K.E., Burk R.F. 2004. Reprod. 127: 335-342.
- Roveri A., Flohe L., Maiorino M., Ursini F. 2002. Methods Enzymol. 347: 208-212.
- SPSS. 1997. SPSS Advanced Statistics 7.5. SPSS Inc., Chicago, IL, USA.
- Stradaioli G., Parillo F., Sylla L., Tubaro F., Gargiulo A.M., Monaci M. 2004. 15th Int. Cong. Anim. Reprod., Porto Seguro, Brasil, August 8-12, Vol 1: 192.
- Ursini F., Heim S., Kiess M., Maiorino M., Roveri A., Wissing J., Flohe L. 1999. Science 285:1393-1396.

Research supported by the project grant from Minister of Instruction, University and Research (PRIN 2002).

PHOSPHOLIPID HYDROPEROXIDE GLUTATHIONE PEROXIDASE (PHGPx) IN SEMEN AND TESTIS OF CHIANINA, MARCHIGIANA AND ROMAGNOLA YEARLING BULLS: COULD IT BE A MARKER OF POTENTIAL FERTILITY?

Stradaoli G. (1), Sylla L. (2), Parillo F. (3), Gargiulo A.M. (3), Monaci M. (2)

ABSTRACT - The present study was performed to evaluate the enzymatic activity and the immunolocalization of the selenoprotein PHGPx in bovine spermatozoa and testis of Italian beef bulls, in order to correlate the PHGPx activity with seminal characteristics. PHGPx activity resulted positively correlated with percentage of motile spermatozoa ($r = 0.45$; $P < 0.05$) and inversely with percentage of detached heads and tails ($r = -0.44$; $P < 0.05$). At light microscopy, signals for PHGPx were observed, in the acrosome, nucleus and midpiece. The ultrastructural data revealed the presence of gold particles in the nuclear envelope, chromatin and chromatoid bodies. In the midpiece, labeling for PHGPx was closely associated with the intermembrane space and in the matrix of mitochondria. Our data suggest that motility and normal morphology of mature bovine spermatozoa are associated with high PHGPx content.

KEYWORDS: Bovine, PHGPx, Semen, Testis, Fertility, Immunocytochemistry.

INTRODUCTION

PHGPx is a selenoprotein, which protects biomembranes from oxidative damages, and it accounts for most of the selenium content in mammalian testis. This enzyme catalyzes an antioxidant reaction where lipid hydroperoxides are reduced at expenses of glutathione, resulting also a key player in modulating eicosanoid biosynthesis, apoptosis and the final aspects of cellular differentiation during spermatogenesis. There are at least three different variants of this protein: cytosolic, mitochondrial and nuclear. In rodent testis it is associated with cytoplasm, mitochondria and nucleus of mainly all spermatogenic cells. However, its enzymatic activity is extremely low in mature spermatozoa where it acquires a structural function constituting the major component of the mitochondrial capsule (Ursini *et al.*, 1999). This suggested new approaches to unravel male fertility dependency on selenium. Recently, a reduced PHGPx content was revealed in both infertile human males (Foresta *et al.*, 2002) and bulls with impaired seminal characteristics (Stradaoli *et al.*, 2004). Our objectives were to characterize by immunohistochemistry the protein in ejaculated bovine spermatozoa and to compare their activity in bulls with different semen quality.

MATERIALS AND METHODS

Twenty-seven Chianina, Romagnola and Marchigiana yearling bulls underwent a breeding soundness examination, and based on seminal characteristics were classified as satisfactory (group S; $n=17$), and unsatisfactory or questionable potential breeder (group UQ; $n=10$). Aliquots of semen samples from each bulls were diluted in PBS, centrifuged twice ($600 \times g$) and the pellets stored at $-80^{\circ} C$ until analysis. Enzymatic rescued activity of PHGPx was determined as outlined by (Roveri *et al.*, 2002). Testes and semen samples, obtained from five adult bulls of proven fertility and from one with teratozoospermia, were processed for immunohistochemistry reactions by light and transmission electron microscopy using a polyclonal antibody anti-PHGPx supplied by Prof. Ursini, of Padova University. The labelling sites for PHGPx were revealed using diaminobenzidine as the chromogen for light microscopy and gold particles ($\phi=10nm$) for TEM.

Data were analysed using the general linear model procedure of SPSS (1997), considering groups as main components (S vs UQ). Differences were considered statistically significant at $P<0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Seminal characteristics differing between the two groups were: percentage of motile cells (62.4 ± 2.8 vs 24.0 ± 3.7 for S and UQ groups respectively; $P < 0.001$), of midpiece abnormality (4.7 ± 1.0 vs 8.9 ± 1.3 ; $P < 0.05$), and of detached heads and tails (4.4 ± 1.3 vs 8.1 ± 1.7 ; $P < 0.1$). The difference on enzyme rescued activity between the two groups approaches the significance ($P < 0.07$) with the group UQ showing a lower value (138 ± 45.5 mU/mg) compared to the S one (247.7 ± 34.9 mU/mg). PHGPx rescued activity resulted positively correlated with percentage of motile spermatozoa ($r = 0.45$; $P < 0.05$) and inversely with percentage of detached heads and tails ($r = -0.44$; $P < 0.05$). Specific immunostaining of bull testis by antiserum against PHGPx was evidenced, at light microscope, throughout the cytoplasm of the maturing sperm cells present in the apical region of the seminiferous tubules. In ejaculated spermatozoa, positive staining was localised in the head and mid-piece whereas the tail resulted constantly negative (Fig. 1). The ultrastructural data revealed the presence of signals for PHGPx in the acrosome, nucleus and mid-piece of ejaculated spermatozoa. In particular, gold labelling for PHGPx was closely associated with the nuclear envelope, chromatin and acrosomes. In the mid-piece PHGPx signals were observed mainly in the outer mitochondrial membrane (Fig. 2). In control sections the immunostaining was completely negative. Sites of localization of PHGPx in bull testis are similar to those described by (Haraguchi *et al.*, 2003) in the rat. In fact, we observed at light microscope specific immunostaining by antiserum against PHGPx in the spermatids and spermatozoa in the testis tubule lumen. More detailed informations on the localization of PHGPx in bull spermatozoa were obtained with electron microscopy. Indeed, immunogold electron microscopy indicates that PHGPx is evident at the level of chromatin, acrosomes and mitochondria.

In the testis of the teratozoospermic bovine, it was observed a weak positivity localised in the acrosomes of some isolated spermatids whereas in ejaculated spermatozoa the weak immunoreactivity was localised in the sperm heads.

These findings agree with previous data reported in the rat by Godeas *et al.*, (1997). They hypothesized that, other than a protective role against DNA peroxidative damage, PHGPx plays a role in sperm nucleus stabilization catalysing the oxidation of the cystein-rich nuclear protamines. This process is important in protecting the sperm nucleus from mutagens, in protecting the chromatin from autolysis and in facilitating sperm penetration through the zona pellucida at fertilization. The association of PHGPx with the acrosome has been reported (Haraguchi *et al.*, 2003). The acrosomal PHGPx is stored probably as anti-oxidant to operate during fertilization, including acrosomal reactions. The localization of PHGPx in the nuclear envelope and in the mitochondrial outermembrane (capsule) represents the portion of the protein which was enzymatically inactive and that performs a structural role in forming the mitochondrial capsule (Ursini *et al.*, 1999). This new function may therefore explain the Se-deficiency-dependent morphological alterations of sperm cells, particularly for the mid-piece abnormality, which are due to the lack of the structural functions ascribed to the protein (Olson *et al.*, 2004).

CONCLUSIONS

Our data also suggest that normal motility and morphologic appearance of mature bull spermatozoa are associated with a high PHGPx content.