

R-238 Rev. Cientif. FCV-LUZ, XXXIII, SE, 276-277, 2023, <https://doi.org/10.52973/rcfcv-wbc121>**Crocina improves post-thaw quality, fertility-associated gene expression and fertilization potential of buffalo bull sperm****Amjad Riaz<sup>1</sup>, Ghulam S. Khan<sup>1</sup>, Muhammad Zahid Tahir<sup>1</sup>, Muhammad Yasir Zahoor<sup>2</sup>, Hifz-ul-Rahman<sup>3</sup>**<sup>1</sup> Department of Theriogenology, University of Veterinary and Animal Sciences, Lahore, Pakistan<sup>2</sup> Institute of Biochemistry and Biotechnology, University of Veterinary and Animal Sciences, Lahore, Pakistan<sup>3</sup> Department of Livestock Management, University of Veterinary and Animal Sciences, Lahore, Pakistan\*Corresponding author: Riaz, Amjad ([dramjadriaz@uvas.edu.pk](mailto:dramjadriaz@uvas.edu.pk))**ABSTRACT**

Buffalo sperm suffer more cryoinjuries due to lipid peroxidation of their high structural polyunsaturated fatty acid contents than cattle. Consequently, the post-thaw fertilization potential of buffalo sperm is compromised. Crocin is a carotenoid known for its antioxidant potential through scavenging reactive oxygen species. The current study investigated the effect of crocin addition in the semen extender on the post-thaw quality, fertility-associated gene expression, and fertilization potential of buffalo bull sperm. Semen samples (n=32) from four Nili-Ravi buffalo bulls were extended with tris-citric acid extender containing different concentrations of crocin (0mM; control, 0.5, 1, 1.5, and 2mM). The extended semen was packed in 0.5 mL French straws (25 x 10<sup>6</sup> sperm/straw) and cryopreserved using liquid nitrogen vapor freezing protocol. Computer-assisted semen analysis, Normal Apical Ridge assay, Rhodamine 123, Acridine orange, and Propidium iodide staining were used to assess sperm motility parameters, acrosome integrity, mitochondrial membrane potential, DNA integrity, and viability, respectively. Expression levels of sperm acrosome-associated *SPACA3*, DNA condensation-related *PRM1*, anti-apoptotic *BCL2*, pro-apoptotic *BAX*, and oxidative stress-associated *ROMO1* genes were evaluated through qPCR. The *in vivo* fertility of semen doses containing 1mM crocin was compared with control. Buffaloes were inseminated 24 hours after the onset of natural estrus and transrectally palpated for pregnancy at least

La crocina mejora la calidad post-descongelación, la expresión genética asociada a la fertilidad y el potencial de fertilización del semen de búfalo

**Amjad Riaz<sup>1</sup>, Ghulam S. Khan<sup>1</sup>, Muhammad Zahid Tahir<sup>1</sup>, Muhammad Yasir Zahoor<sup>2</sup>, Hifz-ul-Rahman<sup>3</sup>**<sup>1</sup> Departamento de Teriogenología, Universidad de Ciencias Veterinarias y Animales, Lahore, Pakistán<sup>2</sup> Instituto de Bioquímica y Biotecnología, Universidad de Ciencias Veterinarias y Animales, Lahore, Pakistán<sup>3</sup> Departamento de Gestión Ganadera, Universidad de Ciencias Veterinarias y Animales, Lahore, Pakistán\*Autor de correspondencia: Riaz, Amjad ([dramjadriaz@uvas.edu.pk](mailto:dramjadriaz@uvas.edu.pk))**RESUMEN**

Los espermatozoides de búfalo sufren más criolesiones debido a la peroxidación lipídica de su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados estructurales que el ganado vacuno. En consecuencia, el potencial de fertilización del espermatozoide de búfalo después de la descongelación se ve comprometido. La crocina es un carotenoide conocido por su potencial antioxidante al eliminar especies reactivas de oxígeno. El estudio actual investigó el efecto de la adición de crocina en el diluyente de semen sobre la calidad post-descongelación, la expresión genética asociada a la fertilidad y el potencial de fertilización del espermatozoide de búfalos. Las muestras de semen (n=32) de cuatro toros búfalo Nili-Ravi se extendieron con un diluyente de ácido tris-cítrico que contenía diferentes concentraciones de crocina (0 mM; control, 0,5, 1, 1,5 y 2 mM). El semen extendido se envasó en pajillas (pajuelas) francesas de 0,5 ml (25 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/pajita) y se criopreservó utilizando un protocolo de congelación con vapor de nitrógeno líquido. Se utilizaron análisis de semen asistido por computadora, evaluación de la zona de cresta apical normal, rodamina 123, naranja de acridina y tinción con yoduro de propidio para evaluar los parámetros de motilidad de los espermatozoides, integridad acrosómica, potencial de membrana mitocondrial, integridad del ADN y viabilidad, respectivamente. Los niveles de expresión de los genes *SPACA3* asociado al acrosoma del esperma, *PRM1* relacionado con la condensación de ADN,

60 days post-insemination. Data were analyzed through PROC MIXED or PROC GLIMMIX using SAS. Tukey test was applied for multiple comparisons among treatments. Post-thaw evaluation revealed that 0.5 and 1mM crocin improved total motility, plasma membrane integrity, acrosome integrity, mitochondrial membrane potential, and viability, and one and 1.5mM crocin enhanced catalase activity and reduced lipid peroxidation compared to control ( $p < 0.05$ ). Moreover, 1mM crocin improved progressive motility, kinematics, and DNA integrity than control ( $p < 0.05$ ). Expression levels of *SPACA3*, *PRM1*, and *BCL2* genes were higher ( $p < 0.05$ ) with 1mM crocin, whereas no difference ( $p > 0.05$ ) was observed in the expression of *BAX* gene among all groups. Moreover, *ROMO1* gene expression was higher ( $p < 0.05$ ) with 2mM compared to 1mM and 1.5mM crocin. Semen doses containing 1mM crocin showed a higher fertility rate compared to control [ $56 \pm 0.03\%$  (112/200) vs.  $46 \pm 0.04\%$  (92/200), respectively;  $p = 0.0465$ ]. In conclusion, 1mM crocin addition in the semen extender improves post-thaw quality, fertility-associated gene expression, and fertilization potential of buffalo bull sperm.

**Keywords:** crocin, antioxidant, cryopreservation, lipid peroxidation, Protamine 1, fertility.

*BCL2* antiapoptótico, *BAX* proapoptótico y *ROMO1* asociado al estrés oxidativo se evaluaron mediante qPCR. La fertilidad *in vivo* de dosis de semen que contenían crocina 1 mM se comparó con la del control. Las búfalas fueron inseminadas 24 horas después del inicio del estro natural y palpadas transrectalmente para detectar preñez al menos 60 días después de la inseminación. Los datos se analizaron mediante PROC MIXED o PROC GLIMMIX utilizando SAS. Se aplicó la prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre tratamientos. La evaluación posterior a la descongelación reveló que 0,5 y 1 mM de crocina mejoraron la motilidad total, la integridad de la membrana plasmática, la integridad del acrosoma, el potencial de la membrana mitocondrial y la viabilidad, y una y 1,5 mM de crocina mejoraron la actividad catalasa y redujeron la peroxidación lipídica en comparación con el control ( $p < 0,05$ ). Además, la crocina 1 mM mejoró la motilidad progresiva, la cinemática y la integridad del ADN que el control ( $p < 0,05$ ). Los niveles de expresión de los genes *SPACA3*, *PRM1* y *BCL2* fueron mayores ( $p < 0,05$ ) con crocina 1 mM, mientras que no se observaron diferencias ( $p > 0,05$ ) en la expresión del gen *BAX* entre todos los grupos. Además, la expresión del gen *ROMO1* fue mayor ( $p < 0,05$ ) con crocina 2 mM en comparación con crocina 1 mM y 1,5 mM. Las dosis de semen que contenían crocina 1 mM mostraron una tasa de fertilidad más alta en comparación con el control [ $56 \pm 0,03\%$  (112/200) frente a  $46 \pm 0,04\%$  (92/200), respectivamente;  $p = 0,0465$ ]. En conclusión, la adición de 1 mM de crocina en el diluyente de semen mejora la calidad post-descongelación, la expresión genética asociada a la fertilidad y el potencial de fertilización del esperma de búfalo.

**Palabras clave:** crocina, antioxidante, criopreservación, peroxidación lipídica, Protamina 1, fertilidad.