



**Universidad**  
Zaragoza

# Trabajo Fin de Grado en Biotecnología

Influencia de los polimorfismos de MTNR1A en el  
efecto crioprotector de la melatonina en dosis  
seminales ovinas

Influence of MTNR1A polymorphisms on the  
cryoprotective effect of melatonin in ovine seminal  
doses

Autor/es

**Cristina Alierta Viñao**

Director/es

Adriana Casao Gascón  
Victoria Peña Delgado

Facultad de Ciencias  
2022



## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
INTRODUCCIÓN .....	3
CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN OVINO.....	3
Refrigeración del semen ovino .....	3
Congelación de semen ovino.....	4
LA MELATONINA Y LA REPRODUCCIÓN OVINA.....	4
La melatonina en la criopreservación de semen ovino .....	5
EL GEN DEL RECEPTOR DE MELATONINA 1A (MTNR1A) Y SU ASOCIACIÓN CON LA REPRODUCCIÓN ESTACIONAL.....	6
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
PROCESADO DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS .....	8
Obtención de las muestras seminales.....	8
Refrigeración, congelación y descongelación de las muestras .....	8
EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS.....	9
Cálculo de la concentración espermática.....	9
Análisis de la motilidad espermática.....	9
Estudio de la viabilidad celular (integridad de la membrana plasmática).....	9
Determinación de la inversión de fosfatidilserina.....	10
Estudio de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	11
Evaluación del estado de capacitación mediante la tinción con clorotetraciclina .....	12
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	14
EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA DURANTE LA REFRIGERACIÓN Y CONGELACIÓN DE SEMEN.....	14
INFLUENCIA DEL GENOTIPO PARA EL RECEPTOR DE MELATONINA 1 (MTNR1A) EN LA ACCIÓN PROTECTORA DE LA MELATONINA SOBRE LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA DURANTE LA REFRIGERACIÓN A 5 °C .....	16
Efecto sobre la motilidad .....	16
Efecto sobre la integridad de membrana.....	18
Efecto sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	19
Efecto sobre la inversión de la fosfatidilserina .....	20
Efecto sobre la capacitación.....	20
CONCLUSIONES .....	22
CONCLUSIONS .....	22
BIBLIOGRAFÍA .....	23



## RESUMEN

La refrigeración y la congelación del semen provoca una serie de efectos perjudiciales para los espermatozoides conocidos como cold-shock, que podrían ser evitados parcialmente empleando agentes crioprotectores, entre ellos, la melatonina. Esta hormona puede llevar a cabo alguno de sus efectos uniéndose a sus receptores de membrana, MT1 y MT2. El gen del receptor de melatonina 1A (MNTR1A) presenta varios polimorfismos, pero se desconoce si podrían influir en el efecto de la melatonina durante la criopreservación de dosis seminales ovinas.

Así, el objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de los polimorfismos de MTNR1A en el efecto crioprotector de la melatonina en espermatozoides ovinos. Para ello, muestras seminales de seis moruecos adultos, previamente genotipados para el polimorfismo *RsaI* del gen MTNR1A (2 C/C, 2 C/T y 2 T/T), se refrigeraron y congelaron sin y con melatonina 1 mM y 1  $\mu$ M. Antes y después de este proceso se evaluó la motilidad, integridad de membrana, estado de capacitación y marcadores apoptóticos de los espermatozoides.

Tras comprobar que la refrigeración a 5 °C causaba menos daño en los espermatozoides ovinos que la congelación, se decidió utilizar únicamente muestras refrigeradas. Los resultados obtenidos indican que el genotipo no parece influir en la capacidad crioprotectora de la melatonina, ya que no se observaron mejoras en ninguno de los parámetros estudiados. Además, la motilidad total y progresiva disminuyeron ( $P < 0,001$  y  $P < 0,05$ ) en las muestras tratadas con melatonina de forma diferencial en función del genotipo y la concentración utilizada, mientras los espermatozoides de machos portadores del genotipo C/C podrían ser más sensibles a la refrigeración, ya que presentan un menor porcentaje de espermatozoides no capacitados que el resto de genotipos.

En conclusión, este trabajo sugiere que el polimorfismo *RsaI* del gen MTNR1A no influye en la capacidad crioprotectora de la melatonina.

## ABSTRACT

Refrigeration and freezing of semen causes a number of negative effects for sperm cells known as cold-shock, which could be partially avoided by using cryoprotective agents, including melatonin. This hormone can perform some of its effects by binding to its membrane receptors, MT1 and MT2. The melatonin receptor 1A (MNTR1A) gene has several polymorphisms, but it is unknown whether they could influence the effect of melatonin during the cryopreservation of seminal doses in ram.

Thus, the aim of this study was to study the influence of MTNR1A polymorphisms on the cryoprotective effect of melatonin in ram spermatozoa. For this purpose, six seminal samples, previously genotyped for the *RsaI* polymorphism of the MTNR1A gene (2 C/C, 2 C/T and 2 T/T), were refrigerated and frozen without and with melatonin 1 mM and 1  $\mu$ M. Before and after this process, motility, membrane integrity, capacitation status and apoptotic markers of sperm cells were evaluated.

After finding that refrigeration at 5 °C caused less damage to ram spermatozoa than freezing, it was decided to use only chilled samples. The results obtained indicate that the genotype does

not appear to influence the cryoprotective capacity of melatonin, since no improvements were observed in any of the parameters studied. In addition, total and progressive motility decreased ( $P < 0.001$  and  $P < 0.05$ ) in melatonin-treated samples differentially depending on the genotype and the concentration used, whereas the spermatozoa of male carriers of the genotype C/C may be more sensitive to refrigeration, since they have a lower percentage of no capacitated spermatozoa than the rest of genotypes. In conclusion, this work suggests that the *RsaI* polymorphism of the MTNR1A gene does not influence the cryoprotective capacity of melatonin.

# INTRODUCCIÓN

## CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN OVINO

La ganadería ovina se encuentra distribuida por todo el planeta para el aprovechamiento de carne, leche, y también lana, cuero y estiércol. En España, este sector, junto con el caprino, supone un 4 % de la Producción Final Agraria del país, ocupando el quinto lugar en importancia económica por detrás del sector porcino, el de vacuno de carne, la avicultura de carne y del sector vacuno de leche (1). Por tanto, se hace necesaria la aplicación de biotecnologías de reproducción en la especie con el objetivo de aumentar su productividad y rentabilidad de los rebaños.

### Refrigeración del semen ovino

Dentro de las biotecnologías reproductivas que se podrían utilizar destacan la criopreservación: refrigeración o congelación de semen. La refrigeración se considera apropiada para la conservación de semen por cortos períodos de tiempo tras su recolección, por ejemplo, para utilizarlo en una inseminación artificial o una fecundación in vitro. Sin embargo, esta técnica tiene efectos perjudiciales sobre las propiedades físicas y la morfología de los espermatozoides y, por tanto, sobre su capacidad fecundante (2).

La refrigeración provoca en los espermatozoides una serie de efectos negativos, conocidos como choque térmico o cold-shock, proporcionales a la velocidad de enfriamiento, el intervalo de temperatura y el rango de temperatura (3). La susceptibilidad de los espermatozoides de las distintas especies a estos daños por cold-shock varía, y viene determinada por la relación de colesterol y fosfolípidos de su membrana plasmática. En el caso de la especie ovina esta relación es muy baja, dado que los espermatozoides tienen poco colesterol en su membrana, lo que hace que sean muy sensibles a las bajas temperaturas (4). Los efectos negativos desencadenados por el cold-shock en estas células pueden ser:

- **Deterioro de la motilidad:** El espermatozoide sufre cambios que afectan a la permeabilidad de la membrana plasmática a nivel del flagelo, disminuye la captación de oxígeno y caen los niveles de ATP y, en consecuencia, se reduce la motilidad (5).
- **Alteraciones estructurales:** Se produce una desorganización de la membrana plasmática, formándose vesículas híbridas entre la membrana acrosomal y la membrana plasmática debido a que los fosfolípidos de membrana disminuyen tras la refrigeración, concretamente la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (6). Al mismo tiempo, se produce una inversión de fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana, lo que provoca inestabilidad y asimetría fosfolipídica (7). Estos cambios también influyen en las proteínas de la membrana, que pierden su función y contribuyen a que la membrana se torne más fluida y permeable (8). Además, se produce peroxidación lipídica en la membrana debido a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (6).
- **Daño oxidativo:** La criopreservación induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por acumulo de productos tóxicos del metabolismo, perjudiciales para el espermatozoide (6) y para el ADN (9). Los niveles altos de ROS provocan la disminución de la motilidad y viabilidad, de la integridad acrosomal y del potencial de membrana mitocondrial (10). Además, los espermatozoides dañados o defectuosos generan

también grandes cantidades de ROS (11).

- **Cambios semejantes a los del proceso de capacitación (criocapacitación):** La capacitación espermática es un proceso imprescindible para que los espermatozoides adquieran la capacidad fecundante. Ocurre en el tramo final del útero o en el oviducto y conlleva cambios en la membrana plasmática (12), movimientos del calcio intracelular (13) y una serie de cascadas de transducción de señales bioquímicas (14,15). Se ha evidenciado que, tras el cold-shock, los espermatozoides se comportan como espermatozoides capacitados, una situación que recibe el nombre de criocapacitación. La criocapacitación se debe a las modificaciones y reorganización en la membrana de la cabeza del espermatozoide debido a la redistribución de fosfolípidos y a la salida de colesterol (16) que los hace más reactivos y hace que adquieran un estado parcialmente capacitado (17).
- **Aumento de marcadores apoptóticos:** con el cold-shock se produce la fragmentación de ADN, translocación de la fosfatidilserina, y presencia de caspasas activas. El descenso y el posterior incremento de temperatura (al utilizar las muestras seminales refrigeradas para una inseminación artificial o fecundación in vitro) implican un aumento de estos marcadores (18) que podrían explicar, en parte, el daño producido en los espermatozoides ovinos por la refrigeración.

#### Congelación de semen ovino

La congelación de semen es una de las biotecnologías reproductivas más utilizadas, si bien requiere un equilibrio adecuado de muchos factores para lograr resultados óptimos, y sus resultados son muy variables en función de la especie (19). En la especie ovina, dada esa elevada sensibilidad a las bajas temperaturas comentada anteriormente, los resultados de la inseminación artificial con semen congelado resultan hasta ahora insatisfactorios (20). En concreto, la fertilidad obtenida con semen congelado es mucho menor a la de semen fresco, debido principalmente a una baja viabilidad post-descongelación (21). Esto es fruto de los daños ocasionados en la membrana del espermatozoide durante el proceso de refrigeración y congelación posterior, donde se produce daño oxidativo (22) y se altera la función metabólica del espermatozoide, disminuyendo así el número de células viables y ocasionando una capacitación espermática prematura (23). Estos daños podrían ser evitados parcialmente controlando la velocidad de congelación, usando un diluyente adecuado y agregando agentes crioprotectores apropiados.

Por ello, en la criopreservación de semen ovino se han evaluado diferentes tipos de diluyentes y agentes crioprotectores obteniéndose resultados muy variables (20). Entre los compuestos propuestos, destaca la hormona melatonina (22).

#### LA MELATONINA Y LA REPRODUCCIÓN OVINA

La melatonina es una hormona que se sintetiza principalmente en la glándula pineal durante la noche a partir del aminoácido triptófano, aunque también se produce a lo largo del día en otros tejidos extrapineales, entre ellos el tracto reproductor masculino (24). Esta hormona se encuentra implicada en la regulación de muchos procesos fisiológicos y presenta un mecanismo de acción muy complejo. Entre otras funciones, participa en la regulación de los ritmos



circadianos y circanales y de la reproducción en mamíferos estacionales, como es la especie ovina. También destaca por su acción antioxidante, pues evita el daño oxidativo en macromoléculas, células y tejidos (25).

La melatonina puede ejercer muchas de sus funciones a través de su interacción con receptores específicos que pertenecen a la superfamilia de receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs, del inglés *G-protein coupled receptors*). En mamíferos se han descrito dos receptores: MT1 y MT2, mientras que un tercer receptor, MT3, está presente en aves, anfibios y peces (26). Además, debido a su naturaleza lipofílica, la melatonina también es capaz de atravesar la membrana plasmática directamente para ejercer su función en el citoplasma o unirse a receptores nucleares.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado la presencia de los receptores de melatonina MT1 y MT2 en la membrana de los espermatozoides ovinos (27), así como el posible papel del receptor MT2 en la capacitación espermática (24). En células somáticas, la unión de melatonina a estos receptores provoca una cascada de señalización mediada por segundos mensajeros, que varía según el tejido y la especie estudiados (28). Muchas de esas rutas de transducción de señales son las mismas que participan en muchos de los procesos que sufre el espermatozoide en el tracto reproductor femenino (29), tales como la hiperactivación, la capacitación y la reacción acrosómica.

En lo que concierne a los procesos reproductivos, la melatonina regula la estacionalidad reproductiva mediante el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (30). En el caso de la especie ovina, que presenta una reproducción estacional muy marcada, con un período reproductivo en otoño e invierno y otro no reproductivo en primavera y verano, la melatonina actúa secretada por la glándula pineal como estimuladora de la reproducción, aunque esta también puede verse afectada por factores ambientales, la nutrición, o incluso las relaciones sociales entre individuos (31). Además de actuar sobre el citado eje, en los machos de algunas especies de mamíferos, entre ellas la ovina, se ha descrito la presencia de melatonina en el plasma seminal, donde ejercería un efecto directo sobre los espermatozoides (32), ya que la adición in vitro de melatonina sobre los espermatozoides de morueco produce la disminución de marcadores de apoptosis, el aumento de la tasa de fertilidad, y la modulación del proceso de capacitación, con efectos capacitantes o descapacitantes en función de su concentración (33).

#### La melatonina en la criopreservación de semen ovino

La melatonina es un potente antioxidante con aplicaciones útiles en diversos campos. Debido a su capacidad de eliminar los radicales libres y mejorar las defensas antioxidantes celulares, la melatonina se puede utilizar en la criopreservación de semen para protegerlo contra el daño oxidativo. La melatonina protegería a los espermatozoides contra el daño inducido por el estrés oxidativo durante la crioconservación a través de varios mecanismos, incluyendo la eliminación directa del exceso de ROS, la estabilización de la integridad de la membrana, la mejora de la integridad y la función mitocondrial, la mejora de las actividades de las enzimas de defensa antioxidante, la inhibición de la apoptosis y la protección del ADN (22).

Así, la adición de melatonina en dosis seminales antes de la congelación mejora significativamente la motilidad de espermática y la integridad de la membrana, en conejo (34),

humano (35), toro (36). Además, en vacuno también se observa una mejora de los valores de integridad del acrosomal y de potencial de la membrana mitocondrial (36).

En la especie ovina en concreto, se han ensayado distintas concentraciones de melatonina (entre 1  $\mu$ M y 1 mM) para la criopreservación muestras seminales (37, 38, 39). En estos estudios se evidenció una reducción de la producción de superóxidos mitocondriales, junto con una mejora de la motilidad, la viabilidad, las concentraciones intracelulares de ATP y la integridad del ADN (37, 39).

Sin embargo, aunque hay resultados que indican que la melatonina ejerce efectos positivos durante la criopreservación, también hay resultados que indican que podría no ejercer ningún efecto beneficioso durante este proceso (39). Por lo tanto, es necesario dilucidar las funciones exactas de la melatonina en la criopreservación de semen ovino.

#### EL GEN DEL RECEPTOR DE MELATONINA 1A (MTNR1A) Y SU ASOCIACIÓN CON LA REPRODUCCIÓN ESTACIONAL

Como hemos visto, la melatonina puede ejercer muchas de sus funciones a través de su interacción con sus receptores específicos de membrana. Los receptores de melatonina son receptores acoplados a proteínas G que presentan siete dominios transmembrana, un dominio extracelular N-terminal y tres bucles extracelulares (40).

El gen del receptor de melatonina 1A (MNTR1A) presenta varios polimorfismos y parece jugar un papel clave en el control de la estacionalidad inducida por el fotoperíodo (41). Diferentes estudios en diversas razas ovinas han encontrado dos mutaciones silenciosas en las posiciones 606 y 612, detectables mediante el uso de dos enzimas de restricción, *Rsal* y *MnII*, respectivamente (42) y asociadas con la mayor o menor estacionalidad de sus portadores (43, 44). Sin embargo, otros autores no encontraron ninguna relación entre los polimorfismos del gen MNTR1A y la estacionalidad reproductiva en las ovejas de Ile-de France (44), lo que indicaría que el efecto de estos polimorfismos podría depender de la raza y/o de las condiciones ambientales. En las hembras de raza Rasa Aragonesa, se ha descrito que el alelo T del SNP606 se asocia a un mayor porcentaje de hembras cíclicas durante la estación no reproductiva (45), mientras que en los machos, el genotipo T/T para el polimorfismo *Rsal* y G/G para el polimorfismo *MnII* se relacionan con un adelanto de la actividad reproductiva de machos jóvenes nacidos en otoño o con un comportamiento reproductivo más intenso en machos adultos en primavera, durante la estación no reproductiva (46).

A pesar de estos estudios preliminares sobre el comportamiento sexual en machos ovinos, la mayoría de los estudios sobre la influencia de estos polimorfismos de MNTR1A en la estacionalidad ovina se han realizado en hembras, por los que se desconoce su efecto en machos ovinos, y en concreto, sobre su calidad seminal. Además, dado que la melatonina podría ejercer sus funciones crioprotectores a través de los receptores de melatonina, se desconoce si también podrían influir en el efecto de esta hormona durante la refrigeración y congelación de dosis seminales ovinas.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los espermatozoides ovinos, dado que tienen poco colesterol en su membrana, son especialmente susceptibles al daño por frío o cold-shock. Este daño por frío se manifiesta con cambios en la motilidad, inicio del proceso apoptótico y la capacitación y daño oxidativo (19).

Por otro lado, la melatonina es una hormona sintetizada principalmente en la glándula pineal y que está implicada en la regulación de muchos procesos fisiológicos, entre ellos la reproducción estacional de la especie ovina, a través del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (30). También está presente en el tracto reproductor masculino, donde tendría efectos directos sobre los espermatozoides (47). Por otro lado, es bien conocida por su papel antioxidante, por lo que puede ser añadida a los medios de criopreservación con el fin de proteger a los espermatozoides de los efectos del cold-shock (22).

La melatonina puede ejercer muchas de sus funciones a través de su interacción con receptores específicos, denominados MT1 y MT2 en mamíferos (26). El gen del receptor de melatonina 1A (MNTR1A) presenta varios polimorfismos, entre ellos dos mutaciones silenciosas en las posiciones 606 (*Rsal*) y 612 (*MnII*) que parece jugar un papel clave en el control de la estacionalidad inducida por el fotoperíodo en la especie ovina (48). Así, en la raza Rasa Aragonesa, el alelo T del SNP606 se asocia a un mayor porcentaje de hembras en celo durante la estación no reproductiva (45) y a un adelanto de la actividad reproductiva de machos jóvenes nacidos en otoño o con un comportamiento reproductivo más intenso en machos adultos en primavera, durante la estación no reproductiva (46). Sin embargo, se desconoce la posible influencia de este polimorfismo en la acción crioprotectora de la melatonina.

Por tanto, a la vista de los antecedentes expuestos, la **hipótesis** que se plantea en este trabajo es que el polimorfismo *Rsal* del gen MTNR1A podría influir en la respuesta de los espermatozoides a la adición de melatonina durante la criopreservación.

De este modo, el **objetivo principal** de este trabajo fue estudiar la influencia de los polimorfismos del gen MTNR1A en el efecto crioprotector de la melatonina exógena añadida en dosis seminales ovinas. Para ello, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Analizar el efecto de diferentes tratamientos térmicos (refrigeración y congelación) y la melatonina en los espermatozoides ovinos, con el fin de seleccionar el más adecuado para el desarrollo del objetivo principal del trabajo.
2. Estudiar el efecto de la melatonina durante la criopreservación de espermatozoides ovinos obtenidos de machos portadores de diferentes genotipos para el polimorfismo *Rsal* del gen MTNR1A.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### PROCESADO DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS

#### Obtención de las muestras seminales

El semen utilizado para realizar este trabajo se obtuvo a partir de seis moruecos adultos, previamente genotipados para el polimorfismo *RsaI* del gen MTNR1A (2 C/C, 2 C/T y 2 T/T), estabulados en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. El mantenimiento de estos animales, así como la obtención de muestras corrieron a cargo del personal del SEA. Durante la estación no reproductiva se obtuvieron dos eyaculados consecutivos por morueco, tras un periodo de abstinencia de 48 horas, usando el método de vagina artificial, pero se utilizaron sólo los segundos en base a resultados previos que demostraron que estos tenían mejores parámetros de calidad que los primeros (49). Las muestras seminales se mantuvieron a 37 °C hasta su uso.

Para la puesta a punto del protocolo de refrigeración y congelación, se trabajó con la mezcla de los segundos eyaculados de todos los machos para evitar diferencias individuales, pero tras la puesta a punto se trabajó con las muestras individuales para determinar si los espermatozoides de los machos portadores de cada genotipo responden de forma distinta a la melatonina durante los procesos de criopreservación.

#### Refrigeración, congelación y descongelación de las muestras

Con el objeto de estudiar la posible influencia de los polimorfismos del gen MNTR1A en el efecto crioprotector de la melatonina durante la refrigeración y congelación de dosis seminales ovinas, fue necesario realizar una puesta a punto previa con el fin de evaluar el efecto de los tratamientos de criopreservación y distintas concentraciones de melatonina sobre los espermatozoides ovinos.

En relación a la criopreservación, se evaluó tanto la refrigeración a 5 °C como la congelación con vapores de nitrógeno. Para ello, las muestras seminales se diluyeron en un medio comercial basado en lecitina de soja (Ovixcell<sup>®</sup>, IMV Technologies, Francia) hasta alcanzar una concentración final de  $4 \times 10^8$  células/ml (50). La refrigeración de las muestras espermáticas se realizó mediante una rampa de temperatura, de 35 a 5 °C, utilizando un baño termostatzado que permite una bajada controlada de la temperatura de -1 °C /min. Una vez alcanzada dicha temperatura, se procedió a una fase de estabilización, en la que las muestras permanecieron a 5 °C durante otros 30 minutos más.

Para la congelación espermática, las muestras se sometieron al mismo proceso de refrigeración anterior para después ser introducidas en pajuelas de 250 µl que se congelaron con vapores de nitrógeno a -120 °C. Una vez congeladas, las pajuelas se mantuvieron en un tanque de nitrógeno líquido hasta su evaluación post-descongelación.

En ambos casos se evaluaron dos concentraciones distintas de melatonina, una concentración alta (1 mM) y una baja (1 µM), elegidas en base a estudios previos (3,4). La melatonina se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) y PBS (del inglés *phosphate-buffered saline*: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7 mM, pH 7,4) y se añadió a las muestras seminales previamente a su congelación, para conseguir unas concentraciones finales de 1 µM y 1 mM, respectivamente. La concentración final de DMSO en todas las muestras fue del 0,1 % (v/v). A

las muestras control sin melatonina se les añadió la misma concentración de DMSO que a las muestras con melatonina, para tener en cuenta un posible efecto de dicho compuesto.

Por último, la descongelación de las muestras se realizó introduciendo las pajuelas durante 35 segundos en un baño termostático a 37 °C.

## EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS

### Cálculo de la concentración espermática

La determinación de la concentración de las muestras espermáticas se calculó usando una cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania), tras una dilución 1/2000 del semen fresco con agua. Se colocó una gota de 8 µl en la cámara y se observó con el objetivo 10x en un microscopio de contraste de fases. Se contaron las células existentes en 16 cuadrículas de la cámara y se aplicó la fórmula:

$$C = n^{\circ} \text{ de espermatozoides contados} \times 10^4 \times \frac{1}{\text{dilución}} = \text{espermatozoides/ml}$$

### Análisis de la motilidad espermática

La determinación de la motilidad espermática se realizó utilizando un sistema automatizado de análisis espermático asistido por ordenador (CASA, del inglés *Computer-assisted Sperm Analysis*) que utiliza un software libre de código abierto desarrollado por nuestro grupo de investigación, denominado OpenCASA (52). Las muestras seminales se diluyeron 1/100 en un medio de análisis espermático compuesto por sacarosa 0,25 M, EGTA 100 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 mM, glucosa 50 mM, HEPES 100 mM y KOH 20 mM.

Para proceder al análisis, se depositó una gota de 6 µl de la dilución espermática en un portaobjetos y se analizó en un microscopio de contraste de fases con objetivo 10x conectado a un ordenador y a una cámara de video capaz de grabar 60 fotogramas por segundo durante un segundo. Se analizaron al menos cinco campos por gota. El programa OpenCASA clasifica los espermatozoides en función de su movimiento, proporcionando, entre otros datos, valores de motilidad total (MT, porcentaje de espermatozoides móviles) y de motilidad progresiva (MP, porcentaje de espermatozoides que se mueven siguiendo una trayectoria recta).

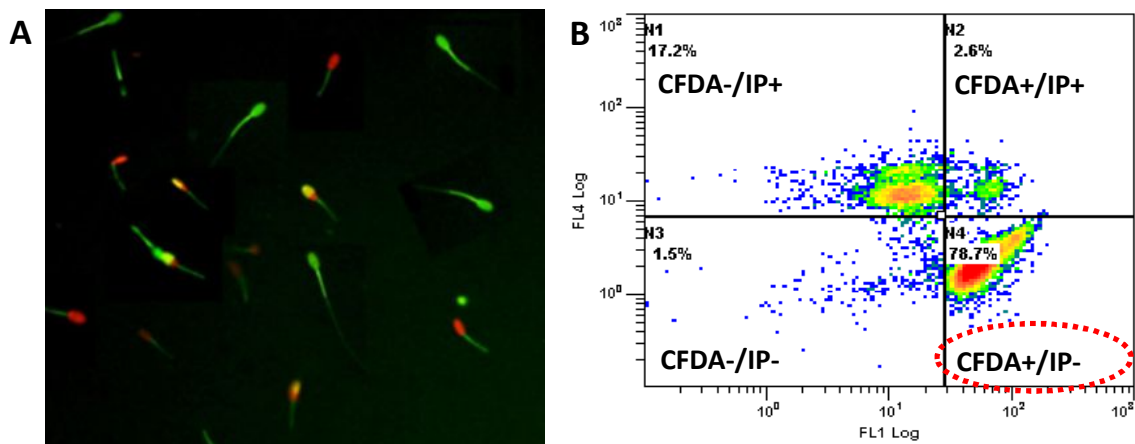
### Estudio de la viabilidad celular (integridad de la membrana plasmática)

La viabilidad, entendida como la integridad de la membrana espermática, se valoró mediante el método descrito por Harrison y Vickers en 1990 (53), conocido como la doble tinción de diacetato de carboxifluoresceína/ioduro de propidio (CFDA/IP). Esta técnica se basa en la distinta coloración fluorescente que presentan los espermatozoides tras su incubación con estos dos compuestos en función de su viabilidad. Se consideraron viables los espermatozoides teñidos de color verde, puesto que al tener su membrana íntegra presentan impermeabilidad al ioduro de propidio y sus esterasas hidrolizan el diacetato de carboxifluoresceína, que es incoloro, a carboxifluoresceína, de color verde. Por el contrario, los espermatozoides de coloración roja se consideraron no viables, dado que la membrana dañada es permeable al ioduro de propidio, el cual penetra en el interior de la célula y se une al ADN generando el color rojo (Figura 1A).

Las muestras seminales se diluyeron en el medio descrito anteriormente, a una concentración final de  $5 \times 10^6$  células/ml a la que se adicionaron 3 µl de diacetato de carboxifluoresceína (Merck

KGaA, Darmstadt, Alemania, 10  $\mu$ M en DMSO), 3  $\mu$ l de yoduro de propidio (Merck KGaA, 7,3  $\mu$ M en agua destilada), y 5  $\mu$ l de formaldehído (1,7 mM en agua destilada) para la fijación de las células. Seguidamente las muestras se incubaron en estufa a 37 °C en oscuridad durante 15 minutos.

Trascurrido el tiempo, las muestras se analizaron mediante un citómetro de flujo Beckman Coulter FC 500 (Beckman Coulter Inc, Fullerton, California, EEUU), equipado con dos láseres de excitación (laser de Argón de 488 nm refrigerado por aire, y laser rojo de estado sólido de 633 nm) y cinco filtros de absorbancia (FL1-525, FL2-575, FL3-610, FL4-675 and FL5-755;  $\pm$  5 nm). La fluorescencia se detectó empleando los filtros FL1-525  $\pm$  5 nm (para CFDA) y FL4-675  $\pm$  5 nm (para IP). Se analizaron un total de 20.000 eventos, con una media de 500-1.000 eventos/segundo y se diferenciaron cuatro subpoblaciones de espermatozoides, considerándose los IP-/CFDA+ como viables (Figura 1B).



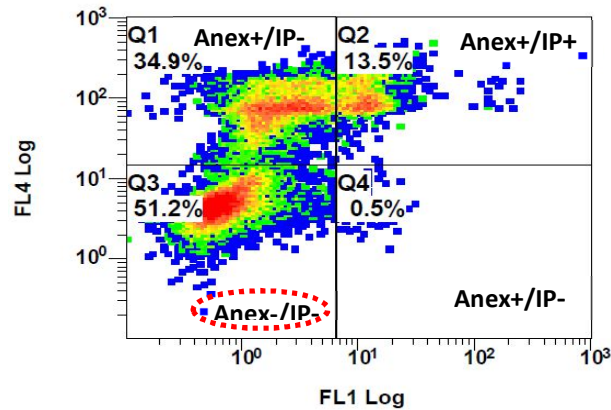
**Figura 1.A)** Imagen representativa de la doble tinción de los espermatozoides ovinos con diacetato de carboxifluoresceína/ yoduro de propidio (CFDA/IP), evaluada mediante microscopía de fluorescencia con filtro B-2A (filtro de excitación 450-490 nm) y aumento 400x **B)** Imagen representativa de la integridad de membrana evaluada por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

### Determinación de la inversión de fosfatidilserina

La fosfatidilserina (FS) es un fosfolípido que en una situación normal se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática. En procesos apoptóticos se transloca a la cara externa para que la célula sea reconocida por los fagocitos y ser así eliminada. Este suceso puede ser evaluado utilizando una proteína caracterizada por su alta afinidad por la FS, denominada anexina V (Anex), y que puede obtenerse de forma comercial en combinación con cualquier colorante fluorescente para su detección mediante un microscopio de fluorescencia o un citómetro de flujo. En este trabajo se usó Annexin V (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts Estados Unidos) para marcar aquellas células que presentasen inversión de FS con fluorescencia verde. Además, se combinó con yoduro de propidio (IP), que permite diferenciar las células que presentan membrana íntegra de las que tienen la membrana dañada (fluorescencia roja).

Para proceder con el análisis, se diluyeron las muestras en el tampón facilitado por la casa comercial (Binding Buffer Apoptosis Detection Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts Estados Unidos) hasta alcanzar una concentración de  $4 \times 10^6$  células/ml. Posteriormente se incubaron a 37 °C en oscuridad durante 15 minutos con 2  $\mu$ l de FITC-Annexin

V y 3  $\mu$ L de IP. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo, empleando los filtros FL1-525  $\pm$  5 nm (para anexina) y FL4-675  $\pm$  5 nm (para IP). De esta forma, podemos distinguir cuatro poblaciones diferentes en nuestra muestra: células no viables con inversión de FS (Anex+/IP+), células viables con inversión de la (Anex+/IP-), células no viables sin inversión de FS (Anex-/IP+) y células viables sin inversión de FS (Anex-/IP-). Esta última población es la que se evaluó en este trabajo (Figura 2).



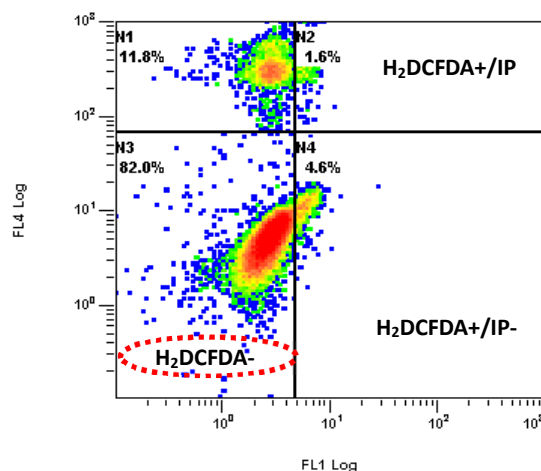
**Figura 2.** Imagen representativa de la evaluación de la translocación de fosfatidilserina en la membrana espermática ovina, evaluada por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

#### Estudio de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) fueron evaluados con el colorante 2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA), capaz de atravesar la membrana plasmática del espermatozoide y penetrar en el interior celular para ser hidrolizado por esterasas intracelulares a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF), un compuesto no permeable y no fluorescente, que posteriormente es oxidado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diclorofluoresceína (DCF), que emite fluorescencia a 530 nm tras su excitación a 488 nm (54). El H<sub>2</sub>DCFDA se utilizó en combinación con yoduro de propidio (IP), el cual nos permite distinguir entre células viables y no viables.

Para proceder con la evaluación, las muestras se diluyeron para alcanzar una concentración de 5 x 10<sup>6</sup> células/ml y se incubaron 15 minutos a 37 °C en oscuridad con 5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>DCFDA 10  $\mu$ M, 3  $\mu$ l de IP 1,5 mM y 5  $\mu$ l de formaldehído al 0,5 % (v/v) en agua MilliQ para la fijación celular. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se analizaron por citometría de flujo empleando los filtros FL1-525  $\pm$  5 nm (para H<sub>2</sub>DCFDA) y FL4-675  $\pm$  5 nm (para IP). En este trabajo

sólo se tuvieron en cuenta las células H<sub>2</sub>DCFDA-/IP-, correspondientes a espermatozoides viables con bajos niveles de ROS (Figura 3).



**Figura 3.** Imagen representativa de las poblaciones obtenidas en la evaluación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

#### Evaluación del estado de capacitación mediante la tinción con clorotetraciclina

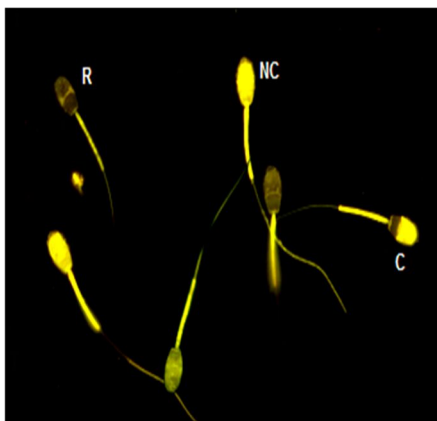
La clorotetraciclina (CTC) es un antibiótico fluorescente que al penetrar en la célula espermática se une al calcio libre. Esto da lugar a patrones característicos de tinción en función de la distribución intracelular de ese catión, que permiten hacer una distinción entre células no capacitadas, capacitadas y reaccionadas (55). En este trabajo se utilizó una versión modificada del protocolo descrito por Ward y Storey (56) y validada para semen ovino por nuestro grupo de investigación (14).

La solución de clorotetraciclina se preparó el mismo día del experimento a una concentración de 750  $\mu$ M en una solución tampón que contenía Tris 20 mM, NaCl 130 mM y cisteína 5  $\mu$ M, (esterilizada por un filtración en un filtro de 0,22  $\mu$ m y pH a 7,8).

Para preparar la tinción celular se mezclaron 18  $\mu$ l de cada muestra (diluídas a una concentración de  $8 \times 10^7$  células/ml en el medio de análisis espermático descrito anteriormente) con 20  $\mu$ l de la solución de CTC y se fijaron con 5  $\mu$ l de una solución de paraformaldehído al 1,25% (p/v) en tampón Tris-HCl 0,5M, pH 7,4. Las muestras se incubaron a 4 °C durante 30 minutos en oscuridad. Para la evaluación de las muestras, se depositó una gota de 10  $\mu$ l de cada muestra en un portaobjetos a la que se le añadieron 4  $\mu$ l de trietilendiamina (DABCO) 0,22 M diluido en glicerol:PBS (9:1 v/v) para conservar la fluorescencia. Después, se colocó un cubreobjetos y se selló la preparación con esmalte, siempre realizando estos procesos protegidos de la luz.

Las muestras fueron evaluadas a 1000x aumentos con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E-400, Nikon Corporation, Kanagawa, Japón) equipado con un filtro V-2A y usando un objetivo de inmersión. Se evaluaron 200 espermatozoides por muestra y se clasificaron en tres tipos distintos según su patrón de tinción (Fig. 4): no capacitados (NC, distribución de la fluorescencia en la cabeza, con o sin una banda ecuatorial brillante), capacitados (C, con fluorescencia en la porción anterior de la cabeza) y células con el acrosoma reaccionado (R, sin fluorescencia en la cabeza).





**Figura 4.** Espermatozoides ovinos teñidos con clorotetraciclina (CTC) y visualizados con microscopía de fluorescencia con filtro V-2A y aumento 1000x. Se pueden distinguir espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y reaccionados (R).

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se muestran como la media  $\pm$  S.E.M (error estándar de la media) del número de muestras indicadas para cada caso. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el test estadístico de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) con el software GraphPad Prism (v 8.01; GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### EFFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA DURANTE LA REFRIGERACIÓN Y CONGELACIÓN DE SEMEN

Como primer objetivo de este trabajo, se analizaron las alteraciones provocadas en los espermatozoides ovinos por los diferentes tratamientos térmicos, refrigeración o congelación, con el fin de seleccionar el más adecuado para el desarrollo del objetivo principal del trabajo, además del efecto crioprotector de la melatonina durante este proceso.

Durante la refrigeración, como se puede observar en la tabla 1, el descenso controlado de la temperatura (-1 °C/min) hasta 5 °C, provocó una disminución ( $P < 0,001$ ) en los porcentajes de espermatozoides mótils totales y espermatozoides viables sin inversión de fosfatidilserina en todas las muestras refrigeradas, tanto control como con melatonina (1 mM y 1  $\mu$ M), con respecto a la muestra inicial, junto con un aumento de la motilidad progresiva ( $P < 0,001$ ). También se produjo un descenso ( $P < 0,001$ ) del porcentaje de espermatozoides no capacitados, con el consiguiente aumento del porcentaje de espermatozoides capacitados. La viabilidad y el porcentaje de espermatozoides viables con bajos niveles de ROS no se vieron afectados.

**Tabla 1.** Efecto de la refrigeración sobre la funcionalidad espermática en muestras sin tratamiento térmico (inicial), refrigeradas sin (control) o con diferentes concentraciones de melatonina (1 mM ó 1  $\mu$ M) añadidas previamente a la refrigeración. Los resultados se muestran como media  $\pm$  error estándar del % de espermatozoides mótils totales (M.T.), mótils progresivos (M.P.), con membrana íntegra (viabilidad), viables con bajos niveles de ROS (ROS-), viables sin inversión de fosfatidilserina (Anex-), no capacitados (NC), capacitados (C) y reaccionados (R), de  $n = 6$ . \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  indican diferencias significativas con respecto a la muestra inicial ###  $P < 0,001$ ; ##  $P < 0,01$ ; #  $P < 0,05$ ; indican diferencias significativas entre las muestras refrigeradas con y sin melatonina.

	Muestra inicial	Refrigerado control	Refrigerado 1 mM	Refrigerado 1 $\mu$ M
<b>M.T.</b>	88,402 $\pm$ 3,532	64,888 $\pm$ 11,055***	67,392 $\pm$ 10,038***	62,431 $\pm$ 11,234***
<b>M.P.</b>	13,140 $\pm$ 3,340	27,277 $\pm$ 5,089***	33,888 $\pm$ 5,964***#	21,397 $\pm$ 4,964***#
<b>Viabilidad</b>	80,067 $\pm$ 2,612	79,440 $\pm$ 2,958	80,940 $\pm$ 3,041	75,480 $\pm$ 4,223
<b>ROS-</b>	64,217 $\pm$ 12,393	60,850 $\pm$ 11,657	63,283 $\pm$ 12,216	61,583 $\pm$ 10,724
<b>Anex-</b>	49,083 $\pm$ 9,234	23,700 $\pm$ 12,825***	27,750 $\pm$ 11,369***	20,183 $\pm$ 9,550***
<b>NC</b>	95,833 $\pm$ 0,980	89,167 $\pm$ 2,713***	88,333 $\pm$ 3,509***	88,333 $\pm$ 2,496***
<b>C</b>	3,333 $\pm$ 0,989	9,167 $\pm$ 2,626***	10,500 $\pm$ 3,243***	10,167 $\pm$ 2,600***
<b>R</b>	0,833 $\pm$ 0,401	1,500 $\pm$ 0,619	1,000 $\pm$ 0,365	0,833 $\pm$ 0,167

Por su parte, la presencia de melatonina durante la refrigeración sólo afectó a la motilidad progresiva, mejorándola con respecto al control cuando se añadió a alta concentración (1 mM,  $P < 0,05$ ), y disminuyéndola con la concentración más baja (1  $\mu$ M,  $P < 0,05$ ).

Los resultados obtenidos con la concentración de melatonina 1 mM concuerdan con los obtenidos por Rateb *et al.* (2) con una concentración ligeramente menor a la utilizada en este trabajo (0,3 mM), y en los que se observó un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides mótils progresivos en las muestras refrigeradas con melatonina tanto antes

del proceso de refrigeración como después de 24 y 48 horas. Sin embargo, estos resultados con los obtenidos en otros trabajos del grupo (datos no publicados, 51) en los que no se vieron diferencias en la motilidad progresiva de los espermatozoides refrigerados con distintas concentraciones de melatonina (100 pM, 10 nM y 1 µM) ni en la viabilidad, pero sí en el estado de capacitación. Por el contrario, un estudio de Bhalothia *et al.* reveló que una concentración de melatonina 1 mM disminuye de la motilidad progresiva, viabilidad y nivel de especies reactivas (ROS), durante una refrigeración a 4 °C durante 72 horas (57).

Posiblemente, las diferencias en la forma de refrigeración (con o sin rampa de temperatura controlada), el tiempo que los espermatozoides permanecen a 5 °C o la estacionalidad reproductiva característica de los moruecos podrían explicar la diferencia con esos resultados previos (51, 57).

En el tratamiento de congelación (Tabla 2), las muestras se sometieron al mismo proceso de refrigeración anterior para después ser empajueladas y congeladas con vapores de nitrógeno. Tras este proceso se observó una disminución drástica ( $P < 0,001$ ) de todos los parámetros analizados en todas muestras a excepción de la motilidad progresiva en las muestras con concentración alta y baja de melatonina, y del porcentaje de espermatozoides reaccionados. También se produjo una bajada ( $P < 0,001$ ) en todos los parámetros, a excepción del porcentaje de espermatozoides reaccionados, en comparación con la muestra refrigerada.

**Tabla 2.** Efecto de diferentes tratamientos de criopreservación (refrigeración y congelación) sobre la funcionalidad espermática en muestras sin tratamiento térmico (inicial), refrigeradas y congeladas sin (control) o con diferentes concentraciones de melatonina (1 mM ó 1 µM) añadidas previamente. Los resultados se muestran como media ± error estándar del % de espermatozoides móviles totales (M.T.), móviles progresivos (M.P.), con membrana íntegra (viabilidad), viables con bajos niveles de ROS (ROS-), viables sin inversión de fosfatidilserina (Anex-), no capacitados (NC), capacitados (C) y reaccionados (R, según tinción con CTC), de  $n = 5$ . \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  indican diferencias significativas con respecto a la muestra inicial, ◆◆◆  $P < 0,001$  y ◆◆  $P < 0,01$  indican diferencias significativas con respecto a la muestra refrigerada y ###  $P < 0,001$ ; ##  $P < 0,01$ ; #  $P < 0,05$  indica diferencias entre las muestras congeladas con y sin melatonina.

	Muestra inicial	Muestra refrigerada	Congelado control	Congelado 1 mM	Congelado 1 µM
<b>M.T.</b>	88,402± 3,532	64,888± 11,055***	29,887± 11,427***◆◆◆	17,01± 2,344***◆◆◆###	28,536± 11,275***◆◆◆
<b>M.P.</b>	13,140± 3,340	27,277± 5,089***	29,998± 15,513***◆◆◆	14,325± 9,377◆◆◆###	16,930± 7,615◆◆◆###
<b>Viabilidad</b>	80,067± 2,612	79,440± 2,958	8,800± 3,663***◆◆◆	6,560± 1,897***◆◆◆	7,400± 3,078***◆◆◆
<b>ROS-</b>	64,217± 12,393	60,850± 11,657	8,540± 2,620***◆◆◆	6,960± 1,264***◆◆◆	7,940± 2,454***◆◆◆
<b>Anex-</b>	49,083± 9,234	23,700± 12,825***	4,740± 2,962***◆◆◆	1,500± 0,406***◆◆◆###	2,360± 1,716***◆◆◆#
<b>NC</b>	95,833±0.98 0	89,167±2.713***	81,000±3,376** *◆◆◆	81,600±2,421** *◆◆◆	78,200±2,557** *◆◆◆
<b>C</b>	3,333±0,989	9,167±2,626***	17,200±2,800** *◆◆	17,000±2,236** *◆◆◆	19,200±2,396** *◆◆◆
<b>R</b>	0,833±0,401	1,500±0,619	1,800±0,917	1,400±0,400	2,600±1,030#

La adición de melatonina durante el proceso de congelación no sólo no evitó los daños producidos por este proceso, sino que incluso empeoró la motilidad total ( $P < 0,001$ ), el porcentaje de espermatozoides viables sin inversión de fosfatidilserina ( $P < 0,01$ ) y el porcentaje de espermatozoides reaccionados ( $P < 0,05$ ). Aun así, ambas concentraciones de melatonina evitaron el aumento del porcentaje de espermatozoides móviles progresivos producidos por la criopreservación, de forma que las muestras congeladas con esta hormona tenían unos porcentajes similares a los de la muestra inicial.

Numerosos estudios evidencian cambios en la viabilidad, motilidad total y motilidad progresiva en muestras seminales ovinas sometidas a un proceso de congelación. Por ejemplo, en un estudio de Pool et al, la melatonina a concentración 0,1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  mejoró la motilidad total post-congelación en comparación con el control. Sin embargo, esto no se correspondió con una mejora en la viabilidad o la motilidad progresiva (37). Concentraciones mayores de melatonina (1 mM) parecen proteger a los espermatozoides ovinos del daño a la congelación, mejorando parámetros como la viabilidad y la motilidad (38), a diferencia de lo observado en este trabajo. Este efecto beneficioso de la melatonina observado por Succu *et al.* (5) podría deberse a que la melatonina es capaz de optimizar la distribución de las enzimas OXPHOS y aumentar las actividades de los complejos respiratorios (58).

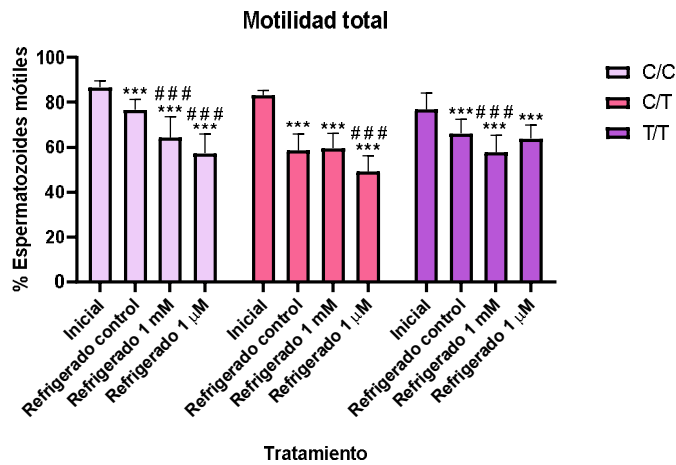
En general, a la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que la refrigeración hasta los 5 °C causa menos daño en los espermatozoides ovinos que los tratamientos de congelación con vapores de nitrógeno, como habían demostrado trabajos previos (2,4,59). Además, en nuestras condiciones experimentales, la presencia de melatonina durante la congelación parece ser más perjudicial que beneficiosa, al contrario que en trabajos previos (2,4,59).

Por tanto, debido a los resultados obtenidos durante el proceso de congelación, se decidió investigar el efecto del genotipo del receptor de melatonina 1 sobre la capacidad protectora de la melatonina únicamente en muestras refrigeradas.

## INFLUENCIA DEL GENOTIPO PARA EL RECEPTOR DE MELATONINA 1 (MTNR1A) EN LA ACCIÓN PROTECTORA DE LA MELATONINA SOBRE LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA DURANTE LA REFRIGERACIÓN A 5 °C

### Efecto sobre la motilidad

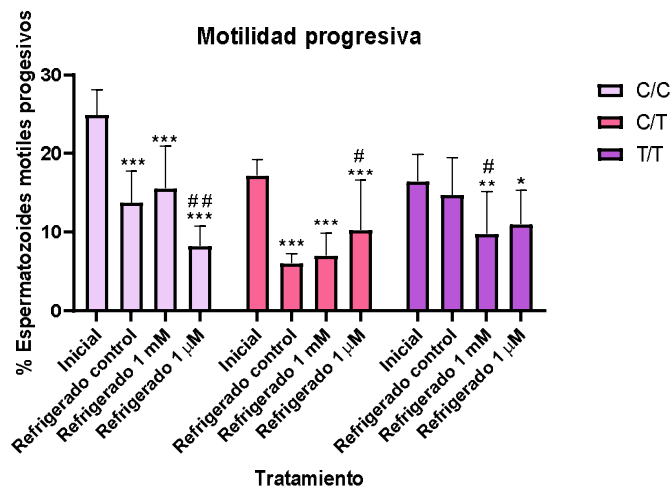
Como se observa en la figura 5, el proceso de refrigeración produjo disminución significativa de la motilidad total ( $P < 0,001$ ) con respecto de las muestras iniciales en todos los genotipos analizados, al igual que observamos en el apartado anterior.



**Figura 5.** Porcentaje de espermatozoides mótils totales en muestras espermáticas inicial y refrigeradas sin (control) o con diferentes concentraciones de melatonina (1 mM ó 1 μM), obtenidas de machos portadores de los genotipos C/C, C/T y T/T para el receptor de melatonina MT1 (MTRA1). Los resultados se muestran como media ± SEM de n=6. \*\*\* P<0,001 comparando con la muestra de inicial; ### P<0,001 comparando con la muestra refrigerada control.

Por otro lado, la adición de melatonina antes de la refrigeración no mejoró, sino que empeoró la motilidad total en las muestras tratadas con la concentración baja de melatonina para los genotipos C/T y C/C y la concentración alta en el caso de los genotipos C/C y T/T (P<0,001).

En cuanto a la motilidad progresiva (Figura 6), se observó una disminución significativa de este parámetro únicamente en las muestras refrigeradas de los genotipos C/T y C/C respecto a la muestra inicial (P<0,001). Además, la adición de melatonina produjo, por un lado, un aumento (P<0,05) de la motilidad progresiva en las muestras del genotipo C/T (1 μM), mientras que disminuyó en las del genotipo C/C (1 μM, P<0,01) y T/T (1 mM, P<0,05).



**Figura 6.** Porcentaje de espermatozoides mótils progresivos en muestras espermáticas inicial y refrigeradas sin (control) o con diferentes concentraciones de melatonina (1 mM ó 1 μM), obtenidas de machos portadores de los genotipos C/C, C/T y T/T para el receptor de melatonina MT1 (MTRA1). Los resultados se muestran como media ± SEM de n=6. \*\*\* P<0,001, \*\* P<0,01 y \*P<0,05 comparando con la muestra inicial; ## P<0,01 y # P<0,05 comparando con la muestra refrigerada control.

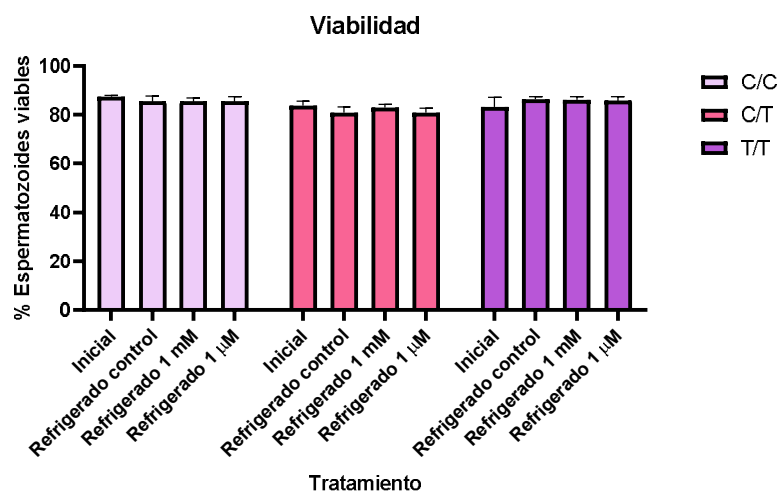
Pese a que estos resultados sugieren que no existe una relación clara entre el genotipo y la respuesta a la adición de melatonina en lo que concierne a la motilidad, el receptor MT1 podría estar relacionado con la modulación de la motilidad espermática en la especie ovina ya que, tal y como demostró nuestro grupo de investigación, el receptor MT1 se encuentra presente en el cuello y en la pieza intermedia del flagelo (60) donde se encuentran las mitocondrias que proporcionan la energía necesaria para la motilidad. El hecho de que ambas concentraciones de melatonina ensayadas disminuya la motilidad los espermatozoides con genotipo C/C, y que únicamente la baja lo sea para C/T y la alta para T/T sugieren una distinta sensibilidad a esta hormona en función del genotipo.

Esta distinta respuesta a la melatonina también la observamos en la motilidad progresiva. En este caso, la disminución en la motilidad progresiva suele estar asociada a un proceso de hiperactivación espermática, un cambio en el patrón de motilidad que sufre el espermatozoide asociado a la capacitación. Se ha descrito que la melatonina puede potenciar la hiperactivación espermática a través del receptor MT1 en hámster (61). En este caso, el hecho de que los genotipos C/C y T/T muestren una disminución de la motilidad progresiva con concentraciones distintas de melatonina, mientras que en genotipo C/T este parámetro aumente, sugiere que el polimorfismo *RsaI*, aunque no implique un cambio de aminoácido (62), de alguna manera podría afectar a la afinidad del receptor por la melatonina lo que explicaría las distintas respuestas con distinta concentración de esta hormona, e incluso efectos opuestos.

#### Efecto sobre la integridad de membrana

Tal y como se observa en la figura 7, el descenso en la viabilidad, entendida como integridad de membrana plasmática, producido por la refrigeración a 5 °C no fue significativo en ninguna de las muestras para ninguno de los genotipos. Estos resultados contrastan a los obtenidos en otros trabajos, en los que sí se vio que la refrigeración provocaba una disminución de la viabilidad, tanto en ausencia como en presencia de melatonina a una concentración 0,3 mM tras 24 y 48 horas de refrigeración (2) y otros en los que la adición de melatonina de concentración 1 mM mejoró parámetros como la viabilidad y la motilidad (63).

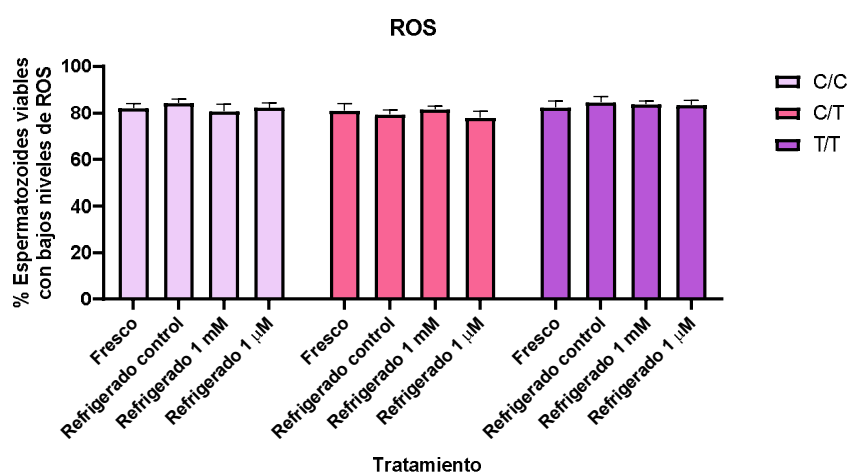
En nuestro caso, los espermatozoides fueron mantenidos tan solo durante 30 minutos a 5 °C por lo que es posible que no fuese tiempo suficiente para observar cambios en la viabilidad ni la posible implicación del genotipo del receptor en la respuesta a la adición de melatonina.



**Figura 7.** Porcentaje de espermatozoides viables en muestras espermáticas inicial y refrigeradas sin (control) o con diferentes concentraciones de melatonina (1 mM ó 1 μM), obtenidas de machos portadores de los genotipos C/C, C/T y T/T para el receptor de melatonina MT1 (MTRA1). Los resultados se muestran como media ± SEM de n=6.

### Efecto sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)

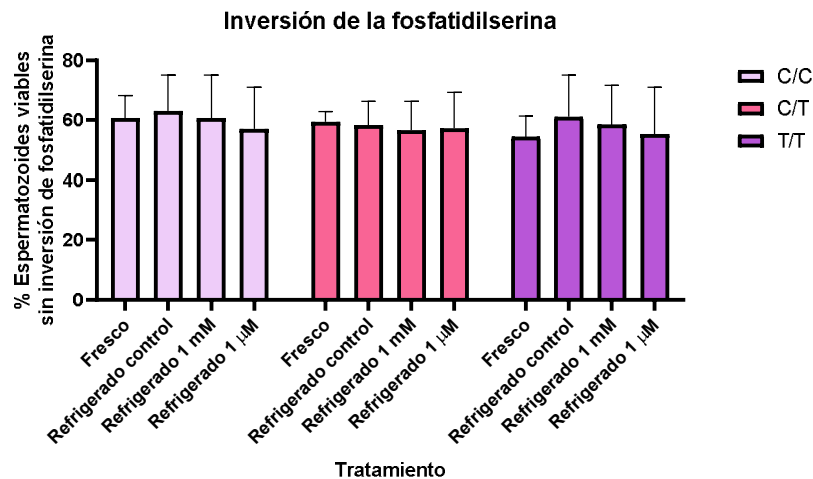
Al evaluar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidos por la refrigeración a 5 °C tampoco se observaron cambios significativos en ninguna de las muestras para ninguno de los genotipos (Figura 8), por tanto, no se puede concluir que la melatonina tenga un efecto protector frente al estrés oxidativo en espermatozoides refrigerados durante 30 minutos. Probablemente sería necesario aumentar el tiempo que los espermatozoides permanecen en refrigeración para observar algún efecto, y también para estudiar la posible implicación del receptor MT1 en el posible papel antioxidante de la melatonina. Aunque la melatonina ejerce su acción antioxidante directamente atravesando la membrana plasmática (64), también puede hacerlo indirectamente uniéndose a sus receptores, lo que desencadena la fosforilación de la AMPK (proteína quinasa activada por AMP) y la consecuente activación de las enzimas de defensa antioxidante (34).



**Figura 8.** Porcentaje de espermatozoides viables sin ROS en muestras espermáticas inicial y refrigeradas sin (control) o con diferentes concentraciones de melatonina (1 mM ó 1 μM), obtenidas de machos portadores de los genotipos C/C, C/T y T/T para el receptor de melatonina MT1 (MTRA1). Los resultados se muestran como media ± SEM de n=5.

### Efecto sobre la inversión de la fosfatidilserina

De nuevo, como se aprecia en la figura 9, cuando se comparó entre las muestras refrigeradas y sin refrigerar la inversión de la fosfatidilserina, no se percibieron efectos significativos en ninguna de las muestras para ninguno de los genotipos. Estos resultados contrastan con los obtenidos en el objetivo 1 de este trabajo, en el que la refrigeración produjo un descenso del porcentaje de espermatozoides vivos sin inversión de la fosfatidilserina, aunque en ese caso la adición de melatonina tampoco produjo ningún efecto beneficioso. Dado que los experimentos de ambos objetivos se hicieron en épocas distintas, es posible que esto influya en la susceptibilidad de los espermatozoides al cold-shock (3).

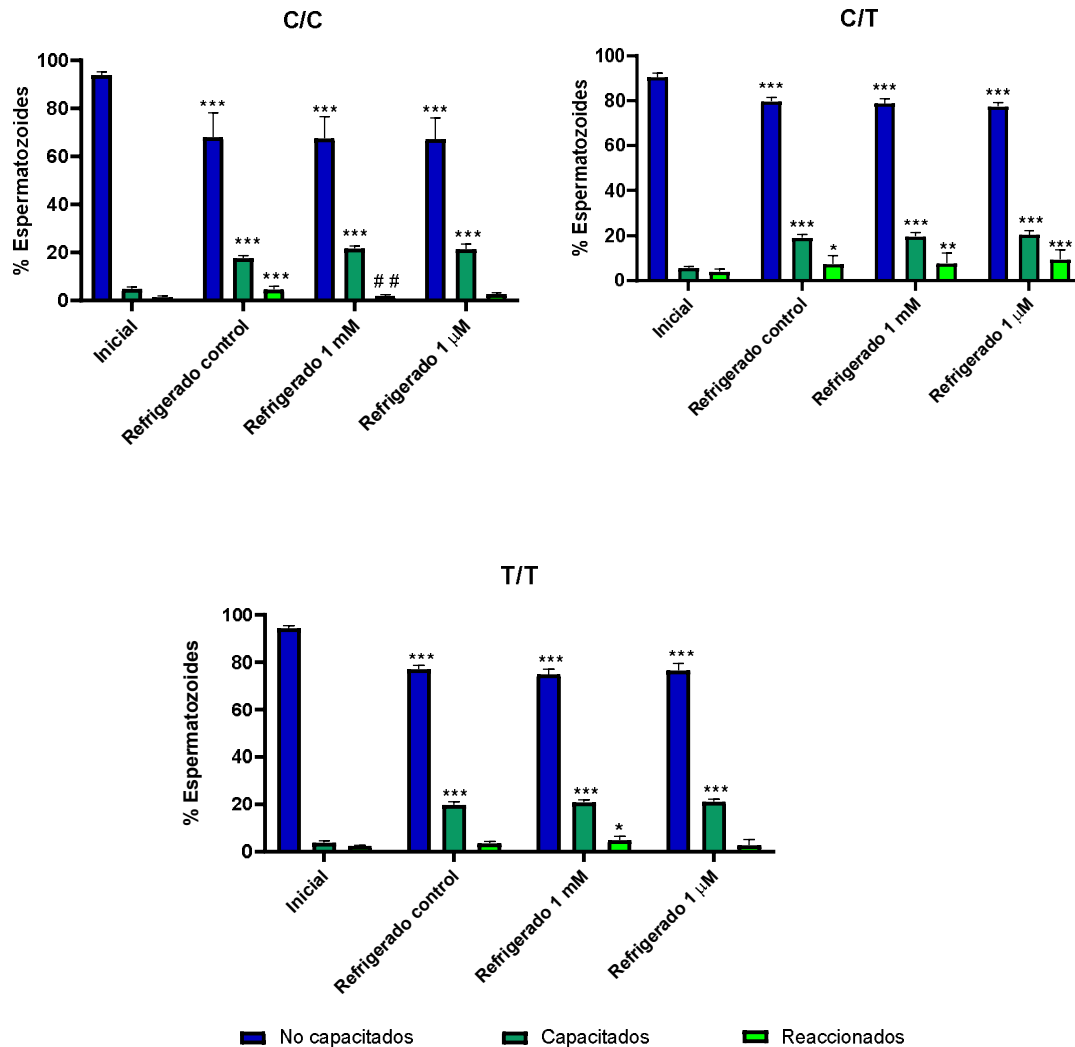


**Figura 9.** Porcentaje de espermatozoides viables sin inversión de la fosfatidilserina (IP-/Annexin-V -) en muestras espermáticas inicial y refrigeradas sin (control) o con diferentes concentraciones de melatonina (1 mM ó 1 μM), obtenidas de machos portadores de los genotipos C/C, C/T y T/T para el receptor de melatonina MT1 (MTRA1). Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM de n=4.

### Efecto sobre la capacitación

Finalmente, al evaluar el estado de capacitación mediante la tinción con CTC (Figura 10) se observó un claro efecto criocapacitante del proceso de refrigeración, producido por el cold-shock, tal y como se había observado previamente (65,17). En concreto, se vio una disminución ( $p < 0,001$ ) en el porcentaje de espermatozoides no capacitados en todos los genotipos, pero sobre todo en el genotipo C/C, lo que sugeriría que los espermatozoides de machos portadores de este genotipo podrían tener más sensibilidad a los procesos de criopreservación. Sin embargo, la adición de melatonina no evitó el proceso de criocapacitación en ninguno de los genotipos, y únicamente se observó una disminución del porcentaje de espermatozoides reaccionados con la concentración 1 mM en espermatozoides C/C.





**Figura 10.** Porcentaje de espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados en muestras sin refrigerar (fresco) y refrigeradas sin (control) o con diferentes dosis de melatonina (1 mM ó 1 μM) obtenidas de machos portadores de los genotipos C/C, C/T y T/T para el receptor de melatonina MT1 (MTRA1). Los resultados se muestran como media ± SEM, n=6. \*\*\* P<0,001, \*\*P<0,01 y \*P<0,05 comparando con la muestra inicial, ## P<0,01 comparando con la muestra control.

Trabajos previos habían demostrado el efecto modulador de la melatonina sobre la capacitación espermática (33), si bien esos estudios se habían realizado en condiciones capacitantes (39 °C, 5% CO<sub>2</sub> y 100% humedad) y no en condiciones de refrigeración. Por otro lado, en un trabajo realizado con una refrigeración brusca de las muestras a 5 °C en baño de hielo durante 10 minutos, sí se observó que la adición de melatonina parecía tener un efecto protector contra la criocapacitación (51), fenómeno que no se observa aquí tal vez porque las condiciones de refrigeración son distintas (rampa controlada de temperatura), por lo que sería necesario realizar más experimentos variando las condiciones de refrigeración para poder evidenciar un posible efecto del genotipo. Además, la falta de diferencias entre genotipos del receptor MT1 a la respuesta a la melatonina también podría ser debida a que no es el receptor MT1, sino el MT2, el que regula el proceso de capacitación espermática ovina, como sugiere un trabajo anterior de nuestro grupo (47).

## CONCLUSIONES

- 1) La refrigeración hasta los 5 °C causa menos daño en los espermatozoides ovinos que los tratamientos de congelación con vapores de nitrógeno.
- 2) La presencia de melatonina durante la congelación parece ser más perjudicial que beneficiosa para los espermatozoides ovinos.
- 3) El polimorfismo *RsaI* del receptor de melatonina 1A no influye en la capacidad crioprotectora de la melatonina al no observarse mejoras significativas en la motilidad, viabilidad, los niveles de especies reactivas de oxígeno ni en la inversión de fosfatidilserina en las muestras refrigeradas para ningún genotipo.
- 4) La presencia de melatonina en el medio de refrigeración disminuyó la motilidad total y progresiva, con una respuesta diferencial en función del polimorfismo *RsaI* , lo que sugiere una distinta sensibilidad a esta hormona de los espermatozoides ovinos en función del genotipo.
- 5) El genotipo C/C fue el más sensible a la criocapacitación, al mostrar un mayor descenso del porcentaje de espermatozoides no capacitados tras la refrigeración.

## CONCLUSIONS

- 1) Freezing to 5 °C causes less damage to ram sperm cells than cooling treatments with nitrogen vapors.
- 2) The presence of melatonin during freezing appears to be more harmful than beneficial to ram sperm.
- 3) The genotype for the *RsaI* polymorphism of the melatonin receptor 1A does not influence the cryoprotective capacity of melatonin because no changes in viability, levels of reactive oxygen species or phosphatidylserine inversion were observed in refrigerated samples for any genotype.
- 4) A differential response to melatonin has been observed as a function of the *RsaI* polymorphism of the melatonin receptor 1A in total and progressive motility, which suggests a different sensitivity to this hormone from ram sperm depending on the genotype.
- 5) With regard to cryopreservation, the C/C genotype was the most sensitive to this process, showing a greater decrease in the percentage of capacitated sperm in the refrigerated samples.

## BIBLIOGRAFÍA

1. "Caracterización del sector ovino y caprino de carne en España", Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. [Internet]. Disponible en: <https://cpage.mpr.gob.es/>
2. Rateb SA, Khalifa MA, Abd El-Hamid IS, Shedeed HA. Enhancing liquid-chilled storage and cryopreservation capacities of ram spermatozoa by supplementing the diluent with different additives. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 2020;33(7):1068-1076
3. Watson PF. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil.* 1981;62(2):483-92.
4. Darin-Bennett A, White IG. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology.* 1977;14(4):466-70.
5. Wales RG, White IG. The susceptibility of spermatozoa to temperature shock. *J Endocrinol.* 1959;19:211-20.
6. Alvarez JG, Storey BT. Evidence for Increased Lipid Peroxidative Damage and Loss of Superoxide Dismutase Activity as a Mode of Sublethal Cryodamage to Human Sperm During Cryopreservation. *J Androl.* 1992;13(3):232-41.
7. Müller K, Pomorski T, Müller P, Herrmann A. Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *J Cell Sci.* 1999;112(1):11-20.
8. Robertson L, Watson PF. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *J Reprod Fertil.* 1986;77(1):177-85.
9. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA Integrity in Human Spermatozoa: Relationships With Semen Quality. *J Androl.* 2000;21(1):33-44.
10. Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG. The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane Potential, and Membrane Lipid Peroxidation. *J Androl.* 2000;21(6):895-902.
11. Ball BA, Vo AT, Baumber J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am J Vet Res [Internet].* 2001;62(4):508-15.
12. Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol.* 2004;52(5-6):473-80.
13. Lishko P V., Botchkina IL, Kirichok Y. Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nat.* 2011;471(7338):387-91.
14. Grasa P, Cebrián-Pérez JÁ, Muiño-Blanco T. Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reproduction.* 2006;132(5):721-32.
15. Tulsiani D, Zeng H-T, Abou-Haila A. Biology of sperm capacitation: evidence for multiple signalling pathways. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;63:257-72.
16. Langlais J, Zollinger M, Plante L, Chapdelaine A, Bleau G, Roberts KD. Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism

- of capacitation. *Biochemistry*. 1981;78(12):7266–70.
17. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*. 1995;7(4):871–91.
  18. Del Valle I, Mendoza N, Casao A, Cebrián-Pérez JA, Pérez-Pé R, Muiño-Blanco T. Significance of Non-conventional Parameters in the Evaluation of Cooling-induced Damage to Ram Spermatozoa Diluted in Three Different Media. *Reprod Domest Anim*. 2010;45(6):260–8.
  19. Saha A, Asaduzzaman M, Bari FY. Cryopreservation Techniques for Ram Sperm. *Vet Med Int*. 2022;7378379.
  20. Sandoval Monzon RS. Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes [Tesis doctoral]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Universidad del Perú, Decana de América); 2005.
  21. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*. 2000;60–61:481–92.
  22. Ofosu J, Qazi IH, Fang Y, Zhou G. Use of melatonin in sperm cryopreservation of farm animals: A brief review. *Anim Reprod Sci*. 2021;233:106850.
  23. Maxwell WMC, Watson PF. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*. 1996;42(1–4):55–65.
  24. Gonzalez-Arto M, Luna C, Pérez-Pé R, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA, Casao A, et al. New evidence of melatonin receptor contribution to ram sperm functionality. *Reprod Fertil Dev*. 2016;28(7):924–35.
  25. Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Paredes SD, Korkmaz A, Sainz RM, et al. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev*. 2010;85(3):607–23.
  26. Ebisawa T, Karnet S, Lerner MR, Reppert SM. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:6133–7.
  27. Casao A, Gallego M, Abecia JA, Forcada F, Pérez-Pé R, Muio-Blanco T, et al. Identification and immunolocalisation of melatonin MT(1) and MT(2) receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 2012;24(7):953–61.
  28. Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, et al. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J*. 2010;24(10):3603–24.
  29. Grasa P, Cebrián-Pérez JÁ, Muiño-Blanco T. Signal transduction mechanisms involved in *in vitro* ram sperm capacitation. *Reproduction*. 2006;132(5):721–32.
  30. McGuire NL, Kangas K, Bentley GE. Effects of Melatonin on Peripheral Reproductive Function: Regulation of Testicular GnIH and Testosterone. *Endocrinology*. 2011

- ;152(9):3461–70.
31. Rosa HJD, Bryant MJ. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rumin Res.* 2003;48(3):155–71.
  32. Casao A, Cebrián I, Asumpção ME, Pérez-Pé R, Abecia JA, Forcada F, et al. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010;8.
  33. Casao A, Mendoza N, Pérez-Pé R, Grasa P, Abecia JA, Forcada F, et al. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *J Pineal Res.* 2010;48(1):39–46.
  34. Zhu Z, Li R, Lv Y, Zeng W. Melatonin protects rabbit spermatozoa from cryo-damage via decreasing oxidative stress. *Cryobiology.* 2019;88:1–8.
  35. Karimfar MH, Niazvand F, Haghani K, Ghafourian S, Shirazi R, Bakhtiyari S. The protective effects of melatonin against cryopreservation-induced oxidative stress in human sperm. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2015;28(1):69–76.
  36. Ashrafi I, Kohram H, Ardabili FF. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2013;139(1–4):25–30.
  37. Pool KR, Rickard JP, de Graaf SP. Melatonin improves the motility and DNA integrity of frozen-thawed ram spermatozoa likely via suppression of mitochondrial superoxide production. *Domest Anim Endocrinol.* 2021;74:106516.
  38. Succu S, Berlinguer F, Pasciu V, Satta V, Leoni GG, Naitana S. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *J Pineal Res.* 2011;50(3):310–8.
  39. Gallego-Calvo L, Gatica MC, Santiago-Moreno J, Guzmán JL, Zarazaga LA. Exogenous melatonin does not improve the freezability of Blanca Andaluza goat semen over exposure to two months of short days. *Anim Reprod Sci.* 2015;157:24–32.
  40. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron.* 1994;13(5):1177–85.
  41. Dubocovich ML. Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J.* 1988;2(12):2765–73.
  42. Carcangiu V, Mura MC, Vacca GM, Pazzola M, Dettori ML, Luridiana S, et al. Polymorphism of the melatonin receptor MT1 gene and its relationship with seasonal reproductive activity in the Sarda sheep breed. *Anim Reprod Sci.* 2009;116(1–2):65–72.
  43. Pelletier J, Bodin L, Hanocq E, Malpoux B, Teyssier J, Thimonier J, et al. Association Between Expression of Reproductive Seasonality and Alleles of the Gene for Mel1a Receptor in the Ewe. *Biol Reprod.* 2000;62(4):1096–101.
  44. Hernandez X, Bodin L, Chesneau D, Guillaume D, Chemineau P, Malpoux B, et al.

- Relationship between MT1 melatonin receptor gene polymorphism and seasonal physiological responses in Île-de-France ewes. *Reprod Nutr Dev.* 2005;45(2):151–62.
45. Martínez-Royo A, Lahoz B, Alabart JL, Folch J, Calvo JH. Characterisation of the Melatonin Receptor 1A (MTNR1A) gene in the Rasa Aragonesa sheep breed: Association with reproductive seasonality. *Anim Reprod Sci.* 2012;133(3–4):169–75.
  46. Abecia JA, Mura MC, Carvajal-Serna M, Pulinas L, Macías A, Casao A, et al. Polymorphisms of the melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene influence the age at first mating in autumn-born ram-lambs and sexual activity of adult rams in spring. *Theriogenology.* 2020;157:42–7.
  47. Gonzalez-Arto M, Luna C, Pérez-Pé R, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA, Casao A. New evidence of melatonin receptor contribution to ram sperm functionality. *Reprod Fertil Dev.* 2016;28(7):924–35.
  48. Dubocovich ML. Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J.* 1988;2(12):2765–73.
  49. Ollero M, Muino-Blanco T, Lopez-Perez MJ, Cebrian-Perez JA. Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *international journal of andrology.* 1996.
  50. Arando A, Delgado JV, León JM, Nogales S, Navas-González FJ, Pizarro MG, et al. Effect of three commercial extenders on sperm motility and fertility in liquid ram semen stored at 15 °C or 5 °C. *Acta Vet Hung.* 2019;67(3):430–44.
  51. Miguel Jiménez S, Pérez Pé R, Cebrián Pérez JÁ. Estudio de la posible acción protectora de la melatonina frente al daño por frío en espermatozoides ovinos.[Trabajo Fin de Grado] Universidad de Zaragoza; 2015.
  52. Alquézar-Baeta C, Gimeno-Martos S, Miguel-Jiménez S, Santolaria P, Yániz J, Palacín I, et al. OpenCASA: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis. *PLoS Comput Biol.* 2019;15(1).
  53. Harrison RAP, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1990;88(1):343–52.
  54. Guthrie HD, Welch GR. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci.* 2006;84(8):2089–100.
  55. Gillan L, Evans G, Maxwell WM. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 1997;9(5):481–7.
  56. Ward CR, Storey BT. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol.* 1984;104(2):287–96.
  57. Bhalothia SK, Mehta JS, Kumar T, Prakash C, Talluri TR, Pal RS, et al. Melatonin and canthaxanthin enhances sperm viability and protect ram spermatozoa from oxidative stress during liquid storage at 4°C. *Andrologia.* 2022;54(1).

58. Fang Y, Zhao C, Xiang H, Zhao X, Zhong R. Melatonin Inhibits Formation of Mitochondrial Permeability Transition Pores and Improves Oxidative Phosphorylation of Frozen-Thawed Ram Sperm. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;10:896.
59. Fang Y, Zhao C, Xiang H, Jia GX, Zhong R. Melatonin improves cryopreservation of ram sperm by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening. *Reprod Domest Anim*. 2020;55(9):1240–9.
60. González-Arto M, Vicente-Carrillo A, Martínez-Pastor F, Fernández-Alegre E, Roca J, Miró J, et al. Melatonin receptors MT1 and MT2 are expressed in spermatozoa from several seasonal and nonseasonal breeder species. *Theriogenology*. 2016 ;86(8):1958–68.
61. Fujinoki M. Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction*. 2008;136(5):533–41.
62. Mura MC, Luridiana S, Bodano S, Daga C, Cosso G, Diaz ML, et al. Influence of melatonin receptor 1A gene polymorphisms on seasonal reproduction in Sarda ewes with different body condition scores and ages. *Anim Reprod Sci*. 2014;149(3–4):173–7.
63. Kumar T, Kumar P, Saini N, Bhalothia SK, Prakash C, Mahla AS, et al. Shielding effect of melatonin improves seminal quality and oxidative stress indices during chilled storage of ram semen. *Trop Anim Health Prod*. 2022;54(3):197.
64. Ebisawa T, Karne S, Lerner MR, Reppert SM. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(13):6133–7.
65. Murillo Almuzara C, Pérez Pé R, Gimeno Martos S. Estudio del efecto de las hormonas esteroideas frente al daño por frío en los espermatozoides ovinos. [Trabajo Fin de Grado] Universidad de Zaragoza; 2017.