

# Efecto de la melatonina sobre la capacitación espermática en la especie ovina

Trabajo Fin de Máster

Biología Molecular y Celular

Autor/es: **Silvia Gimeno Martos**

Director/es:

Dr. Rosaura Pérez Pé

Dr. Adriana Casao

Grupo Biología y Biotecnología de la Reproducción

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de  
Veterinaria

Septiembre 2015

Los resultados derivados del presente Trabajo Fin de Máster han sido presentados al siguiente congreso (Anexos):

Título: "**Melatonin affects calcium, protein tyrosine phosphorylation and ROS levels during *in vitro* ram sperm capacitation**"

Autores: **Silvia Gimeno**, A.casao, J.A. Cebrián-Pérez, M.T. Muiño-Blanco and R. Pérez-Pé

XXXVIII Congreso anual de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM) Valencia, Septiembre 2015

La Dra. Rosaura Pérez Pé, Profesora Titular y la Dra. Adriana Casao Gascón, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

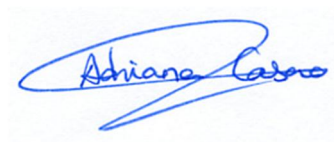
**INFORMAN:**

Que la alumna Dña. Silvia Gimeno Martos, ha realizado bajo nuestra dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin de Máster titulado "Efecto de la melatonina sobre la capacitación espermática en la especie ovina". Este trabajo cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFM, por lo que consideramos procedente su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos la presente en Zaragoza a 16 de septiembre de 2015.



**Rosaura Pérez Pé**



**Adriana Casao Gascón**

## AGRADECIMIENTOS

---

Quiero agradecer a mi grupo de investigación por acogerme con tanto cariño y sentirme como en casa.

En primer lugar, dar las gracias a Rosaura Pérez por dirigir este gran trabajo, estar siempre atenta y por haberme enseñado tanto sobre la ciencia y sobre todo, enseñarme que hay que tener paciencia, ilusión y ser muy positiva durante la investigación. También agradecer a Adri toda la ayuda prestada en todo momento y todas las técnicas aprendidas junto a ella.

Pepín y Tere, los “jefes”, por ser tan atentos y transmitirme toda su experiencia en este ámbito científico.

Muchas gracias a todas las demás personas que componen el grupo, Carol por enseñarme tanto sobre el maravilloso mundo de la capacitación espermática. A mi querida colombiana, Melissa por ayudarme y ser un gran apoyo durante los meses aquí instalada. Y por supuesto a David, Elena, Sonia y Sara por compartir sus conocimientos sobre los queridos y amados espermatozoides, y por supuesto, toda la compañía recibida durante todas las mañanas en el laboratorio.

---

## ABREVIATURAS

---

ROS: especies reactivas de oxígeno

$\text{HCO}_3^-$  : bicarbonato

$\text{Ca}^{2+}$  : calcio

HDL: lipoproteínas de alta densidad

AMPc: adenil monofosfato cíclico

AC: adenilato ciclasa

PKA: protein kinasa-A

R.A.: reacción acrosómica

BSA: albúmina sérica bovina

ATP: adenosintrisfosfato

$(\text{O}_2^-)$ : anión superóxido

$\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrógeno

$(\text{OH}^\cdot)$  : radical hidroxilo

$(\text{HO}_2^\cdot)$ : radical peroxilo

$\text{MT}_1$  y  $\text{MT}_2$ : receptor de melatonina 1 y 2

MS-Dx: medio *swim-up*/dextrano

DMSO: dimetil sulfóxido

IP: yoduro de propidio

CFDA: diacetato de carboxifluoresceína

LIN: índice de linealidad

ALH: amplitud del desplazamiento lateral

CTC: clorotetraciclina

## ÍNDICE

---

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
<b>1.1. Capacitación espermática</b> .....	3
<b>1.1.1. Eventos fisiológicos y bioquímicos de la capacitación</b> .....	3
1.1.1.1. incremento en la fluidez de la membrana plasmática.....	3
1.1.1.2. Fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas .....	4
1.1.1.3. Hiperactivación flagelar .....	4
1.1.1.4. Preparación para experimentar la reacción acrosómica.....	5
<b>1.1.2. Moléculas y segundos mensajeros implicados en la capacitación.</b> .....	6
1.1.2.1. Bicarbonato.....	6
1.1.2.2 Calcio .....	7
1.1.2.3 Aceptores de colesterol .....	7
1.1.2.4. AMPc (Adenil monofosfato cíclico) .....	8
1.1.2.5. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	9
<b>1.2. Melatonina y su papel fisiológico sobre la reproducción</b> .....	11
<b>1.2.1. Melatonina y capacitación espermática</b> .....	12
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
<b>3.1. PROCESADO DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS</b> .....	16
3.1.1. RECOLECCIÓN DE SEMEN.....	16
3.1.2. MÉTODO DE SWIM-UP/DEXTRANO .....	16
3.1.3. CAPACITACIÓN IN VITRO .....	18
<b>3.2. EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS</b> .....	19
3.2.1. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA .....	19
3.2.2. VIABILIDAD CELULAR (INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA).....	19
3.2.3. MOTILIDAD ESPERMÁTICA .....	20
3.2.5 EVALUACIÓN DEL ESTADO DE CAPACITACIÓN .....	23
3.2.6 ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DEL CALCIO POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	24
3.2.7 ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).....	25
3.2.8 ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE AMP CÍCLICO .....	25

3.3 DETECCIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE RESIDUOS DE TIROSINA DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA ESPERMÁTICAS POR WESTERN BLOTTING .....	26
3.3.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS .....	26
3.3.2. SDS-PAGE e INMUNOBLOTTING .....	27
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
4.1. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA INTEGRIDAD DE MEMBRANA DE MUESTRAS CAPACITADAS .....	29
4.2 EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA DE MUESTRAS CAPACITADAS .....	31
4.3 EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DEL CALCIO.....	35
4.5 EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CANTIDAD DE CALCIO INTRACELULAR.....	37
4.6 EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE ADENIL MONOFOSFATO CÍCLICO ( AMPc).....	39
4.7 EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LOS NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).....	41
4.8. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA FOSFORILACIÓN EN RESIDUOS DE TIROSINAS DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA ESPERMÁTICAS.....	43
5.CONCLUSIONES.....	47
CONCLUSIONS.....	47
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

Anexo: Póster Congreso SEBBM 2015

## RESUMEN

---

La melatonina es una hormona importante en la regulación de la reproducción, por lo que el descubrimiento de la presencia de los receptores de esta hormona en la superficie del espermatozoide ovino permite especular sobre su importancia en la funcionalidad espermática. Se sabe que, en ciertas células somáticas, ejerce sus acciones a través de diversas vías moleculares, algunas implicadas en la regulación de procesos fisiológicos del espermatozoide, como la capacitación. Esta capacitación es el conjunto de cambios moleculares y fisiológicos que sufre el espermatozoide y que le confieren capacidad fecundante. Por otro lado, es sabido que la melatonina tiene la capacidad de reducir el estrés oxidativo inducido por especies reactivas de oxígeno (ROS) y que durante la capacitación *in vitro* se produce un incremento de los niveles de ROS. Basándonos en estos datos, en el presente trabajo se planteó la hipótesis de que la melatonina jugaría un papel crucial en la capacitación espermática.

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de diferentes concentraciones de melatonina sobre distintos parámetros relacionados con la funcionalidad espermática en muestras sometidas a capacitación *in vitro*. Los parámetros analizados fueron la motilidad y la viabilidad celular y otros especialmente vinculados con la capacitación, como la hiperactivación, la distribución y la cantidad de calcio intracelular, los niveles de ROS, la cantidad de AMPc y los niveles de fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas espermáticas.

Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que ninguna de las concentraciones de melatonina utilizadas (100 pM, 10 nM y 1 µM) modificaron significativamente el porcentaje de espermatozoides móviles o con membrana plasmática íntegra con respecto a las muestras capacitadas sin melatonina. Sin embargo, la presencia de 1 µM de melatonina en el medio de capacitación dio lugar a un menor porcentaje de espermatozoides capacitados ( $p < 0,001$ ) junto con menores niveles de ROS y calcio intracelular y además menor grado de fosforilación en residuos de tirosinas.

En conclusión, en este estudio se demostró que la melatonina tiene efectos directos sobre la capacitación del espermatozoide ovino.

## ABSTRACT

---

Melatonin is an important hormone regulating reproductive functions and the presence of receptors for this hormone on the ram sperm surface leads to speculate about relevant role of melatonin on sperm functionality. Certain similarities between molecular pathways activated by this hormone in somatic cells, and those implicated in sperm events such as capacitation, have been described. Capacitation includes physiological and biochemical changes required for spermatozoa to acquire the ability to fertilize the oocyte. On the other hand, melatonin is a potent antioxidant molecule, reducing the oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS). It has been shown that in vitro capacitation results in increased ROS levels. Based in all the above-mentioned, we suggest the hypothesis that melatonin play a crucial role in sperm capacitation.

The aim of this study was to investigate the effect of different melatonin concentrations on several sperm parameters related to sperm functionality in samples incubated in capacitating conditions. Analyzed parameters were motility, plasma membrane integrity, and those associated with capacitation, such as hyperactivation of motility, changes in intracellular calcium levels and distribution, ROS and cAMP levels and increment of protein tyrosine phosphorylation.

The results obtained showed that none of melatonin concentrations assayed (100 pM, 10nM and 1μM) affected the percentage of motile and with integral plasma membrane sperm compared with capacitated samples without melatonin. However, samples capacitated in the presence of 1μM melatonin showed a lower percentage of non-capacitated sperm ( $p < 0.001$ ) together with lower levels of ROS and calcium and a decrease in protein tyrosine phosphosrylation than capacitated samples without melatonin.

In conclusion, this study showed that melatonin has direct effects on ram sperm capacitation.



# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

---

El espermatozoide de los mamíferos es incapaz de fecundar al ovocito tras la eyaculación. La capacidad fecundante la adquiere durante su tránsito por el tracto reproductor femenino, en un proceso conocido como **capacitación espermática**, que implica una serie secuencial de profundos cambios bioquímicos y biofísicos (Yanagimachi, 1994).

### 1.1.1. EVENTOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LA CAPACITACIÓN

---

**A continuación se describirán brevemente algunos de los cambios más relevantes asociados a la capacitación espermática:**

#### 1.1.1.1. INCREMENTO EN LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

---

Durante la capacitación, el contenido del colesterol de la membrana espermática se reduce hasta en un 40% dependiendo de la especie animal (Iborra *et al.*, 2000). La salida de colesterol conduce a un aumento en la fluidez de la membrana (Davis *et al.*, 1979) y una mayor permeabilidad de la misma (Visconti *et al.*, 1999).

Durante la capacitación, el colesterol se reordena en la parte apical de la cabeza espermática, recolocación que se produce de forma previa a su eliminación (Flesch *et al.*, 2001). La albúmina, lipoproteínas de alta densidad (HDL) y  $\beta$ -ciclodextrinas han sido descritas como moléculas promotoras de la capacitación espermática, actuando como aceptores del colesterol y eliminándolo de la membrana plasmática (Vadnais *et al.*, 2007).

Es muy posible que el diferente contenido en colesterol de la membrana espermática de las distintas especies de mamíferos esté relacionado con el tiempo requerido para capacitarse. Así, espermatozoides de cerdo y de morueco, al tener poca cantidad de colesterol en su membrana plasmática, solo necesitan entre una y dos horas (Yanagimachi, 1994) mientras que el humano requiere entre siete y ocho horas de capacitación (Davis, 1981).

---

#### 1.1.1.2. FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN RESIDUOS DE TIROSINAS

---

La fosforilación de proteínas es una modificación post-traducciona para regular y controlar diversos procesos celulares. En el espermatozoide, esta fosforilación juega un papel fundamental en la regulación de procesos como la capacitación, hiperactivación o la reacción acrosómica, que veremos más adelante.

La fosforilación en tirosinas fue descrita en la célula espermática por primera vez en 1989 (Leyton *et al.*, 1989) identificándose tres proteínas fosforiladas de 52, 75 y 95 KDa gracias al uso de anticuerpos anti-fosfotirosinas. Esta fosforilación aumenta durante la capacitación en diversas especies y parece ser un prerrequisito para que el espermatozoide pueda fecundar al ovocito (Visconti *et al.*, 1995). En el caso de los espermatozoides ovinos, este hecho fue descrito por primera vez por nuestro grupo de investigación (Perez-Pe *et al.*, 2002) que más recientemente demostró la participación de nuevas vías alternativas de señalización que regulan este proceso (Luna *et al.*, 2012) además de la clásica AMPc/ PKA de la que se hablará más adelante.

Además de la fosforilación en tirosinas, también se ha observado que durante la capacitación se produce un incremento de fosforilación en residuos de serinas y treoninas, tanto en el morueco (Grasa *et al.*, 2009) como en otras especies como humano (Naz, 1999) o ratón (Jha *et al.*, 2006).

---

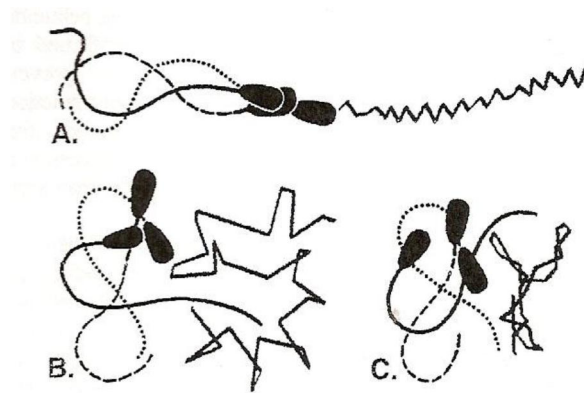
#### 1.1.1.3. HIPERACTIVACIÓN FLAGELAR

---

Se trata de un cambio en el patrón de la motilidad necesario para la fecundación. El espermatozoide de mamífero presenta dos tipos de motilidad fisiológica: una motilidad activada, propia del espermatozoide recién eyaculado, y una motilidad hiperactivada, característica de espermatozoides con capacidad fecundante (Katz *et al.*, 1981) (Fig. 1.1.).

La motilidad activada se caracteriza porque el espermatozoide se mueve en línea relativamente recta. Sin embargo, una vez hiperactivado, el patrón de movimiento

cambia; normalmente los flagelos producen curvas más profundas, con un batido mucho más asimétrico que el anterior, por lo que tienden a moverse en círculos o con un patrón en forma de ocho (Yanagimachi, 1994). Durante este proceso, la frecuencia de batido del flagelo se reduce en torno a un sexto. El proceso de hiperactivación podría estar estimulado de forma fisiológica por distintos componentes de los fluidos del tracto reproductor femenino. Estos dos procesos, capacitación e hiperactivación son complementarios y se desarrollan simultáneamente en condiciones fisiológicas. Sin embargo, también pueden producirse de manera independiente aun compartiendo vías o rutas de señalización (Ho *et al.*, 2001).



**Figura 1.1** Patrones de motilidad espermática. A) Motilidad activada. B y C) Motilidad hiperactivada (Ho *et al.*, 2003).

---

#### 1.1.1.4. PREPARACIÓN PARA EXPERIMENTAR LA REACCIÓN ACROSÓMICA

---

La reacción acrosómica (R.A.) es un proceso de exocitosis que ayuda al espermatozoide a penetrar en la zona pelúcida del ovocito y le permite por tanto poder llevar a cabo la fecundación. Solo aquellos espermatozoides previamente capacitados son capaces de experimentar la R.A. en el tracto reproductor femenino (Saling *et al.*, 1979). Tanto la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , como la producción de especies reactivas de oxígeno, el aumento de la actividad del AMPc (que se verá más adelante) y la fosforilación en residuos de tirosina de proteínas, intervienen en la inducción de la R.A. (Yanagimachi, 1994; Leclerc *et al.*, 1995; Aitken *et al.*, 1997).

---

### 1.1.2. MOLÉCULAS Y SEGUNDOS MENSAJEROS IMPLICADOS EN LA CAPACITACIÓN.

---

Estos eventos fisiológicos que se producen durante la capacitación están modulados por una serie de moléculas y segundos mensajeros.

---

#### 1.1.2.1. BICARBONATO

---

La capacitación es un proceso dependiente del ión  $\text{HCO}_3^-$  (Visconti *et al.*, 2002). De hecho se hipotetiza que las bajas concentraciones de bicarbonato en el epidídimo mantienen a los espermatozoides sin capacitar hasta que los altos niveles de este anión en el tracto reproductor femenino disparan su capacitación (Visconti *et al.*, 1998). Este transporte de  $\text{HCO}_3^-$  a través de la membrana puede ser el responsable del incremento del pH intracelular que se observa durante la capacitación (Zeng *et al.*, 1996).

Este incremento de  $\text{HCO}_3^-$  va a afectar principalmente a la membrana espermática. En determinadas circunstancias, la asimetría transversal de la membrana plasmática se altera dando lugar a un fenómeno conocido como *scrambling*, y que lleva asociado la externalización de determinados fosfolípidos que en condiciones normales se hallan en la cara interna de la misma. En esperma porcino (Harrison *et al.*, 1996), humano (de Vries *et al.*, 2003), y de caballo (Rathi *et al.*, 2001) se ha observado que este fenómeno de *scrambling* se produce durante la capacitación y es dependiente de  $\text{HCO}_3^-$ . Este ion, por tanto, modifica la estructura lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación, lo que lleva a su desestabilización y permite que la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide pueda fusionarse a la membrana acrosomal en la reacción acrosómica, y, posteriormente, con la membrana del ovocito (Harrison *et al.*, 1996).

---

#### 1.1.2.2 CALCIO

---

El calcio juega un papel importante en diversas vías de transducción de señal, no solo implicadas en el proceso de capacitación (Ho and Suarez, 2003), sino también en la reacción acrosómica (Dragileva *et al.*, 1999) y en la fecundación (O'Toole *et al.*, 1996). Con respecto a la capacitación, regula la fosforilación de residuos de tirosinas (Visconti *et al.*, 1995) y también parece estar implicado en la hiperactivación del espermatozoide, como demuestran estudios recientes (Ignotz *et al.*, 2005; Colas *et al.*, 2010). El  $\text{Ca}^{2+}$  actuaría regulando los niveles intracelulares de AMPc (Zaccolo *et al.*, 2003) mediante la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC), como veremos más adelante (Si *et al.*, 2000).

En la mayoría de las especies se ha observado un incremento de calcio intracelular durante la capacitación (Baldi *et al.*, 1991), (White *et al.*, 1989) (Colas *et al.*, 2010). Este incremento puede ser debido a la entrada de calcio desde el exterior o a la salida del mismo desde reservorios intracelulares. Aunque también se ha observado una disminución de la calmodulina, proteína de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  durante la capacitación espermática, por lo que también se mantendrían altos los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular gracias a esta vía (Chaudhry *et al.*, 1988). La entrada de calcio desde el exterior puede deberse tanto a la apertura de canales permeables al mismo, como al incremento de la fluidez de la membrana plasmática que se produce durante este proceso, gracias a la salida del colesterol comentada anteriormente (Flesch *et al.*, 2000). Sin embargo, existen controversias sobre el papel del calcio extracelular en la capacitación espermática (DasGupta *et al.*, 1993), (Baker *et al.*, 2004).

---

#### 1.1.2.3 ACEPTORES DE COLESTEROL

---

Se ha comprobado que, para la mayoría de las especies, los medios para llevar a cabo la capacitación *in vitro* deben incluir albúmina sérica bovina (BSA), debido a que este compuesto es capaz de retirar el colesterol de las membranas, aumentando por tanto su fluidez. Este papel, *in vivo* lo desempeñarían, además de la albúmina, abundante en los fluidos oviductal y uterino, otras proteínas de unión a esteroides como las lipoproteínas de alta densidad (HDLs).

Otro compuesto utilizado en los medios de capacitación con el mismo objetivo son las  $\beta$ -ciclodextrinas. Las  $\beta$ -ciclodextrinas presentan una elevada afinidad y especificidad por los esteroides y son capaces de eliminar más del 80% del colesterol de membrana de las células (Yancey et al., 1996; Christian et al., 1997).

---

#### 1.1.2.4. AMPc (ADENIL MONOFOSFATO CÍCLICO)

---

Este nucleótido actúa como segundo mensajero de múltiples procesos biológicos. En los espermatozoides, al igual que ocurre con células somáticas, el incremento de la concentración intracelular de AMPc depende de la activación de la adenilato ciclasa (AC), enzima que cataliza la producción de AMPc a partir de adenosín trifosfato (ATP). Además de esta enzima, denominada adenilato ciclasa soluble (sAC) y regulada por iones (Braun et al., 1975; Hess et al., 2005), se han descrito también isoformas asociadas a la membrana (mAC) en espermatozoides de algunas especies, cuyo modo de activación y funcionamiento todavía no ha sido completamente elucidado (Baxendale *et al.*, 2003).

El aumento de la concentración de AMPc durante la capacitación parece ser mayoritariamente dependiente de un aumento en la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  y, en algunas especies, de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que ambos iones estimulan la sAC. Esto a su vez, estimula la protein-kinasa A (PKA) para fosforilar, entre otros, residuos de tirosina de ciertas proteínas, (Visconti et al., 1998; Gadella et al., 2002). De esta manera, al utilizar un inhibidor de la PKA o un antagonista de AMPc se ven alterados los procesos de capacitación y la fosforilación de tirosinas (Galantino-Homer *et al.*, 1997). En cuanto al papel que desempeña el incremento de AMPc en otros aspectos relacionados con la capacitación, como la hiperactivación, existe cierta controversia (Yanagimachi, 1994) (Colas *et al.*, 2010)

Estudios de nuestro grupo sugieren que los elevados niveles intracelulares de fosfodiesterasas (PDEs, enzimas encargadas de la degradación del AMPc) presentes en el espermatozoide ovino serían los responsables del bajo contenido de AMPc intracelular observado (Grasa et al., 2006; Colas et al., 2008). Asimismo, se demostró

que era necesaria la adición de un medio específicamente diseñado para mantener niveles intracelulares altos de AMPc (al que en este trabajo nos referiremos como *cocktail*) para la inducción de la capacitación *in vitro* en espermatozoides ovinos (Colas *et al.*, 2008).

Estudios más recientes de nuestro grupo también han demostrado que la tradicional vía dependiente de AMPc/PKA está sólo parcialmente implicada en la capacitación de espermatozoides ovinos, ya que existen otras rutas de señalización celular que participan en la regulación del proceso de capacitación en esta especie (Luna *et al.*, 2012).

---

#### 1.1.2.5. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

---

Las ROS incluyen moléculas como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) y el radical peroxilo ( $HO_2^\cdot$ )<sup>4</sup>. Frente a ellos, las moléculas antioxidantes actúan para ayudar a mantener sus niveles homeostáticos en las células y garantizar las funciones fisiológicas que ejercen, y al mismo tiempo evitar o prevenir los efectos patológicos que se pueden producir debido al estrés oxidativo (Fig. 1.2).

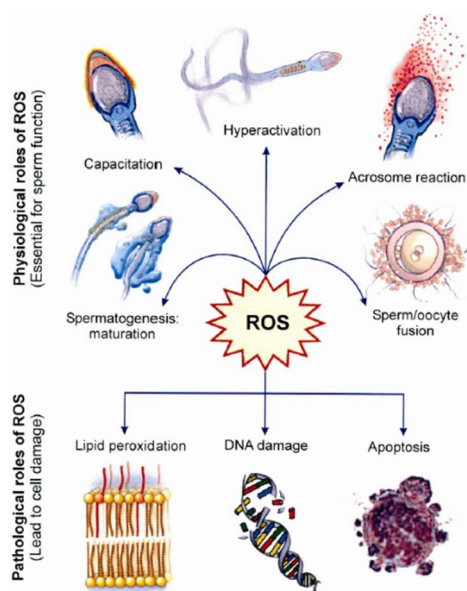


Figura 1.2 Efectos fisiológicos y dañinos de ROS e la funcionalidad espermática(Kothari *et al.*, 2010).

En las células espermáticas, las ROS, fisiológicamente presentes a bajas concentraciones, intervienen y controlan diversos procesos como la maduración espermática, la capacitación, la hiperactivación, la reacción acrosómica y la fusión entre el espermatozoide y el ovocito, (Agarwal *et al.*, 2003). (Kothari *et al.*, 2010).

Parece ser que las ROS, especialmente  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , promueven la capacitación, principalmente estimulando la adenilato ciclasa (AC), y por tanto la vía AMPc/PKA, comentada anteriormente.

Sin embargo, a pesar de sus acciones fisiológicas, la acumulación excesiva de ROS en procesos patológicos induce la peroxidación de lípidos, daños en el DNA y apoptosis (Kothari *et al.*, 2010), y por tanto pérdida de fertilidad. Dado que los espermatozoides son extremadamente sensibles al estrés oxidativo, se protegen de este estrés gracias a la presencia de enzimas y moléculas antioxidantes como la melatonina en el plasma seminal (Hammadeh *et al.*, 2008; Casao *et al.*, 2013).



---

## 1.2. MELATONINA Y SU PAPEL FISIOLÓGICO SOBRE LA REPRODUCCIÓN

---

La melatonina es una hormona secretada por la glándula pineal, así como por distintos tejidos extrapineales, encontrándose también presente en el plasma seminal (Casao *et al.*, 2010) (Cebrian-Perez *et al.*, 2014) y en el tracto reproductor femenino (Brzezinski *et al.*, 1987). Esta hormona está regulada por ritmos circadianos, de forma que, en plasma sanguíneo, posee un pico máximo de concentración nocturno y unos niveles basales diurnos (Turek *et al.*, 1976). Es una molécula con gran poder antioxidante, gracias a su capacidad de bloquear los efectos de los radicales libres (Reiter *et al.*, 2009), y está también implicada en la regulación de multitud de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, incluida la regulación de procesos reproductivos.

Entre otros efectos, la melatonina juega un papel importante en el control de la reproducción en animales estacionales, sincronizando las épocas reproductivas con los cambios ambientales (Gerlach *et al.*, 2000) tales como la temperatura, y la disponibilidad del alimento (Rosa *et al.*, 2000). En el caso de la especie ovina, esta hormona estimula la reproducción durante los días cortos, es decir en las estaciones de otoño e invierno (Malpaux *et al.*, 1997), para que los partos se concentren en primavera-verano. En la época no reproductiva (durante los días largos, es decir, primavera y verano), se produce una disminución de la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Lincoln, 1990) debida a una menor liberación de melatonina nocturna en la glándula pineal durante este periodo (Sheikheldin *et al.*, 1992) (Sheikheldin *et al.*, 1992) y que en el macho ovino se asocia a una disminución en la calidad espermática (Karagiannidis *et al.*, 2000) y en la fertilidad asociada a esta (Palacin *et al.*, 2008).

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el tratamiento con melatonina exógena (mediante implantes subcutáneos) durante la época no reproductiva en sementales ovinos, permite aumentar la motilidad espermática y mejorar otros parámetros reproductivos, dando como resultado un aumento de la fertilidad *in vivo* (Palacin *et al.*, 2008; Casao *et al.*, 2010). Esta melatonina exógena también provoca un aumento en los niveles de testosterona y estradiol en el plasma seminal ovino, además de un incremento de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión reductasa en este fluido, lo que se relacionaría con su papel antioxidante (Casao *et al.*, 2013), dando lugar a una mejora de la calidad espermática *in vivo*.

Además, de la presencia de melatonina en el plasma seminal (Casao *et al.*, 2010), estudios de nuestro grupo también han demostrado tanto la acción directa de la melatonina sobre el espermatozoide ovino (Casao *et al.*, 2010), sobre el que ejerce un efecto antioxidante y modulador de la capacitación, y la existencia de receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> en la membrana de estas células (Casao *et al.*, 2012), lo que hace pensar que la melatonina puede tener un papel relevante en la funcionalidad espermática ovina. Aunque se han descrito algunos efectos de la melatonina sobre la calidad y la supervivencia espermática, hasta la fecha se desconoce su implicación exacta y su mecanismo de acción en procesos espermáticos tan importantes como la capacitación.

---

### **1.2.1. MELATONINA Y CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA**

---

El papel de la melatonina sobre los espermatozoides sigue siendo objeto de estudio, pero se ha comprobado que su presencia disminuye el daño oxidativo, al reducir los niveles de ROS (Jang *et al.*, 2010), y también los marcadores apoptóticos (Casao *et al.*, 2010; Espino *et al.*, 2011) incluyendo la fragmentación del DNA (Sarabia *et al.*, 2009).

En relación al proceso de capacitación, nuestro grupo ha descrito como la melatonina puede actuar como agente tanto capacitante como descapacitante dependiendo de la concentración utilizada. Así, a concentraciones de 100 pM se observó un efecto

capacitante, mientras que a una concentración de 1  $\mu$ M se inhibía la capacitación espermática (Casao *et al.*, 2010). Estos resultados se corroboraron mediante fecundación *in vitro* (FIV), en los que los ovocitos fecundados con muestras espermáticas tratadas con la concentración más baja de melatonina presentaban una mayor tasa de división embrionaria, y por tanto una mayor capacidad fecundante (Casao *et al.*, 2010).

Este efecto de la melatonina sobre la capacitación espermática podría deberse a las propiedades antioxidantes de esta hormona. Como se ha comentado, la melatonina tiene una elevada capacidad de eliminar las ROS, pero, para que se produzca la capacitación, son necesarios unos determinados niveles de estas especies reactivas (Gagnon *et al.*, 1984). Por tanto, cantidades elevadas de melatonina, como las presentes de forma fisiológica en el plasma seminal, podrían tanto proteger a los espermatozoides del daño oxidativo (Reiter *et al.*, 2009), así como prevenir la capacitación eliminando las ROS. Una vez en el tracto reproductor femenino, probablemente el espermatozoide esté expuesto a concentraciones mucho más bajas de melatonina, ya que esta hormona que se encuentra de forma fisiológica en el fluido folicular se diluiría al pasar al fluido oviductal con la ovulación (Tamura *et al.*, 2008), y, como se ha comentado, estas bajas concentraciones de melatonina no reducirían tanto los niveles de ROS, permitiendo por tanto, la capacitación espermática.

Sin embargo, también sería posible que la hormona actúe tras su unión, una vez en el citoplasma, a la calmodulina (Pozo *et al.*, 1997) ya que esta proteína se encuentra relacionada con diferentes aspectos de la funcionalidad espermática, como la hiperactivación, la capacitación y la reacción acrosómica (Bendahmane *et al.*, 2001; Tulsiani *et al.*, 2007; Colas *et al.*, 2009).

Además de esta posible acción directa de la melatonina, no olvidemos que ésta también podría ejercer sus acciones mediante a su unión a receptores de membrana específicos. Nuestro grupo ha identificado ambos receptores de melatonina descritos en mamíferos, **MT<sub>1</sub>** y **MT<sub>2</sub>**, en la membrana del espermatozoide ovino (Casao *et al.*, 2012), y ha demostrado que la acción de la melatonina sobre la capacitación espermática podría estar mediada por la unión a estos receptores, concretamente a

MT<sub>2</sub>(Gonzalez-Arto et al., 2014). Como se ha mencionado, el bicarbonato y el calcio juegan un papel muy importante en el proceso de capacitación (Grasa *et al.*, 2006). En algunas células somáticas se ha descrito que la melatonina regula la secreción de bicarbonato y la movilización de calcio intracelular, a través de su unión al receptor MT<sub>2</sub> (Sjoblom *et al.*, 2003) lo que apoyaría la idea de que la melatonina regule la capacitación espermática por esta vía.

De esta forma, al incubar a los espermatozoides con agonistas de la melatonina para estos receptores en condiciones capacitantes (en un medio con calcio y bicarbonato) se mantuvo una alta proporción de espermatozoides no capacitados, mientras que si se incubaban con antagonistas de la misma, se produce un incremento en el porcentaje de espermatozoides capacitados (Gonzalez-Arto *et al.*, 2014).

Además, quedaría por dilucidar si la melatonina es capaz de ejercer sus efectos moduladores de la capacitación cuando esta se lleva a cabo usando la mezcla de sustancias elevadoras del AMPc (*cocktail*) mencionada anteriormente, que da lugar a un mayor incremento en el porcentaje de espermatozoides capacitados y una mayor señal en fosfotirosinas de proteínas de membrana.

Así pues se hace necesario profundizar en la investigación del papel de la melatonina en la funcionalidad del espermatozoide ovino y especialmente en el proceso de capacitación. Esta investigación abriría nuevas vías para seleccionar las condiciones óptimas para llevar a cabo procesos de fecundación *in vitro* y mejorar sus resultados. Además, en base a los resultados obtenidos, esta hormona podría utilizarse como aditivo adecuado para la criopreservación del esperma, con la finalidad de evitar o minimizar alguno de los daños asociados al frío, como el estrés oxidativo o la capacitación prematura, causas potenciales de la disminución en la fertilidad obtenida con muestras criopreservadas.

## 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

---

Tras investigar los antecedentes sobre este tema, nos planteamos la **hipótesis** de que la melatonina puede tener un papel importante en la funcionalidad espermática y, especialmente en el proceso de capacitación.

Por tanto, el **objetivo general** de este trabajo es estudiar el efecto de diferentes concentraciones de melatonina sobre la capacitación espermática en la especie ovina.

Para ello, los **objetivos específicos** planteados fueron:

1. Analizar el efecto capacitante o descapitante que puede producir esta hormona durante el proceso de capacitación *in vitro* a diferentes concentraciones, y su influencia en los niveles de diferentes moléculas y segundos mensajeros como son el  $\text{Ca}^{2+}$ , ROS y AMPc.
2. Evaluar la motilidad espermática y los diferentes parámetros cinéticos relacionados con el fenómeno de hiperactivación que suele producirse simultáneamente con la capacitación.
3. Por último, estudiar la fosforilación de residuos de tirosina de membrana de las proteínas espermáticas para comprobar el efecto que produce la hormona sobre las últimas fases del proceso de capacitación.

Para llevarlos a cabo, se incubaran los espermatozoides libres de plasma seminal en medio TALP, sólo o junto con un *cocktail* de sustancias que han demostrado ser eficientes para provocar la capacitación *in vitro* de los espermatozoides ovinos (Colas *et al.*, 2008) en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de melatonina (100 pM, 10 nM y 1  $\mu\text{M}$ ).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

---

#### 3.1. PROCESADO DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS

---

##### 3.1.1. RECOLECCIÓN DE SEMEN

---

En los experimentos realizados se utilizó semen ovino obtenido a partir de moruecos adultos (3 y 6 años), pertenecientes a la Asociación Nacional de Ganaderos de la raza *Rasa Aragonesa* (ANGRA), mantenidos en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Zaragoza. Tanto el mantenimiento de los sementales como la obtención de las muestras corrieron a cargo del personal del SEA. Los animales se mantuvieron con un régimen de tres extracciones semanales, manteniéndose así períodos de abstinencia de dos o tres días. Se obtuvieron dos eyaculados consecutivos por morueco, mediante vagina artificial, y se utilizaron sólo los segundos en base a resultados previos de nuestro equipo de investigación que demostraron que éstos tenían mejores parámetros de calidad seminal (Ollero et al., 1994; Ollero et al., 1996; Ollero et al., 1996). Tras la recogida, las muestras se mantuvieron a 37 °C hasta su uso y se trabajó con la mezcla de los segundos eyaculados para evitar diferencias individuales.

---

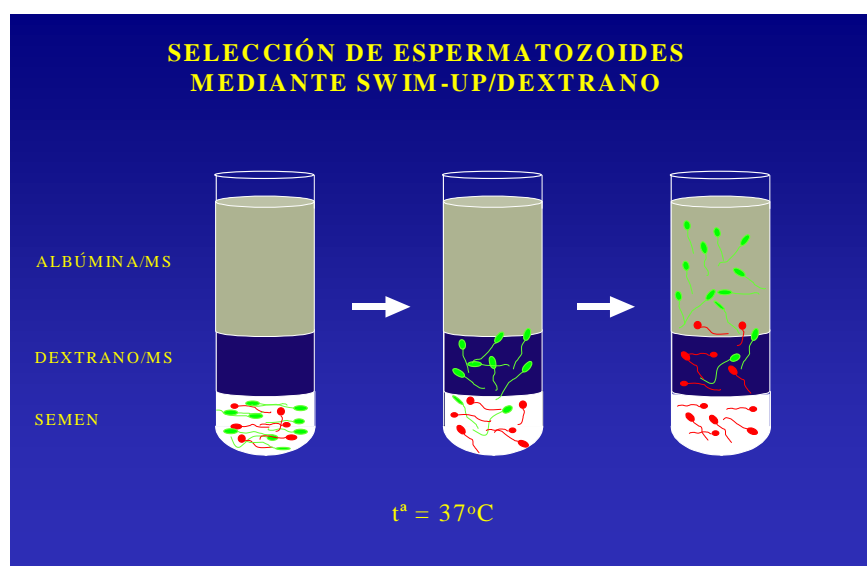
##### 3.1.2. MÉTODO DE SWIM-UP/DEXTRANO

---

Con el fin de eliminar el plasma seminal y/o restos celulares de las muestras frescas, se utilizó el método de *swim-up/dextrano*. La eliminación del plasma seminal resulta conveniente debido al efecto perjudicial que éste ejerce en el mantenimiento de las células espermáticas (Mortimer, 1994), así como para evitar la influencia de sus componentes en los resultados obtenidos.

El método de *swim-up/dextrano* puesto a punto en nuestro laboratorio por García- López y col. (Garcia-Lopez et al., 1996) está basado en el descrito por Álvarez para espermatozoides humanos (Alvarez et al., 1993), pero se modificaron tanto alguno de los pasos del proceso como la composición del medio para su aplicación en

el lavado de espermatozoides ovinos. El medio utilizado fue el MS, compuesto por NaCl 50 mM, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,4 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 mM, HEPES 21 mM, glucosa 2,8 mM, piruvato sódico 0,33 mM, lactato sódico 18,6 mM, sacarosa 200 mM, pH 6,5. Al medio se le añadieron 1,5 UI/ml de penicilina y 15 µg/ml de estreptomicina para evitar su contaminación. Este medio no contenía ni CaCl<sub>2</sub> ni NaHCO<sub>3</sub> para evitar una capacitación prematura de las células (Grasa *et al.*, 2004).



**Figura 3.1** Esquema del método de selección de espermatozoides mediante *swim-up/dextrano*.

Para la realización del *swim-up* se pipetearon cuidadosamente 500 µl de semen en el fondo de un tubo redondeado de 15 mm de diámetro como se aprecia en la figura 3.1. Sobre el semen se depositaron 500 µl de MS-Dx (30 mg dextrano/ml MS) y a continuación, muy lentamente se añadieron 1,5 ml de MS-A (5 mg albúmina sérica bovina/ml MS). Pasados 15 minutos a 37 °C, se recogieron 750 µl del sobrenadante. El proceso se repitió otras tres veces consecutivas, obteniéndose un total de cuatro sobrenadantes. Se desechó el primer sobrenadante por contener restos del plasma seminal, y se trabajó posteriormente con la mezcla de los tres restantes. Esta técnica

no es un simple método de lavado, ya que presenta la doble ventaja de obtener una población espermática libre de plasma seminal, al tiempo que está enriquecida en espermatozoides altamente móviles y viables(Garcia-Lopez *et al.*, 1996).

---

### 3.1.3. CAPACITACIÓN IN VITRO

---

Para inducir la capacitación espermática *in vitro*, a partir de las muestras previamente seleccionadas mediante *swim-up*, se introdujeron alícuotas de  $1,6 \times 10^8$  cels./ml en una estufa de incubación a 39 °C, con 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad, durante 3 horas. Las incubaciones se llevaron a cabo en medio TALP completo (Parrish *et al.*, 1988), compuesto por NaCl 100 mM, KCl 3,1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 mM, lactato sódico 21,6 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,4 mM, HEPES 10 mM, piruvato sódico 1 mM y glucosa 5 mM; se añadieron 5 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA), y se ajustó su pH a 7,2.

Además, a todas las alícuotas excepto a la muestra control, se les añadió una mezcla de sustancias al medio TALP, con probada capacidad para inducir la capacitación *in vitro* de los espermatozoides ovinos(Colas *et al.*, 2008), y que se denominará **cocktail** a lo largo de la presente memoria. El *cocktail* estaba compuesto por dibutiril-cAMP (db-cAMP, un análogo del AMPc; 1 mM), cafeína y teofilina (ambos inhibidores de fosfodiesterasas; 1 mM, cada uno), ácido okadaico (OA, un inhibidor de fosfatasas de amplio espectro; 0,2 µM) y metil-β-ciclodextrinas (M-β-CD; 2,5 mM).

La melatonina utilizada en los experimentos se disolvió en PBS con dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadió a determinadas alícuotas espermáticas a una concentración final de 1 µM, 10 nM y 100 pM, respectivamente. La concentración final de DMSO en todas las muestras fue de 0,1%, incluidas las muestras control.

La nomenclatura que se seguirá a lo largo de todo el trabajo será: **swim-up** (muestra libre de plasma seminal sin incubar en condiciones capacitantes), **control** (incubada en medio TALP), **cocktail** (medio TALP + sustancias elevadoras del AMPc), **100 pM** (medio TALP + sustancias elevadoras del AMPc + 100 pM de melatonina),



**10 nM** (medio TALP + sustancias elevadoras del AMPc + 10 nM de melatonina)  
y **1 μM** (medio TALP + sustancias elevadoras del AMPc + 10 μM de melatonina).

La cantidad de medio TALP añadido a cada una de las alícuotas dependió de la cantidad de muestra de *swim-up* necesaria para tener la adecuada concentración celular ( $1,6 \times 10^8$  cels./ml), una vez descontado el volumen de los reactivos añadidos en cada caso, hasta alcanzar un volumen final de 500 μl.

---

## 3.2. EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS

---

---

### 3.2.1. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

---

La determinación de la concentración de las muestras espermáticas obtenidas tras el *swim-up* se calculó por duplicado usando una cámara de Neubauer (Marienfeld, Germany), tras una dilución 1/100 con agua. Se colocó una gota de 6 μl en la cámara y se observó con 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:

$$C = \text{nº espermatozoides contados} \times 10^4 \text{ ml} \times \frac{1}{\text{dilución}} = \text{espermatozoides/ml}$$

---

---

### 3.2.2. VIABILIDAD CELULAR (INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA)

---

La viabilidad espermática se valoró mediante el método descrito por Harrison y Vickers (1990), conocido como método del ioduro de propidio/diacetato de carboxifluoresceína (PI/CFDA). Esta técnica se basa en la distinta coloración que presentan los espermatozoides tras su incubación con estos dos colorantes, en función de su viabilidad, entendida ésta como integridad de membrana. Se consideraron viables los espermatozoides teñidos de color verde ya que ello implicaba que su membrana estaba íntegra al presentar impermeabilidad al ioduro de propidio y estas células tenían capacidad de hidrolizar, mediante esterasas, el diacetato de carboxifluoresceína, que es incoloro, a carboxifluoresceína, lo cual da como resultado el color verde. Los espermatozoides con coloración roja se consideraron inviables, ya

que la membrana dañada es permeable al yoduro de propidio, el cual penetra en el interior de la célula y le proporciona el color rojo.

Las muestras seleccionadas por *swim-up* se diluyeron 1:60 y las alícuotas sometidas a capacitación 1:5 con medio de bifase (sacarosa 0,25 M, EGTA 0,1 mM, tampón fosfato sódico (pH 7,5) 4 mM, tampón HEPES 10x 10% (v/v)). A continuación se procedió a la tinción con diacetato de carboxifluoresceína (10 µM en DMSO) y yoduro de propidio (7,3 µM en agua destilada), tras previa adición de formaldehído 1,7 mM para la inmovilización de las células con objeto de lograr una mejor evaluación. Seguidamente las muestras se incubaron en estufa y en oscuridad a 37 °C durante 15 minutos.

Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo FC 500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA), que usa un láser de argón a 488 nm. La fluorescencia verde debida al diacetato de carboxifluoresceína se detectó usando un filtro de banda a 525 nm (FL-1), mientras que para la señal roja debida al yoduro de propidio se usó un filtro de 675 nm (FL-4). Se contaron un total de 10.000 eventos, con una media de 500-1.000 eventos/segundo, y se diferenciaron espermatozoides PI-/CFDA+ (con membrana intacta) y espermatozoides PI+ (con membrana dañada).

---

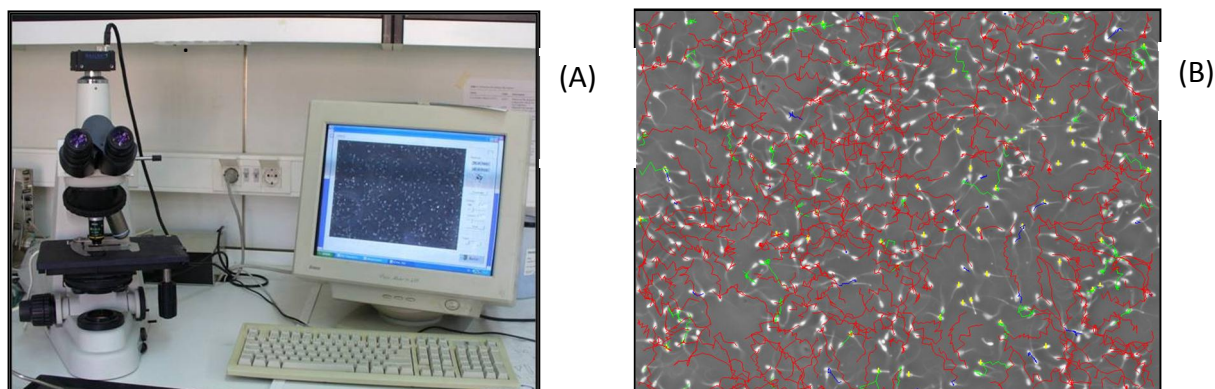
### 3.2.3. MOTILIDAD ESPERMÁTICA

---

Se evaluó utilizando un sistema computarizado de análisis espermático (CASA, *computer assisted semen analysis*), concretamente el ISAS 1.0.4 (Proiser SL, Valencia, España). Para ello se colocó una gota de 6 µl de muestra *swim-up* diluida en medio bifase 1:10 y muestra capacitada sin diluir entre un porta- y un cubre-objetos previamente atemperados, y se observó con objetivo 10x en un microscopio de contraste de fase a través de un monitor de ordenador equipado con el sistema CASA.

Se analizaron al menos cinco campos por gota y un mínimo de dos gotas por muestra. El programa es capaz de integrar las imágenes captadas mostrando la trayectoria de los espermatozoides y clasificándolos en función de su movimiento en estáticos y móviles (lentos, medios y rápidos) (Figura 3.2.). El equipo también

proporciona los valores medios de numerosos parámetros cinéticos, que aparecen recogidos en la Tabla 3.3.



**Figura 3.2. (A)** Equipo de análisis de la motilidad espermática . **(B)** Análisis de la imagen microscópica (objetivo de 10x) integrada por el programa ISAS (*Integrated Semen Analysis System*). Aparecen marcados los espermatozoides estáticos (en amarillo), y la trayectoria de los espermatozoides móviles lentos (azul), medios (verde) y rápidos (rojo).

**Tabla 3.3.** Diferentes parámetros cinéticos analizados por un sistema CASA.

PARÁMETRO	UNIDAD	DEFINICIÓN
VELOCIDAD CURVILÍNEA (VCL)	$\mu\text{m/s}$	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo
VELOCIDAD RECTILÍNEA (VSL)	$\mu\text{m/s}$	Distancia recorrida por el espermatozoide desde el primer punto hasta el último de su trayectoria.
VELOCIDAD MEDIA (VAP)	$\mu\text{m/s}$	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media en función del tiempo.

ÍNDICE LINEARIDAD (LIN)	%	Relación porcentual entre la VSL y la VCL
ÍNDICE RECTITUD (STR)	%	Relación porcentual entre la VSL y la VAP
ÍNDICE DE OSCILACIÓN (WOB)	%	Relación porcentual entre la VAP y la VCL
AMPLITUD DEL DESPLAZAMIENTO LATERAL DE LA CABEZA (ALH)	$\mu\text{m/s}$	Desplazamiento medio efectuado por la cbeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
FRECUENCIA DE BATIDA DE COLA (BCF)	Hz	Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la lineal o media en función del tiempo
MÓTILES NO PROGRESIVOS (MNP)	%	Porcentaje de espermatozoides que se mueven sin desplazamiento apreciable.
MÓTILES PROGRESIVOS (MP)	%	Porcentaje de espermatozoides móviles.
ESTÁTICOS	%	Porcentaje de espermatozoides que no presentan motilidad de ningún tipo.

También se determinó el porcentaje de espermatozoides hiperactivados en las diferentes muestras espermáticas al finalizar el *swim-up*, y tras 1 y 3 horas de incubación en condiciones capacitantes. Se realizó teniendo en cuenta dos parámetros cinéticos de los espermatozoides móviles en base a resultados previos de nuestro grupo de investigación (Colas *et al.*, 2010): LIN (índice de linealidad) y ALH (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza). Los espermatozoides se consideraron hiperactivados cuando mostraron un valor de  $\text{LIN} \leq 45\%$  y de  $\text{ALH} \geq 3,5 \mu\text{m}$ .

---

### 3.2.5 EVALUACIÓN DEL ESTADO DE CAPACITACIÓN

---

La clorotetraciclina (CTC) es un antibiótico que se liga a los cationes asociados a la membrana, especialmente el  $\text{Ca}^{2+}$  (Caswell *et al.*, 1971). Al penetrar en la célula espermática, la CTC se une al calcio libre y se vuelve más fluorescente (Ericsson, 1967). La unión de la CTC al calcio (preferentemente en la membrana celular) da lugar a patrones característicos de tinción. Dependiendo de los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide, existen diferentes patrones de fluorescencia que permiten hacer una diferenciación entre células no capacitadas, capacitadas y reaccionadas (Fraser *et al.*, 1995). En este estudio se utilizó una versión modificada del ensayo descrito por Ward and Storey (Ward *et al.*, 1984) y validada para semen ovino por nuestro grupo de investigación (Grasa *et al.*, 2006).

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

Para realizar la tinción se mezclaron 20  $\mu\text{l}$  de muestra (las de *swim-up* diluidas 1:10 en medio bifase y las muestras capacitadas sin diluir) y 20  $\mu\text{l}$  de la solución de CTC y se fijó con 5  $\mu\text{l}$  de una solución de paraformaldehído (paraformaldehído al 12,2% (p/v) en tampón Tris-HCl 0,5M, pH 7,4). Se puso una alícuota de 6  $\mu\text{l}$  de cada muestra en un portaobjetos y se le añadieron 4  $\mu\text{l}$  de *DABCO* (antifading, Sigma Chemical Co., Madrid, Spain) para conservar la fluorescencia; se colocó el cubreobjetos y se selló la preparación con esmalte transparente, siempre realizando los procesos protegidos de la luz. Se observó con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E-400 equipado con filtro V-2A, se evaluaron unos 200 espermatozoides utilizando un objetivo de inmersión (1000x). Se distinguieron tres tipos de espermatozoides distintos según el patrón de tinción: 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 con el acrosoma reaccionado (AR, no mostrando fluorescencia en la cabeza) como se observa en la figura 3.4.

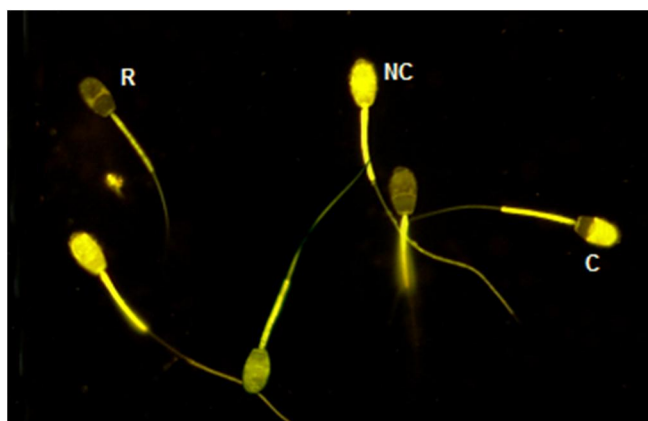


Figura. 3.4. Espermatozoides ovinos con tinción de CTC vistos con microscopía de fluorescencia en filtro longitud de onda azul y 1000 x. Se pueden distinguir espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C), y reaccionados (R)

---

### 3.2.6 ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DEL CALCIO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

---

El  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se valoró en las muestras seleccionadas por *swim-up* (diluidas 1:10 en medio de bifase) y muestras capacitadas (diluidas 1:5) a los diez minutos, 1 hora 3 horas de incubación *in vitro* en condiciones capacitantes. A continuación, se procedió a la tinción con 2  $\mu\text{l}$  de la sonda fluorescente Fluo-4 AM, (Molecular probes, Eugene, Oregon, USA; 5  $\mu\text{M}$  en 0,04% de ácido plurónico y 0,25% de DMSO) y 2  $\mu\text{l}$  de ioduro de propidio (PI) (Gee *et al.*, 2000). Tras 15 minutos a 37 °C, se fijaron las muestras con formaldehído 1,7 mM, se centrifugaron a 600 g/5 minutos y se resuspendió el pellet en 300  $\mu\text{l}$  de PBS para eliminar el exceso de fluorescencia. El análisis de las muestras se realizó en un citómetro FC 500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Las células se excitaron con un láser de argón a 488 nm. La fluorescencia de Fluo-4 AM se detectó usando un filtro de banda a 525 nm (FL-1), mientras que el ioduro de propidio (PI) se detectó con un filtro a 675 nm (FL-4), ambos en escala logarítmica. Se analizaron un total de 10.000 eventos, con una media de 500-1.000 eventos/segundo. Se excluyeron las células muertas (PI positivas) y se calculó la intensidad media de la fluorescencia correspondiente a Fluo-4 AM (X-Mean) de las células vivas (PI negativas)

---

### 3.2.7 ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

---

El método está basado en el uso de H<sub>2</sub>DCFDA, un colorante permeable, que atraviesa las membranas celulares y es hidrolizado por esterasas intracelulares, dando lugar a H<sub>2</sub>DCF, que es no permeable y no fluorescente. El H<sub>2</sub>DCF es oxidado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diclorofluoresceína (DCF), que emite fluorescencia a 530 nm tras su excitación a 488 nm. Se combinó con ioduro de propidio (PI), para discriminar entre células vivas y muertas (Guthrie *et al.*, 2006).

Las muestras se prepararon a una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml en medio de bifase, se incubaron con 1 µM H<sub>2</sub>DCFDA y 2,5 µg/ml de PI durante 15 minutos a 37 °C en oscuridad, y se fijaron con formaldehído 1,7 mM. Tras la incubación, las muestras se analizaron mediante un citómetro de flujo Beckman Coulter FC 500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). La fluorescencia correspondiente a la diclorofluoresceína (DCF), se recogió en el fotodetector FL1 y la del PI en el FL4. Se excluyeron las células muertas (PI positivas) y se calculó la intensidad media de la fluorescencia correspondiente a la DCF (X-Mean) de las células vivas (PI negativas).

---

### 3.2.8 ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE AMP CÍCLICO

---

La concentración de AMPc en las muestras se midió con un inmuno-ensayo usando el kit *cAMP Enzyme Immunoassay Kit, Direct* (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA ), de acuerdo con las especificaciones indicadas por el fabricante. Las muestras fueron tratadas con HCl 0,1M para detener la actividad fosfodiesterasa endógena. Y también en este caso, las muestras se acetilaron para aumentar la sensibilidad del ensayo debido a los bajos niveles intracelulares de AMPc en muestras espermáticas. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, utilizando un anticuerpo policlonal, que se une de forma competitiva al AMPc de la muestra o de la fosfatasa alcalina unida covalentemente a AMPc.

Los estándares y las muestras, conjugadas con fosfatasa alcalina, y el anticuerpo primario se incubaron a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario. El exceso de los reactivos se eliminó y se añadió por último el substrato. Tras todo esto, la reacción se detuvo y se generó un color amarillo que se leyó en un lector de placa multipocillos a 405 nm. La intensidad de este color amarillo es inversamente proporcional a concentración de AMPc. Se utilizó la densidad óptica para calcular la concentración.

---

### 3.3 DETECCIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE RESIDUOS DE TIROSINA DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA ESPERMÁTICAS POR WESTERN BLOTING

---

---

#### 3.3.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS

---

Se procedió a extraer las proteínas de membrana, por el método descrito por Colás y col. (Colas *et al.*, 2008). A 200 µl de muestra tanto del *swim-up* como capacitadas *in vitro* (control, *cocktail* y *cocktail* con las diferentes concentraciones de melatonina) conteniendo  $8 \times 10^7$  células/ 500µl se les añadieron 100 µl del medio de extracción (*ESB*, *Extraction Sample Buffer*), compuesto por 2% de SDS (dodecil sulfato sódico, p/v), TRIS-HCl 0,0626 mM (pH 6,8), 0.002% de azul de bromofenol diluido en glicerol al 10 % (siendo la concentración final de glicerol del 1%), e inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA).

La mezcla se incubó inmediatamente durante 5 minutos a 100 °C en baño de arena. Después se centrifugó a 13000 g, 5 minutos, a temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante, desechando el pellet formado. Finalmente, se añadieron 2-mercaptoetanol y glicerol, a una concentración final del 5% y el 1%, respectivamente, y los lisados se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis.



---

### 3.3.2. SDS-PAGE E INMUNOBLOTTING

---

Las proteínas se separaron en una dimensión siguiendo el método Laemmli (Laemmli, 1970), utilizando patrones de comparación de pesos moleculares, de 10 a 250 kDa (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Se utilizaron geles de acrilamida del 10% y las condiciones de electroforesis fueron 130 V durante 90 min. a 4 °C. Una vez separadas las proteínas, fueron transferidas a una membrana de Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA, USA), utilizando una unidad de transferencia en húmedo, modelo Mini-Protean 3 Cell y el módulo Mini Trans-Blot® de *BioRad* (BioRad, Hercules, CA)

Una vez realizada la transferencia de las proteínas, los sitios no específicos de las membranas se bloquearon incubándolas 1 hora con 5% BSA (w/v), a temperatura ambiente en un tampón fosfato salino (NaCl 136 mM, KCl 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/l, y Tween-20 0,5%, pH 7,4).

La detección de la fosforilación de tirosinas de las proteínas de membrana se realizó a través de la incubación con el anticuerpo primario monoclonal anti-fosfotirosinas (clone 4G10®; Merck Millipore, Darmstadt, Germany), diluido 1/1000 en 0,1 PBS Tween-20 con 1% BSA durante toda la noche a 4 °C. Tras realizar tres lavados de 10 minutos de duración con 0,1% PBS Tween-20, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario inmunoglobulina G anti-ratón HRP-conjugado (1/40000; GE Healthcare-Amersham, Little Chalfont, UK) diluido 1/15000, durante 1 hora y 15 minutos temperatura ambiente en semioscuridad. Finalmente, las membranas se escanearon utilizando el Odissey Clx (Pierce ECL Western Blotting Detection System; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA.) y se cuantificó la señal para determinar la intensidad relativa de las bandas de fosfotirosinas de las proteínas con el programa Quantity One software (Bio Rad, Hercules, CA, USA).

---

### 3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

---

Los resultados se muestran como la media  $\pm$  S.E.M. (error estándar de la media) del número de muestras indicadas en cada caso. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo a través del software *GraphPad InStat* (3.01; San Diego, CA, USA). Se realizó el análisis estadístico ANOVA para determinar si existían diferencias significativas en la cantidad de ROS, de calcio intracelular y en la cuantificación de las fosfotirosinas de las proteínas espermáticas entre los diferentes grupos. Y se realizó el análisis estadístico  $\chi^2$  comparando todas las muestras para determinar si existían diferencias significativas en la motilidad, en el estado de capacitación y en la viabilidad celular.

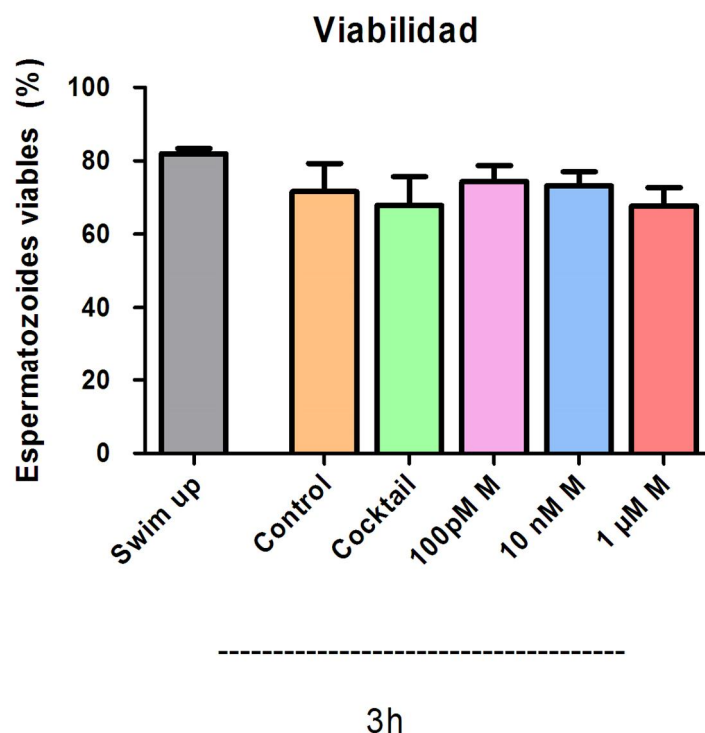
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 4.1. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA INTEGRIDAD DE MEMBRANA DE MUESTRAS CAPACITADAS

---

Como se observa en la figura 4.1., el proceso de capacitación no afectó significativamente a la integridad de la membrana espermática. La viabilidad de la muestra obtenida tras el *swim-up*, ( $81,98 \pm 1,42\%$ ) disminuyó tras tres horas de incubación en condiciones capacitantes, ligeramente en las muestras control y más acusadamente en las incubadas con el medio *cocktail* ( $71,60 \pm 7,71\%$  y  $67,90 \pm 7,81\%$ , respectivamente), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Este mayor descenso en el porcentaje de espermatozoides viables en las muestras capacitadas en un medio que incrementa el AMPc en comparación con el medio TALP coincide con otros resultados de nuestro grupo (Colas *et al.*, 2010; Luna *et al.*, 2015) y podría explicarse por una mayor desestabilización de la membrana espermática concomitante con un mayor grado de capacitación. La incubación con diferentes concentraciones de melatonina tampoco afectó significativamente a la viabilidad celular, obteniéndose valores de  $74,40 \pm 4,33\%$ ,  $73,22 \pm 3,18\%$  y  $67,74 \pm 4,98\%$  en las muestras incubadas con 100 pM, 10 nM y 1  $\mu$ M respectivamente.

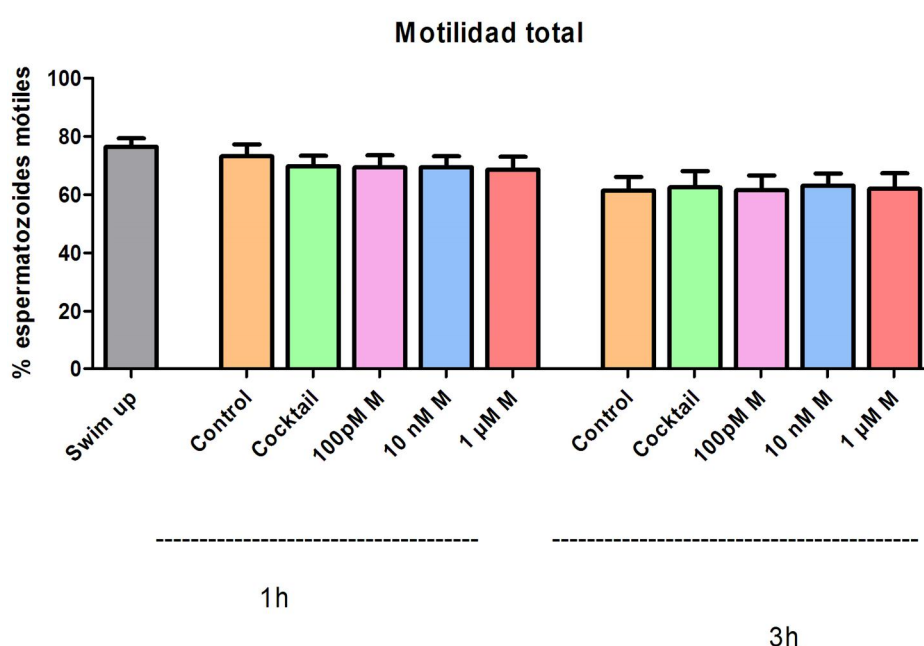


**Figura 4.1.** Porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra (CFDA +/PI-) antes de la capacitación (*swim up*) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>), en medio TALP (control), con alto AMPc (*cocktail*) y con diferentes concentraciones de melatonina (M) añadidas al medio *cocktail*. Los valores se representan como media  $\pm$  S.E.M. (n=5)

En un estudio previo de nuestro grupo de investigación realizado en condiciones similares pero incubando en un medio no capacitante, estas mismas dosis de melatonina tampoco influyeron en la viabilidad celular (Casao *et al.*, 2010). Sin embargo, otros autores han descrito que la incubación con melatonina incrementa el porcentaje de espermatozoides viables en la especie humana (du Plessis *et al.*, 2010) y en la especie porcina (Martin-Hidalgo *et al.*, 2011).

## 4.2 EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA DE MUESTRAS CAPACITADAS

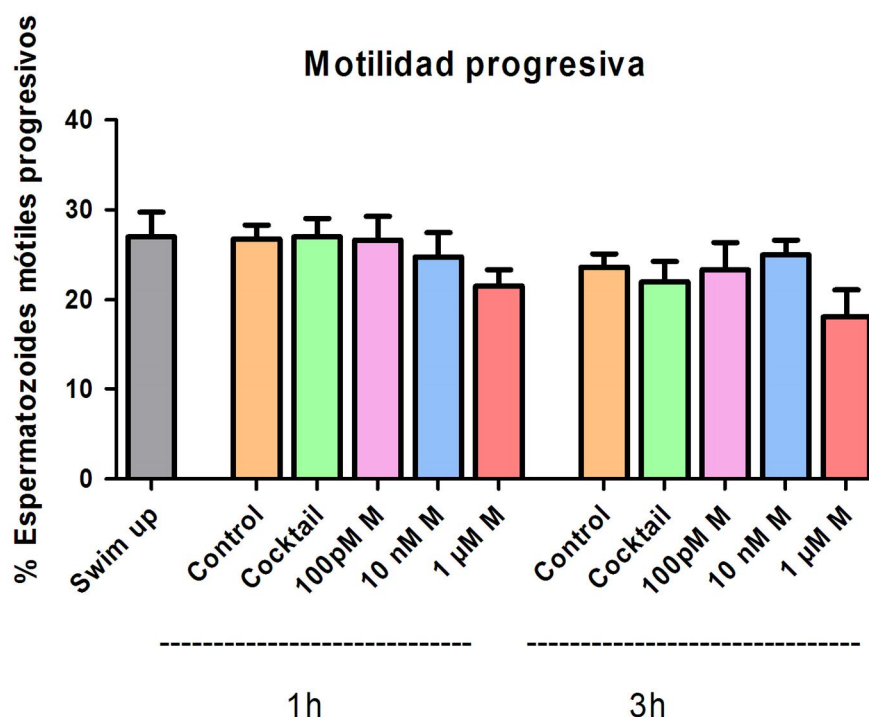
El porcentaje de espermatozoides móviles totales (Fig 4.2.) obtenidos tras el *swim-up* ( $76,44 \pm 2,89\%$ ) se mantuvo prácticamente sin cambios tras una hora de incubación en condiciones capacitantes en la muestra control ( $73,22 \pm 4,03\%$ ) y disminuyó ligeramente en las muestras en medio *cocktail*, solo ( $69,75 \pm 3,66\%$ ) o con distintas concentraciones de melatonina ( $69,33 \pm 4,21\%$ ,  $69,44 \pm 3,79\%$  y  $68,87 \pm 4,41$  con 100pM, 10nM y 1μM respectivamente), aunque esta disminución no fue estadísticamente significativa.



**Figura 4.2.** Porcentaje de espermatozoides móviles antes de la capacitación (*swim up*) y tras 1 y 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>), en medio TALP (control), con alto AMPc (*cocktail*) y con diferentes concentraciones de melatonina añadidas al medio *cocktail*. Los valores se representan como media  $\pm$  S.E.M. (n=5)

Tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes se pudo observar un descenso de la motilidad total en todas las muestras estudiadas, aunque de nuevo sin observarse diferencias significativas ni entre grupos ni con la muestra inicial. El porcentaje de espermatozoides móviles en todas las muestras se mantuvo en torno al 62%.

En cuanto al porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (Fig 4.3.) el valor inicial ( $27,00 \pm 2,73\%$ ) se mantuvo tras una hora de incubación en todas las muestras excepto las que contenían una concentración  $1 \mu\text{M}$  de melatonina, en la que este porcentaje disminuyó hasta  $21,56 \pm 1,78\%$ , si bien este descenso no fue significativo.



**Figura 4.3.** Porcentaje de espermatozoides mótils progresivos antes de la capacitación (*swim up*) y tras 1 y 3 horas de incubación en condiciones capacitantes ( $39^\circ\text{C}$  y  $5\%$  de  $\text{CO}_2$ ), en medio TALP (control), con alto AMPc (*cocktail*) y con diferentes concentraciones de melatonina (M) añadidas al medio *cocktail*. Los valores se representan como media  $\pm$  S.E.M. ( $n=5$ )

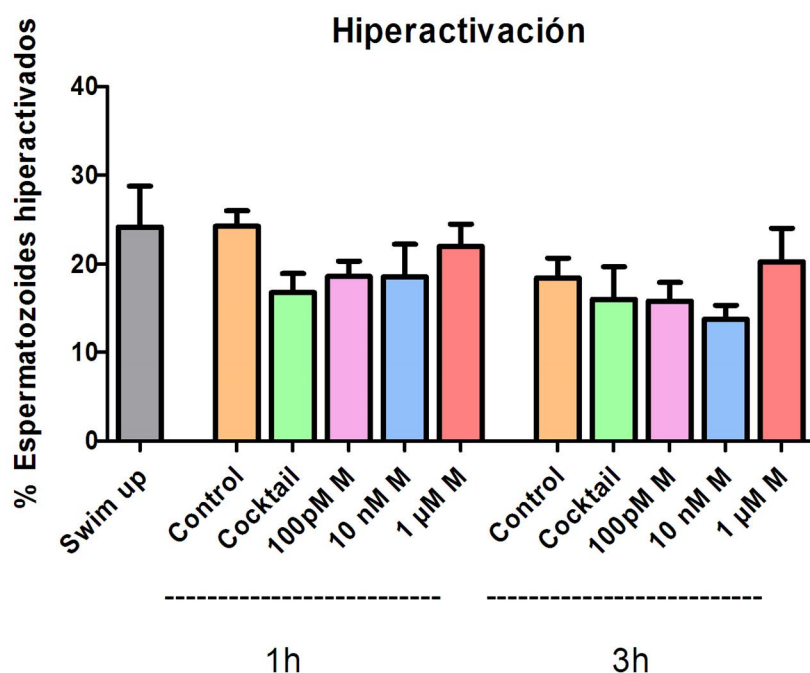
Tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes, todas las muestras presentaron valores inferiores a los iniciales, aunque los descensos no fueron estadísticamente significativos. La muestra incubada con  $10 \text{ nM}$  de melatonina fue la que mejor mantuvo la motilidad progresiva de los espermatozoides ( $25,00 \pm 1,64\%$ ) en contraposición con la tratada con  $1 \mu\text{M}$  de melatonina, que mostró la menor motilidad progresiva ( $18,11 \pm 3,01\%$ ).

Los resultados del efecto de la melatonina sobre la motilidad espermática en diferentes especies de mamíferos son contradictorios. Así, mientras algunos autores han descrito que la incubación *in vitro* con melatonina mejora la motilidad en espermatozoides de toro (Ashrafi *et al.*, 2013) cerdo (Martin-Hidalgo *et al.*, 2011) y humanos (Ortiz *et al.*, 2011), otros, entre ellos nuestro grupo, no encontraron diferencias significativas en la motilidad total, progresiva ni en los parámetros cinéticos en comparación con las muestras control (Casao *et al.*, 2010). En los experimentos realizados en el presente trabajo, las condiciones son diferentes, ya que se trata de muestras incubadas en un medio que da lugar a un incremento de AMPc, y que está descrito como inductor de la capacitación en la espermatozoides ovino (Colas *et al.*, 2008). La capacitación va asociada con cambios en el patrón de movimiento, y concretamente con un descenso en la motilidad progresiva, con lo que los cambios observados en el presente trabajo, si bien no son significativos, podrían sugerirnos un efecto diferente de las distintas concentraciones de melatonina sobre la capacitación.

Para profundizar más en los cambios en el patrón de movimiento asociados con la capacitación se decidió analizar, usando igualmente la información proporcionada por el programa CASA, el porcentaje de espermatozoides hiperactivados. La hiperactivación flagelar es un cambio en el patrón de movimiento caracterizado por una menor linealidad y una mayor amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza que proporciona una mayor posibilidad de interacción con el ovocito. En base a resultados publicados de nuestro grupo para la especie ovina (Colas *et al.*, 2010) consideramos espermatozoides hiperactivados aquellos con LIN  $\leq 45\%$  y ALH  $\geq 3,5\mu\text{m}$ .

Como se puede observar en la Figura 4.4., el porcentaje de espermatozoides hiperactivados antes de la capacitación fue de  $24,18 \pm 4,61\%$ . Este valor se mantuvo tras una hora de incubación en las muestras control y con  $1\mu\text{M}$  de melatonina ( $24,27 \pm 1,75\%$  y  $22,02 \pm 2,51\%$ , respectivamente). Sin embargo, se observó una disminución del porcentaje de espermatozoides hiperactivados en la muestra *cocktail*,  $100\text{ pM}$  y  $10\text{ nM}$  ( $16,81 \pm 2,13\%$ ,  $18,63 \pm 1,70\%$  y  $18,59 \pm 3,66\%$ , respectivamente) aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados no coinciden con los esperados, ya que, como se ha comentado, la hiperactivación flagelar, es uno de los eventos asociados a la capacitación en la mayoría de las especies. Sin embargo,

aunque ambos procesos comparten elementos comunes, parece ser que la activación de dichos procesos pueden ocurrir de manera independiente (Suarez, 2008).



**Figura 4.4.** Porcentaje de espermatozoides hiperactivados antes de la capacitación (*swim up*) y tras 1 y 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>), en medio TALP (control), con alto AMPc (*cocktail*) y con diferentes concentraciones de melatonina (M) añadidas al medio *cocktail*. Los valores se representan como media  $\pm$  S.E.M. (n=5)

Con el paso del tiempo en condiciones capacitantes, el porcentaje de espermatozoides hiperactivados siguió disminuyendo tanto en la muestra control ( $18,44 \pm 2,24\%$ ) como en las muestras incubadas con 100 pM y 10 nM de melatonina ( $15,85 \pm 2,09\%$  y  $13,82 \pm 1,57\%$  respectivamente), y se mantuvo prácticamente igual en la muestra cocktail ( $16,03 \pm 3,67\%$ ). Curiosamente, en la muestra incubada con 1μM de melatonina se observó el mayor porcentaje de espermatozoides hiperactivados a las 3 horas de incubación ( $20,29 \pm 3,75\%$ ), aunque las diferencias tampoco fueron significativas. Esta muestra también es la que presentaba menor porcentaje de



espermatozoides con motilidad progresiva, indicativo también de una menor linealidad. Estos resultados coincidirían con estudios llevados a cabo en hámster que han demostrado que la melatonina produce hiperactivación en espermatozoides de esta especie (Fujinoki, 2008).

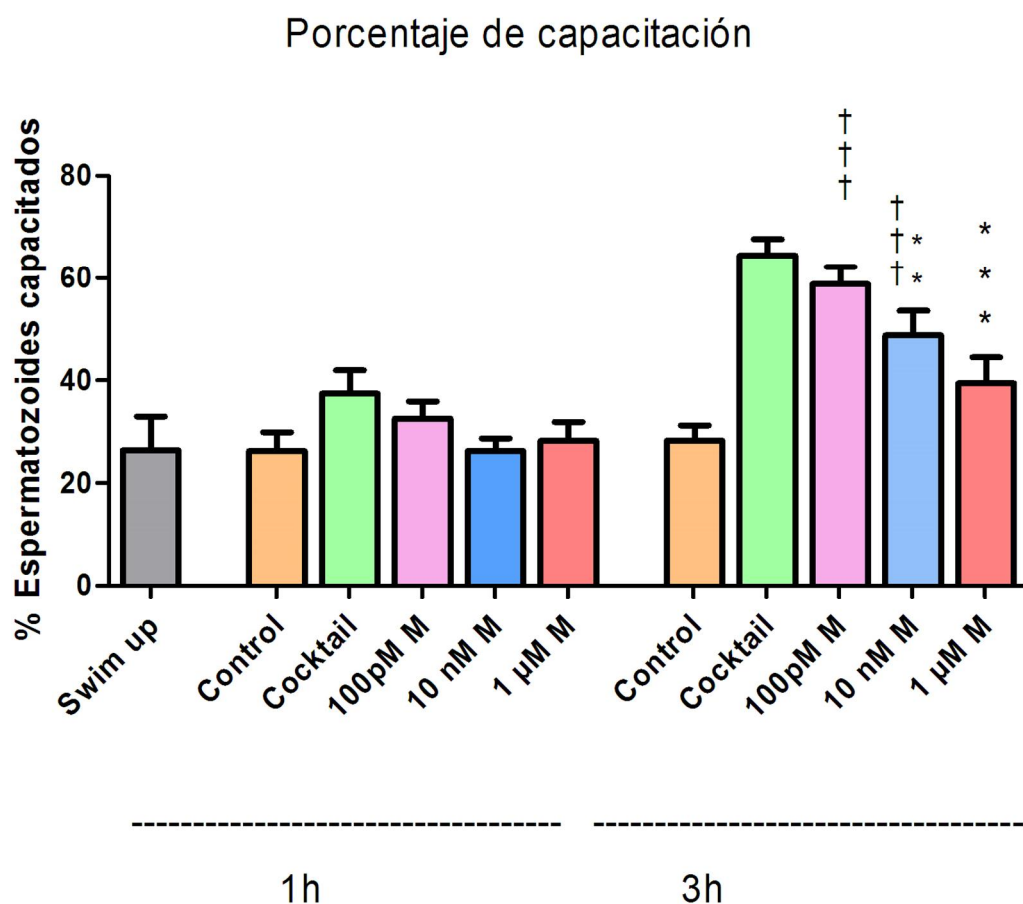
Para poder tener una idea más detallada de este proceso de hiperactivación sería necesario analizar de forma más profunda todas las subpoblaciones de las muestras mediante un análisis de componentes principales (PCA) como el que nuestro grupo está empezado a utilizar en el estudio de la motilidad espermática. También se podría recurrir a otros métodos de análisis como la medición de la curvatura en diferentes puntos a lo largo del flagelo de cada espermatozoide de la muestra (Ohmuro *et al.*, 2006) (Yanagimachi, 1994).

---

#### 4.3 EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DEL CALCIO

---

Como se aprecia en la figura 4.5., tras una hora de incubación en condiciones capacitantes, el porcentaje de espermatozoides capacitados evaluados mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC), en la muestra *cocktail* aumentó con respecto a la muestra inicial ( $37,40 \pm 4,56\%$  vs.  $26,40 \pm 6,57\%$ ), aunque las diferencias no fueron significativas. Sin embargo, la incubación en el medio TALP (control) no incrementó este porcentaje ( $26,20 \pm 3,68\%$ ). La incubación con melatonina disminuyó el porcentaje de espermatozoides capacitados a unos niveles semejantes a los de la muestra inicial, especialmente con 10 nM ( $26,20 \pm 2,47\%$ ) y con 1  $\mu$ M ( $28,20 \pm 3,68\%$ ), aunque sin ser diferencias significativas.



**Figura 4.5.** Porcentaje de espermatozoides capacitados según la tinción de clorotetraciclina (CTC), antes de la capacitación (*swim up*) y tras 1 y 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>), en medio TALP (control), con alto AMPc (*cocktail*) y con diferentes concentraciones de melatonina (M) añadidas al medio *cocktail*. Los valores se representan como media  $\pm$  S.E.M. (n=5 \* P<0,05, \*\* P<0,01 y \*\*\* P<0,001 comparando con la muestra *cocktail*, y † P<0,05, †† P<0,01 y ††† P<0,001 comparando con la muestra control, en el mismo tiempo de incubación).

Tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes el incremento de espermatozoides capacitados en la muestra *cocktail* fue muy notable, llegando a ser de un  $64,40 \pm 3,26\%$ , frente a un  $28,20 \pm 3,01\%$  en el grupo control (P<0,001). Esto concordaría con resultados previos de nuestro grupo que mostraron que para que se produzca la capacitación en los espermatozoides ovinos no sólo son necesarios calcio y bicarbonato, si no también sustancias que incrementen el AMPc (Colas *et al.*, 2008),

debido probablemente a la elevada cantidad de fosfodiesterasas presentes en la célula espermática de morueco.

En el caso de los grupos incubados con melatonina, y a diferencia de los resultados obtenidos en viabilidad celular, motilidad y porcentaje de hiperactivación, sí se observaron diferencias significativas entre las muestras incubadas con y sin esta hormona a las tres horas de incubación en condiciones capacitantes. Las tres concentraciones de melatonina redujeron el porcentaje de espermatozoides capacitados respecto a la muestra *cocktail*, pero fueron la concentración intermedia (10 nM) y la más alta (1 $\mu$ M) de melatonina las que disminuyeron significativamente estos valores ( $48,80 \pm 4,80\%$ ,  $p < 0,001$  y  $39,40 \pm 5,01\%$ ,  $p < 0,001$  respectivamente).

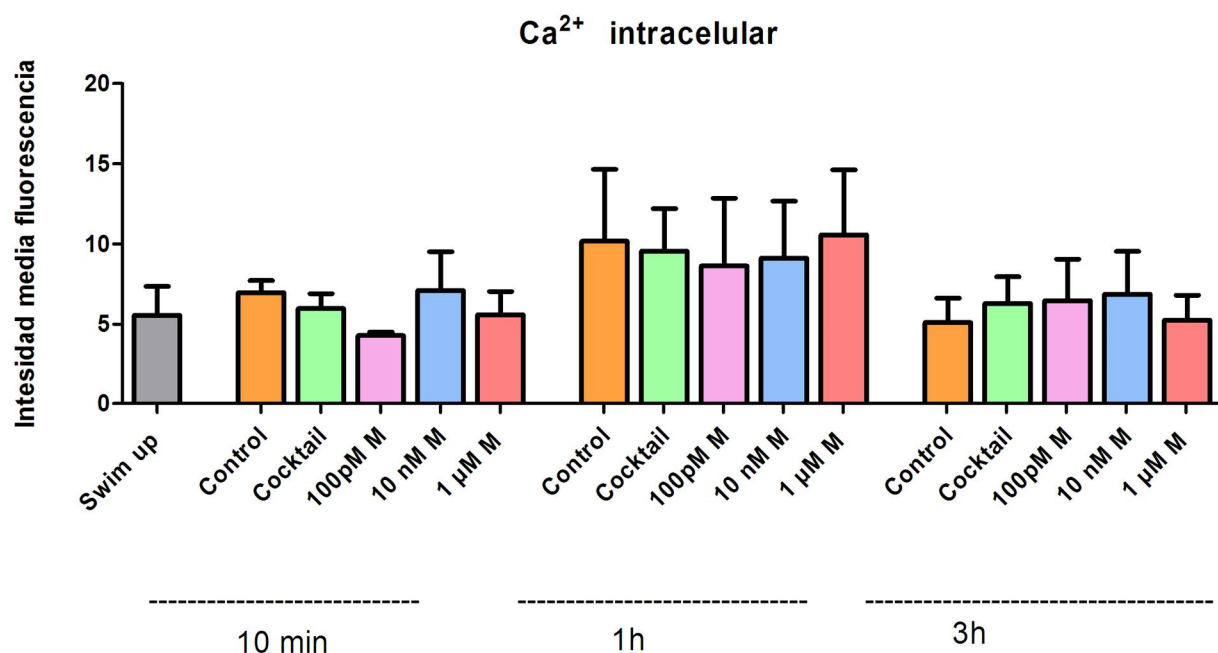
Estos datos también concordarían con los resultados previos obtenidos por nuestro grupo, en los que se describió que la melatonina puede actuar como agente capacitante y descapacitante en función de la concentración utilizada (Casao *et al.*, 2010).

---

#### 4.5 EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CANTIDAD DE CALCIO INTRACELULAR

---

Una vez observados cambios en la distribución intracelular del calcio tras la tinción con CTC, se quiso evaluar el efecto de la melatonina sobre los niveles de ese ion en el interior de los espermatozoides, ya que se ha descrito que existe un incremento de calcio intracelular durante la capacitación (Ho *et al.*, 2003). Como en algunos trabajos previos se describe un aumento rápido del  $\text{Ca}_i^{2+}$  en los primeros minutos tras incubación en condiciones capacitantes (Colas *et al.*, 2010) en este ensayo se incluyó un análisis de las muestras a los 10 minutos de incubación.



**Figura 4.6.** Intensidad media de fluorescencia emitida por la sonda Fluo-4AM y evaluada por citometría de flujo (FL1) antes de la capacitación (*swim up*) y tras 10 minutos, 1 hora y 3 horas de de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>), en medio TALP (control), con alto AMPc (*cocktail*) y con diferentes concentraciones de melatonina (M) añadidas al medio *cocktail*. Los valores se representan como media ± S.E.M. (n=5)

Como se muestra en la figura 4.6., a los 10 minutos de incubación, la intensidad de fluorescencia relacionada con la cantidad de Ca<sup>2+</sup> intracelular apenas se modificó respecto a la muestra inicial (5,58 ± 1,45%) exceptuando un ligero descenso en la muestra tratada con 100 pM de melatonina (4,28 ± 0,22%), aunque sin diferencias significativas.

Tras una hora de incubación es cuando se produjo el mayor incremento en la concentración de calcio intracelular en todas las muestras estudiadas, duplicándose la intensidad de fluorescencia, aunque con grandes variaciones en los resultados y, de nuevo, sin diferencias significativas entre ellas. Este incremento del calcio intracelular durante la capacitación ha sido previamente observado en espermatozoides humanos (Baldi *et al.*, 1991), de ratón (White and Aitken, 1989) y, más recientemente, de morueco (Colas *et al.*, 2010).

Al finalizar la incubación, los niveles de calcio intracelular volvieron a ser semejantes a los iniciales, tanto en muestra control como la incubada con 1  $\mu$ M de melatonina ( $5,11 \pm 1,51\%$  y  $5,26 \pm 1,55\%$ , respectivamente), mientras que el resto de grupos experimentales alcanzó valores ligeramente superiores ( $6,28 \pm 1,67$ ,  $6,48 \pm 2,57$  y  $6,86 \pm 2,68$ , en cocktail, 100 pM, y 10nM, respectivamente) aunque no estadísticamente significativos. Los resultados obtenidos parecen concordar con el porcentaje de espermatozoides capacitados evaluados por CTC, ya que se aprecia un ligero aumento de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las muestras incubadas con *cocktail* sólo o con 100 pM y 10 nM melatonina, en las que se había observado un mayor porcentaje de espermatozoides capacitados, mientras que las muestras con menor concentración de Ca intracelular (control y 1  $\mu$ M melatonina) también mostraron menor porcentaje de espermatozoides capacitados. No es de extrañar el hecho de que a las 3 horas de incubación se observen los mayores incrementos en los niveles de espermatozoides capacitados evaluados por CTC, mientras que los mayores niveles de calcio se aprecien tras una hora, ya que la capacitación es un proceso secuencial y en este caso se están evaluando diferentes aspectos de dicho proceso, que pueden ocurrir a distintos tiempos.

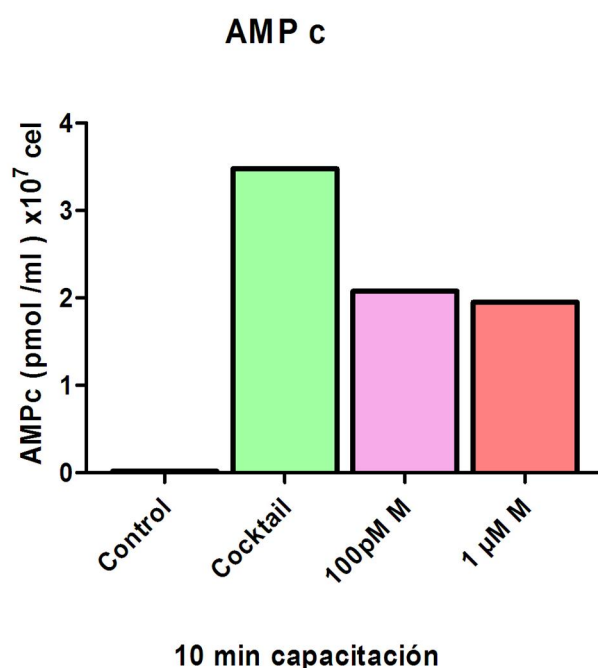
---

#### 4.6 EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE ADENIL MONOFOSFATO CÍCLICO ( AMPc)

---

La cuantificación de la concentración de AMP cíclico en las muestras espermáticas se llevó a cabo a los 10 minutos de incubación en condiciones capacitantes, ya que en estudios anteriores se había observado un pico en los niveles de este compuesto al comienzo de la capacitación (Colas *et al.*, 2010).

En la figura 4.7. se muestran los resultados obtenidos en este inmunoensayo. A los diez minutos del proceso de capacitación, la concentración de AMPc detectada en muestra control fue muy pequeña ( $0,0196 \text{ pmol/ml}/10^7$  células), mientras que en la muestra *cocktail*, incubada con compuestos que promueven la capacitación mediante el aumento de AMPc (Colas *et al.*, 2008), la concentración cuantificada fue de  $3,48 \text{ pmol/ml}/10^7$  células.



**Figura 4.7.** Concentración de AMP cíclico (pmol/ml) por cada  $10^7$  espermatozoides ovinos a los 10 minutos de incubación en condiciones capacitantes ( $39^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ ), en medio TALP (control), con alto AMPc (*cocktail*) y con diferentes concentraciones de melatonina (M) añadidas al medio *cocktail*. Resultados correspondientes a un único ensayo.

En las muestras espermáticas incubadas con melatonina se observó una cantidad de AMPc mayor que el control, pero inferior al *cocktail* (2,079 pmol/ml/ $10^7$  células y 1,952 pmol/ml/ $10^7$  células para 100 pM y 1μM de melatonina, respectivamente). Esta disminución de los niveles de AMPc observado en las muestras tratadas con melatonina con respecto a la muestra *cocktail* podría explicar su efecto en la disminución del porcentaje de espermatozoides capacitados observado mediante la tinción con CTC.

Un aumento de AMP cíclico, como ya hemos descrito en la introducción, es esencial para provocar el proceso de capacitación gracias a la activación de PKA. Esta vía AMPc/PKA es una de las principales implicada en la capacitación espermática de la mayoría de las especies de mamíferos, aunque no la única (Luna *et al.*, 2012).

Sin embargo, algunos estudios realizados en células somáticas han descrito el efecto contrario de la melatonina sobre la concentración de AMPc. Así, tanto en células epiteliales de conejo, como en una línea celular de neuroblastoma humano, se observó un incremento en el AMPc en células tratadas con melatonina (Schuster et al., 2005; Huete-Toral et al., 2015)

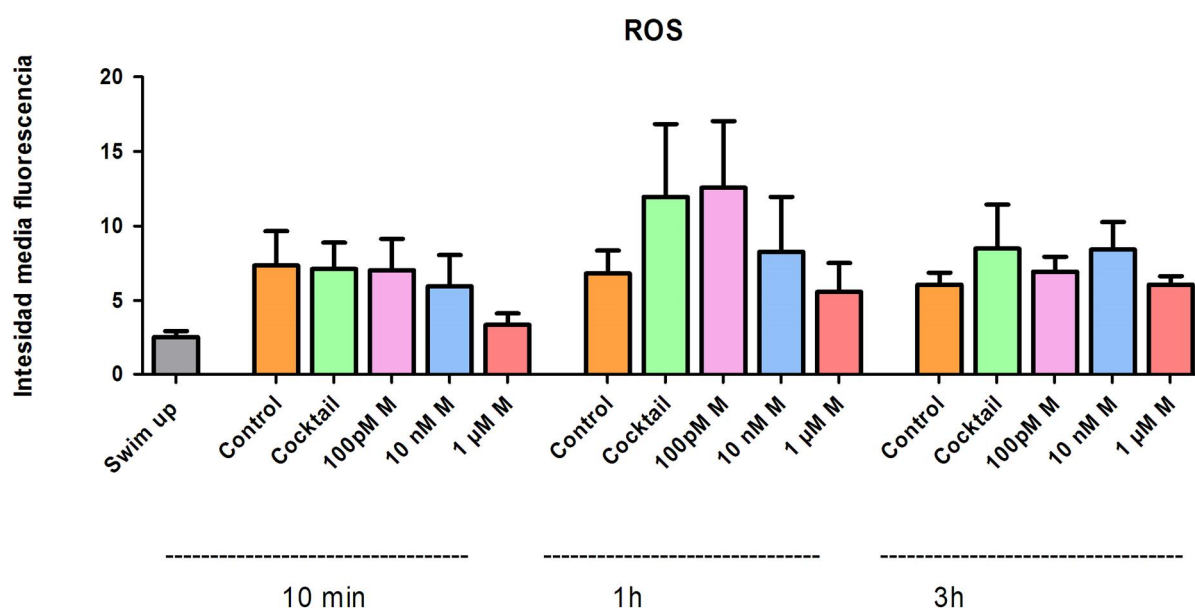
Es necesario recalcar que los resultados mostrados en el presente trabajo pertenecen a un único ensayo, que corresponde a la puesta a punto del protocolo para espermatozoides ovinos, por lo que no se ha podido realizar el análisis estadístico y evidentemente no nos permite extraer conclusiones del mismo. En un futuro se planea repetir este experimento incluyendo muestras a distintos tiempos de incubación en condiciones capacitantes para estudiar posibles cambios en la concentración de AMPc.

---

#### 4.7 EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LOS NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

---

Como muestra la figura 4.8., ya a los 10 minutos de incubación en condiciones capacitantes se observó un aumento de las especies reactivas de oxígeno tanto en muestra control ( $7,35 \pm 2,31$ ) como la muestra con *cocktail*, ( $7,12 \pm 1,76$ ) comparando con la muestra inicial ( $2,49 \pm 0,40$ ). El tratamiento con 10 nM de melatonina produjo un leve descenso en los niveles de ROS ( $5,95 \pm 2,10$ ), que fue mucho más acusado en las muestras tratadas con 1  $\mu$ M de melatonina ( $3,31 \pm 0,82$ ), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, la cantidad más baja de melatonina utilizada no provocó ningún efecto.



**Figura 4.8.** Intensidad media de fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína (DCF) (tras la oxidación de la  $\text{H}_2\text{DCF}$  por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y evaluada por citometría de flujo (FL1) antes de la capacitación (*swim up*) y tras 10 minutos, 1 hora y 3 horas de incubación en condiciones capacitantes ( $39^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ ), en medio TALP (control), con alto AMPc (*cocktail*) y con diferentes concentraciones de melatonina (M) añadidas al medio *cocktail*. Los valores se representan como media  $\pm$  S.E.M. ( $n=5$ ).

Tras una hora de incubación en condiciones capacitantes, se observó un incremento en la concentración de ROS en todas las muestras excepto en la control ( $6,82 \pm 1,52$ ). El aumento fue mucho más marcado en las muestra *cocktail* ( $11,96 \pm 4,87$ ) y con 100 pM de melatonina ( $12,58 \pm 4,45$ ), en comparación con el producido en las incubadas con 10 nM y 1  $\mu\text{M}$  de melatonina ( $8,27 \pm 3,68$  y  $5,58 \pm 1,94$  respectivamente), aunque sin diferencias significativas. Aun así es de resaltar la capacidad de la melatonina, a concentraciones de 10 nM y sobre todo, de 1  $\mu\text{M}$ , de reducir el incremento en los niveles de ROS que se producen como consecuencia de la capacitación, como demuestra el hecho de que dicho incremento se produzca sólo en la muestra con alto AMPc (*cocktail*) y no en la control (con TALP). Estos datos concordarían con los observados tras tinción de CTC en relación al porcentaje de espermatozoides capacitados.



Al finalizar la incubación en condiciones capacitantes, los niveles de ROS disminuyeron con respecto a los valores obtenidos a la hora de incubación, pero igualmente, la muestra *cocktail* siguió presentando mayores valores que la muestra control ( $8,48 \pm 2,95$  y  $6,07 \pm 0,80$  para *cocktail* y control, respectivamente) y de nuevo, la muestra incubada con  $1\mu\text{M}$  de melatonina mantuvo unos niveles de ROS similares al control ( $6,08 \pm 0,56$ ), aunque en ningún caso se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

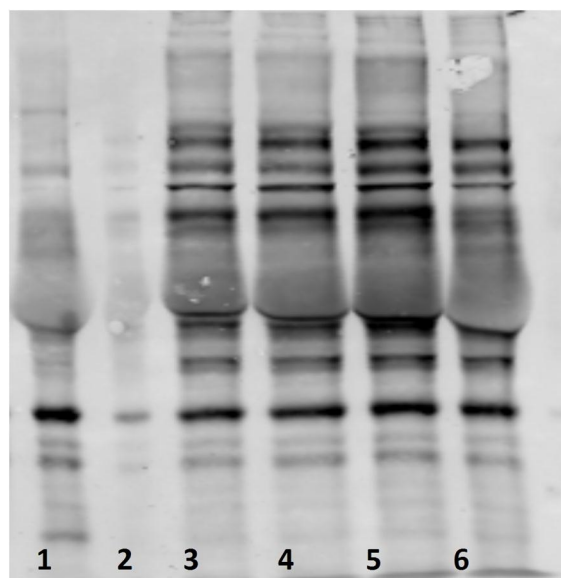
Se ha demostrado que la incubación de espermatozoides con melatonina *in vitro* disminuye el daño por el estrés oxidativo de la célula provocado por ROS (du Plessis *et al.*, 2010; Jang *et al.*, 2010). Como se ha comentado en la introducción, los niveles de ROS juegan un papel fundamental en la regulación de la capacitación espermática en modelos humanos y animales (Zini *et al.*, 1995; O'Flaherty *et al.*, 2006; O'Flaherty *et al.*, 2006). Estas sustancias promueven la activación de AC, que a su vez activa AMPc, y en última instancia promueve un aumento de la fosforilación de tirosinas (Zini *et al.*, 1995). La melatonina, en base a los resultados obtenidos en este trabajo, sería capaz de disminuir los niveles de ROS, probablemente debido a su acción antioxidante, y por tanto evitar parcialmente la capacitación espermática.

---

#### 4.8. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA FOSFORILACIÓN EN RESIDUOS DE TIROSINAS DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA ESPERMÁTICAS

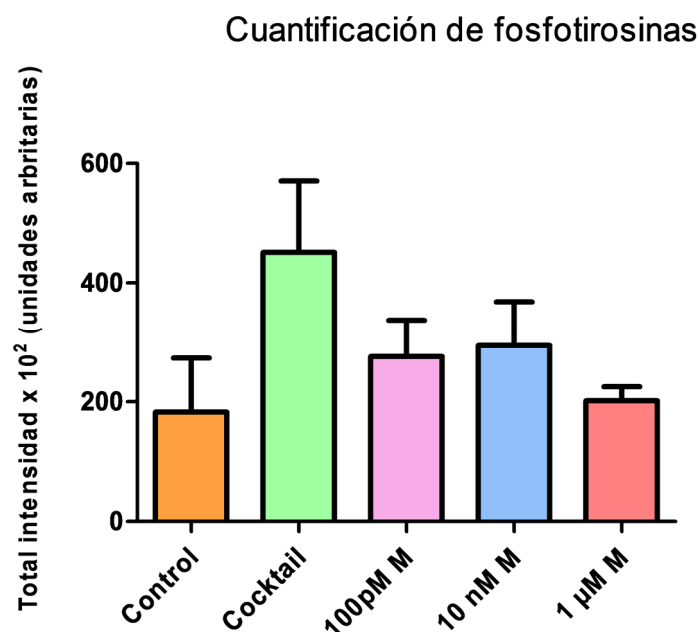
---

Como se puede apreciar en la figura 4.9., correspondiente a una membrana representativa de varios análisis de western-blot, la fosforilación en residuos de tirosinas fue mucho menor en la muestra inicial (carril 2) que en las muestras tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes por lo que no se incluyeron los datos de esta en la cuantificación por densitometría de las bandas observadas, al ser los valores prácticamente inexistentes en comparación con las otras muestras.



**Figura 4.9.** Western-blot representativo de los obtenidos utilizando anticuerpos anti-fosfotirosinas en proteínas de muestras antes de la capacitación (*swim up*) (carril 2) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitacitantes (39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>) (1) en medio TALP (control), (3) con alto AMPc (*cocktail*) y con diferentes concentraciones de melatonina, (4) 100 pM melatonina; (5) 10 nM melatonina; (6) 1μM melatonina añadidas al medio *cocktail*.

Como se aprecia en la figura 4.9 y queda demostrado por cuantificación densitométrica (Fig. 4.10.), en la muestra *cocktail* se observó una mayor señal de fosforilación en residuos de tirosina en las proteínas espermáticas ( $451 \pm 119,4$ ) expresada como intensidad total de las bandas (unidades arbitrarias) en comparación con la muestra control ( $183 \pm 90,4$ ). Este resultado concuerda con resultados anteriores obtenidos por nuestro grupo de investigación en el que se observaron más bandas y mayor intensidad en el patrón de fosforilación al ser incubadas con este medio que incrementa el AMPc (Grasa *et al.*, 2006).



**Figura 4.10.** Cuantificación por densitometría del total de proteínas fosforiladas en tirosinas de las muestras espermáticas tras 3 horas de incubación en condiciones de capacitación (39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>), en medio TALP (control), con alto AMPc (*cocktail*) y con diferentes concentraciones de melatonina añadidas al medio *cocktail*. Los valores se representan como media  $\pm$  S.E.M. (n=5).

En todas las muestras incubadas con melatonina se observó una importante disminución de la señal de fosforilación en comparación con la muestra *cocktail*, reduciéndose incluso hasta los niveles de la muestra control en el caso de la muestra 1µM de melatonina ( $202 \pm 23,47$ ). Estos resultados concuerdan con los obtenidos tras la evaluación de la distribución intracelular del calcio por clorotetraciclina y, junto a los demás presentados en esta memoria, demuestran que la melatonina, especialmente a una concentración de 1µM, tiene capacidad de reducir los parámetros generalmente asociados a la capacitación (inducida, en este caso por el aumento intracelular de AMPc provocado por el *cocktail* usado), excepto la hiperactivación

Este fenómeno se ha manifestado en otros trabajos de nuestro grupo de investigación, en el que se observaron que aun utilizando un medio con alto AMPc para inducir la capacitación en el espermatozoide ovino no se produjeron cambios en el proceso de hiperactivación (Colas *et al.*, 2010).

En otro trabajo más reciente de nuestro grupo, se obtuvieron resultados similares al añadir proteínas del plasma seminal al mismo medio que promueve la capacitación *in vitro*, ya que éstas eran capaces de mantener a los espermatozoides en estado descapacitado, disminuyendo la fosforilación en los residuos de tirosinas, pero sin embargo provocaban un aumento del porcentaje de espermatozoides hiperactivados (Luna *et al.*, 2015). En conclusión, el resultado de este estudio corroboraría, junto con los anteriores resultados mencionados, que el espermatozoide ovino es capaz de llevar a cabo el proceso de capacitación *in vitro* sin producirse un movimiento hiperactivado, ya que estos dos procesos (capacitación e hiperactivación) son dos procesos concomitantes (Fraser, 1977) pero pueden activarse independientemente el uno del otro (Mortimer *et al.*, 1998; Colas *et al.*, 2010).

Todos estos datos animan a seguir investigando el mecanismo de acción de la melatonina sobre la capacitación, ya que su comprensión abriría nuevas posibilidades en las tecnologías de reproducción asistida, usando esta hormona de forma diluida o bien análogos o antagonistas de la misma, que activen o inhiban los receptores de esta hormona en los espermatozoides, para así ser capaces de regular la capacitación espermática y que ésta se produzca en el momento oportuno.

## 5.CONCLUSIONES

---

- 1) La melatonina, no fue capaz de modificar significativamente, a ninguna de las concentraciones ensayadas (100 pM, 10nM and 1μM), el porcentaje de espermatozoides móviles o con membrana plasmática íntegra con respecto a las muestras capacitadas sin melatonina.
- 2) La presencia de melatonina a concentración 1 μM en el medio de capacitación dio lugar a un porcentaje significativamente menor de espermatozoides capacitados junto con menores niveles de ROS y calcio intracelular y además menor grado de fosforilación en residuos de tirosinas.

## CONCLUSIONS

---

- 1) None of melatonin concentrations assayed (100 pM, 10nM and 1μM) affected the percentage of motile and with integral plasma membrane sperm compared with capacitated samples without melatonin.
- 2) The exposure of ram spermatozoa to 1 μM melatonin resulted in a significantly lower percentage of capacitated sperm ( $p < 0.001$ ), and also a decrease in the levels of reactive oxygen species and intracellular calcium, and additionally decrease in protein tyrosine phosphorylation.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Agarwal, A., R. A. Saleh and M. A. Bedaiwy (2003). "Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction." Fertil Steril **79**(4): 829-843.
- Aitken, R. J., H. M. Fisher, N. Fulton, E. Gomez, W. Knox, B. Lewis and S. Irvine (1997). "Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine." Mol Reprod Dev **47**(4): 468-482.
- Alvarez, J. G., J. L. Lasso, L. Blasco, R. C. Nunez, S. Heyner, P. P. Caballero and B. T. Storey (1993). "Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime." Hum Reprod **8**(7): 1087-1092.
- Ashrafi, I., H. Kohram and F. F. Ardabili (2013). "Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa." Anim Reprod Sci **139**(1-4): 25-30.
- Baker, M. A., L. Hetherington, H. Ecroyd, S. D. Roman and R. J. Aitken (2004). "Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation." J Cell Sci **117**(Pt 2): 211-222.
- Baldi, E., R. Casano, C. Falsetti, C. Krausz, M. Maggi and G. Forti (1991). "Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa." J Androl **12**(5): 323-330.
- Baxendale, R. W. and L. R. Fraser (2003). "Evidence for multiple distinctly localized adenyl cyclase isoforms in mammalian spermatozoa." Mol Reprod Dev **66**(2): 181-189.
- Bendahmane, M., C. Lynch, 2nd and D. R. Tulsiani (2001). "Calmodulin signals capacitation and triggers the agonist-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa." Arch Biochem Biophys **390**(1): 1-8.
- Braun, T. and R. F. Dods (1975). "Development of a Mn-2+-sensitive, "soluble" adenylate cyclase in rat testis." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(3): 1097-1101.
- Brzezinski, A., M. M. Seibel, H. J. Lynch, M. H. Deng and R. J. Wurtman (1987). "Melatonin in human preovulatory follicular fluid." J Clin Endocrinol Metab **64**(4): 865-867.
- Casao, A., I. Cebrian, M. E. Asumpcao, R. Perez-Pe, J. A. Abecia, F. Forcada, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2010). "Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes." Reprod Biol Endocrinol **8**: 59.
- Casao, A., M. Gallego, J. A. Abecia, F. Forcada, R. Perez-Pe, T. Muino-Blanco and J. A. Cebrian-Perez (2012). "Identification and immunolocalisation of melatonin MT(1) and MT(2) receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa." Reprod Fertil Dev **24**(7): 953-961.
- Casao, A., N. Mendoza, R. Perez-Pe, P. Grasa, J. A. Abecia, F. Forcada, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2010). "Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate." J Pineal Res **48**(1): 39-46.
- Casao, A., R. Perez-Pe, J. A. Abecia, F. Forcada, T. Muino-Blanco and J. A. Cebrian-Perez (2013). "The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defence system of Rasa Aragonesa rams." Anim Reprod Sci **138**(3-4): 168-174.
- Casao, A., S. Vega, I. Palacin, R. Perez-Pe, A. Lavina, F. J. Quintin, E. Sevilla, J. A. Abecia, J. A. Cebrian-Perez, F. Forcada and T. Muino-Blanco (2010). "Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in Rasa Aragonesa rams." Reprod Domest Anim **45**(3): 425-432.

- Caswell, A. H. and J. D. Hutchison (1971). "Visualization of membrane bound cations by a fluorescent technique." Biochem Biophys Res Commun **42**(1): 43-49.
- Cebrian-Perez, J. A., A. Casao, M. Gonzalez-Arto, T. R. dos Santos Hamilton, R. Perez-Pe and T. Muino-Blanco (2014). "Melatonin in sperm biology: breaking paradigms." Reprod Domest Anim **49 Suppl 4**: 11-21.
- Colas, C., J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2010). "Caffeine induces ram sperm hyperactivation independent of cAMP-dependent protein kinase." Int J Androl **33**(1): e187-197.
- Colas, C., P. Grasa, A. Casao, M. Gallego, J. A. Abecia, F. Forcada, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2009). "Changes in calmodulin immunocytochemical localization associated with capacitation and acrosomal exocytosis of ram spermatozoa." Theriogenology **71**(5): 789-800.
- Colas, C., P. James, L. Howes, R. Jones, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2008). "Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation." Reprod Fertil Dev **20**(6): 649-658.
- Chaudhry, P. S. and E. R. Casillas (1988). "Calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases in plasma membranes of bovine epididymal spermatozoa." Arch Biochem Biophys **262**(2): 439-444.
- Christian, A. E., M. P. Haynes, M. C. Phillips and G. H. Rothblat (1997). "Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content." J Lipid Res **38**(11): 2264-2272.
- DasGupta, S., C. L. Mills and L. R. Fraser (1993). "Ca(2+)-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay." J Reprod Fertil **99**(1): 135-143.
- Davis, B. K. (1981). "Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7560-7564.
- Davis, B. K., R. Byrne and B. Hungund (1979). "Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro." Biochim Biophys Acta **558**(3): 257-266.
- de Vries, K. J., T. Wiedmer, P. J. Sims and B. M. Gadella (2003). "Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells." Biol Reprod **68**(6): 2122-2134.
- Dragileva, E., S. Rubinstein and H. Breitbart (1999). "Intracellular Ca(2+)-Mg(2+)-ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa." Biol Reprod **61**(5): 1226-1234.
- du Plessis, S. S., K. Hagenaar and F. Lampiao (2010). "The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS." Andrologia **42**(2): 112-116.
- Ericsson, R. J. (1967). "A fluorometric method for measurement of sperm capacitation." Proc Soc Exp Biol Med **125**(4): 1115-1118.
- Espino, J., A. Ortiz, I. Bejarano, G. M. Lozano, F. Monllor, J. F. Garcia, A. B. Rodriguez and J. A. Pariente (2011). "Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor- and extracellular signal-regulated kinase-mediated pathways." Fertil Steril **95**(7): 2290-2296.
- Flesch, F. M., J. F. Brouwers, P. F. Nievelstein, A. J. Verkleij, L. M. van Golde, B. Colenbrander and B. M. Gadella (2001). "Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane." J Cell Sci **114**(Pt 19): 3543-3555.
- Flesch, F. M. and B. M. Gadella (2000). "Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization." Biochim Biophys Acta **10**(3): 197-235.
- Fraser, L. R. (1977). "Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation." J Exp Zool **202**(3): 439-444.

- Fraser, L. R., L. R. Abeydeera and K. Niwa (1995). "Ca(2+)-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis." Mol Reprod Dev **40**(2): 233-241.
- Fujinoki, M. (2008). "Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm." Reproduction **136**(5): 533-541.
- Gadella, B. M. and R. A. Harrison (2002). "Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells." Biol Reprod **67**(1): 340-350.
- Gagnon, C., D. Harbour, E. De Lamirande, C. W. Bardin and J. L. Dacheux (1984). "Sensitive assay detects protein methylesterase in spermatozoa: decrease in enzyme activity during epididymal maturation." Biology of Reproduction **30**(4): 953-958.
- Galantino-Homer, H. L., P. E. Visconti and G. S. Kopf (1997). "Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway." Biol Reprod **56**(3): 707-719.
- Garcia-Lopez, N., M. Ollero, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (1996). "Reversion of thermic-shock effect on ram spermatozoa by adsorption of seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase systems." J Chromatogr B Biomed Appl **680**(1-2): 137-143.
- Gee, K. R., K. A. Brown, W. N. Chen, J. Bishop-Stewart, D. Gray and I. Johnson (2000). "Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes." Cell Calcium **27**(2): 97-106.
- Gerlach, T. and J. E. Aurich (2000). "Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster." Anim Reprod Sci **58**(3-4): 197-213.
- Gonzalez-Arto, M., C. Luna, R. Perez-Pe, T. Muino-Blanco, J. A. Cebrian-Perez and A. Casao (2014). "New evidence of melatonin receptor contribution to ram sperm functionality." Reprod Fertil Dev **17**(10).
- Grasa, P., J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2006). "Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation." Reproduction **132**(5): 721-732.
- Grasa, P., C. Colas, M. Gallego, L. Monteagudo, T. Muino-Blanco and J. A. Cebrian-Perez (2009). "Changes in content and localization of proteins phosphorylated at tyrosine, serine and threonine residues during ram sperm capacitation and acrosome reaction." Reproduction **137**(4): 655-667.
- Grasa, P., R. Perez-Pe, O. Baguena, F. Forcada, A. Abecia, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2004). "Ram sperm selection by a dextran/swim-up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes." J Androl **25**(6): 982-990.
- Guthrie, H. D. and G. R. Welch (2006). "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 **84**(8): 2089-2100.
- Hammadeh, M. E., S. Al Hasani, P. Rosenbaum, W. Schmidt and C. Fischer Hammadeh (2008). "Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients." Arch Gynecol Obstet **277**(6): 515-526.
- Harrison, R. A., P. J. Ashworth and N. G. Miller (1996). "Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes." Mol Reprod Dev **45**(3): 378-391.
- Harrison, R. A. and S. E. Vickers (1990). "Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa." J Reprod Fertil **88**(1): 343-352.
- Hess, K. C., B. H. Jones, B. Marquez, Y. Chen, T. S. Ord, M. Kamenetsky, C. Miyamoto, J. H. Zippin, G. S. Kopf, S. S. Suarez, L. R. Levin, C. J. Williams, J. Buck and S. B. Moss (2005).



- "The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization." *Dev Cell* **9**(2): 249-259.
- Ho, H. C. and S. S. Suarez (2001). "Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation." *Reproduction* **122**(4): 519-526.
- Ho, H. C. and S. S. Suarez (2003). "Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility." *Biol Reprod* **68**(5): 1590-1596.
- Ho, H. C. and S. S. Suarez (2003). "Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility." *Biology of Reproduction* **68**(5): 1590-1596.
- Huete-Toral, F., A. Crooke, A. Martinez-Aguila and J. Pintor (2015). "Melatonin receptors trigger cAMP production and inhibit chloride movements in nonpigmented ciliary epithelial cells." *J Pharmacol Exp Ther* **352**(1): 119-128.
- Iborra, A., M. Companyo, P. Martinez and A. Morros (2000). "Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa." *Biol Reprod* **62**(2): 378-383.
- Ignotz, G. G. and S. S. Suarez (2005). "Calcium/calmodulin and calmodulin kinase II stimulate hyperactivation in demembranated bovine sperm." *Biol Reprod* **73**(3): 519-526.
- Jang, H. Y., Y. H. Kim, B. W. Kim, I. C. Park, H. T. Cheong, J. T. Kim, C. K. Park, H. S. Kong, H. K. Lee and B. K. Yang (2010). "Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development." *Reprod Domest Anim* **45**(6): 943-950.
- Jha, K. N., A. M. Salicioni, E. Arcelay, O. Chertihin, S. Kumari, J. C. Herr and P. E. Visconti (2006). "Evidence for the involvement of proline-directed serine/threonine phosphorylation in sperm capacitation." *Mol Hum Reprod* **12**(12): 781-789.
- Karagiannidis, A., S. Varsakeli, C. Alexopoulos and I. I. Amarantidis (2000). "Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece." *Small Rumin Res* **37**(1-2): 125-130.
- Katz, D. F. and R. Yanagimachi (1981). "Movement characteristics of hamster and guinea pig spermatozoa upon attachment to the zona pellucida." *Biology of Reproduction* **25**(4): 785-791.
- Kothari, S., A. Thompson, A. Agarwal and S. S. du Plessis (2010). "Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function." *Indian J Exp Biol* **48**(5): 425-435.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Leclerc, P. and G. S. Kopf (1995). "Mouse sperm adenylyl cyclase: general properties and regulation by the zona pellucida." *Biol Reprod* **52**(6): 1227-1233.
- Leyton, L. and P. Saling (1989). "95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding." *Cell* **57**(7): 1123-1130.
- Lincoln, G. A. (1990). "Correlation with changes in horns and pelage, but not reproduction, of seasonal cycles in the secretion of prolactin in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep." *J Reprod Fertil* **90**(1): 285-296.
- Luna, C., C. Colas, A. Casao, E. Serrano, J. Domingo, R. Perez-Pe, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2015). "Ram seminal plasma proteins contribute to sperm capacitation and modulate sperm-zona pellucida interaction." *Theriogenology* **83**(4): 670-678.
- Luna, C., C. Colas, R. Perez-Pe, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2012). "A novel epidermal growth factor-dependent extracellular signal-regulated MAP kinase cascade involved in sperm functionality in sheep." *Biol Reprod* **87**(4): 93.
- Luna, C., M. Yeste, M. M. Rivera Del Alamo, J. Domingo, A. Casao, J. E. Rodriguez-Gil, R. Perez-Pe, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2015). "Effect of seminal plasma proteins on the motile sperm subpopulations in ram ejaculates." *Reprod Fertil Dev*.

- Malpaux, B., C. Viguie, D. C. Skinner, J. C. Thiery and P. Chemineau (1997). "Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe." Brain Res Bull **44**(4): 431-438.
- Martin-Hidalgo, D., F. J. Baron, M. J. Bragado, P. Carmona, A. Robina, L. J. Garcia-Marin and M. C. Gil (2011). "The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 degrees C." Theriogenology **75**(8): 1550-1560.
- Mortimer, D. (1994). "Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity." Reprod Fertil Dev **6**(1): 25-31.
- Mortimer, S. T., M. A. Swan and D. Mortimer (1998). "Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa." Hum Reprod **13**(8): 2139-2146.
- Naz, R. K. (1999). "Involvement of protein serine and threonine phosphorylation in human sperm capacitation." Biol Reprod **60**(6): 1402-1409.
- O'Flaherty, C., E. de Lamirande and C. Gagnon (2006). "Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events." Free Radic Biol Med **41**(4): 528-540.
- O'Flaherty, C., E. de Lamirande and C. Gagnon (2006). "Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation." Free Radic Biol Med **40**(6): 1045-1055.
- O'Toole, C. M., E. R. Roldan and L. R. Fraser (1996). "Role for Ca<sup>2+</sup> channels in the signal transduction pathway leading to acrosomal exocytosis in human spermatozoa." Mol Reprod Dev **45**(2): 204-211.
- Ohmuro, J. and S. Ishijima (2006). "Hyperactivation is the mode conversion from constant-curvature beating to constant-frequency beating under a constant rate of microtubule sliding." Mol Reprod Dev **73**(11): 1412-1421.
- Ollero, M., T. M. Blanco, M. J. Lopez-Perez and J. A. Cebrian Perez (1996). "Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in an aqueous two-phase system. Effect of different cryoprotectants." J Chromatogr B Biomed Appl **680**(1-2): 157-164.
- Ollero, M., T. Muino-Blanco, M. J. Lopez-Perez and J. A. Cebrian-Perez (1996). "Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations." Int J Androl **19**(5): 287-292.
- Ollero, M., M. L. Pascual, T. Muino-Blanco, J. A. Cebrian-Perez and M. J. Lopez-Perez (1994). "Revealing surface changes associated with maturation of ram spermatozoa by centrifugal counter-current distribution in an aqueous two-phase system." J Chromatogr A **668**(1): 173-178.
- Ortiz, A., J. Espino, I. Bejarano, G. M. Lozano, F. Monllor, J. F. Garcia, J. A. Pariente and A. B. Rodriguez (2011). "High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility." J Pineal Res **50**(2): 132-139.
- Palacin, I., J. A. Abecia, F. Forcada, A. Casao, J. A. Cebrian, T. Muino, C. Palacios and J. M. Pontes (2008). "Effects of exogenous melatonin treatment on out-of-season ram fertility." Italian Journal of Animal Science **7**(2): 199-206.
- Parrish, J. J., J. Susko-Parrish, M. A. Winer and N. L. First (1988). "Capacitation of bovine sperm by heparin." Biology of Reproduction **38**(5): 1171-1180.
- Perez-Pe, R., P. Grasa, M. Fernandez-Juan, M. L. Peleato, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2002). "Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa." Mol Reprod Dev **61**(2): 226-233.
- Pozo, D., R. J. Reiter, J. R. Calvo and J. M. Guerrero (1997). "Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin." J Cell Biochem **65**(3): 430-442.

- Rathi, R., B. Colenbrander, M. M. Bevers and B. M. Gadella (2001). "Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa." Biol Reprod **65**(2): 462-470.
- Reiter, R. J., D. X. Tan, L. C. Manchester, S. D. Paredes, J. C. Mayo and R. M. Sainz (2009). "Melatonin and reproduction revisited." Biology of Reproduction **81**(3): 445-456.
- Rosa, H. J., D. T. Juniper and M. J. Bryant (2000). "Effects of recent sexual experience and melatonin treatment of rams on plasma testosterone concentration, sexual behaviour and ability to induce ovulation in seasonally anoestrous ewes." J Reprod Fertil **120**(1): 169-176.
- Saling, P. M. and B. T. Storey (1979). "Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction." J Cell Biol **83**(3): 544-555.
- Sarabia, L., I. Maurer and E. Bustos-Obregon (2009). "Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA." Ecotoxicol Environ Saf **72**(2): 663-668.
- Schuster, C., L. M. Williams, A. Morris, P. J. Morgan and P. Barrett (2005). "The human MT1 melatonin receptor stimulates cAMP production in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y cells via a calcium-calmodulin signal transduction pathway." J Neuroendocrinol **17**(3): 170-178.
- Sheikheldin, M. A., B. E. Howland and W. M. Palmer (1992). "Seasonal profiles of melatonin in adult rams." J Pineal Res **12**(2): 58-63.
- Si, Y. and P. Olds-Clarke (2000). "Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation." Biol Reprod **62**(5): 1231-1239.
- Sjoblom, M., B. Safsten and G. Flemstrom (2003). "Melatonin-induced calcium signaling in clusters of human and rat duodenal enterocytes." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **284**(6): 12.
- Suarez, S. S. (2008). "Control of hyperactivation in sperm." Hum Reprod Update **14**(6): 647-657.
- Tamura, H., H. Takayama, Y. Nakamura, R. J. Reiter and N. Sugino (2008). "Fetal/placental regulation of maternal melatonin in rats." J Pineal Res **44**(3): 335-340.
- Tulsiani, D. R., H. T. Zeng and A. Abou-Haila (2007). "Biology of sperm capacitation: evidence for multiple signalling pathways." Soc Reprod Fertil Suppl **63**: 257-272.
- Turek, F. W., J. P. McMillan and M. Menaker (1976). "Melatonin: effects on the circadian locomotor rhythm of sparrows." Science **194**(4272): 1441-1443.
- Vadnais, M. L., H. L. Galantino-Homer and G. C. Althouse (2007). "Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation." Arch Androl **53**(3): 109-123.
- Visconti, P. E., J. L. Bailey, G. D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke and G. S. Kopf (1995). "Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation." Development **121**(4): 1129-1137.
- Visconti, P. E., H. Galantino-Homer, G. D. Moore, J. L. Bailey, X. Ning, M. Fornes and G. S. Kopf (1998). "The molecular basis of sperm capacitation." J Androl **19**(2): 242-248.
- Visconti, P. E. and G. S. Kopf (1998). "Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation." Biol Reprod **59**(1): 1-6.
- Visconti, P. E., X. P. Ning, M. W. Fornes, J. G. Alvarez, P. Stein, S. A. Connors and G. S. Kopf (1999). "Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: Cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation." Developmental Biology **214**(2): 429-443.
- Visconti, P. E., V. A. Westbrook, O. Chertihin, I. Demarco, S. Sleight and A. B. Diekman (2002). "Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity." J Reprod Immunol **53**(1-2): 133-150.

- Ward, C. R. and B. T. Storey (1984). "Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay." Developmental Biology **104**(2): 287-296.
- White, D. R. and R. J. Aitken (1989). "Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility." Gamete Res **22**(2): 163-177.
- Yanagimachi, R. (1994). "Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity." Zygote **2**(4): 371-372.
- Yancey, P. G., W. V. Rodriguez, E. P. Kilsdonk, G. W. Stoudt, W. J. Johnson, M. C. Phillips and G. H. Rothblat (1996). "Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration Of kinetic pools and mechanism of efflux." J Biol Chem **271**(27): 16026-16034.
- Zaccolo, M. and T. Pozzan (2003). "CAMP and Ca<sup>2+</sup> interplay: a matter of oscillation patterns." Trends Neurosci **26**(2): 53-55.
- Zeng, Y., J. A. Oberdorf and H. M. Florman (1996). "pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-)-, and HCO<sub>3</sub>(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation." Dev Biol **173**(2): 510-520.
- Zini, A., E. De Lamirande and C. Gagnon (1995). "Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro." J Androl **16**(5): 424-431.

# Melatonin affects calcium, ROS levels and protein tyrosine phosphorylation during *in vitro* ram sperm capacitation

SILVIA GIMENO, ADRIANA CASAO, JOSÉ ÁLVARO CEBRIÁN-PÉREZ  
TERESA MUIÑO-BLANCO and ROSAURA PÉREZ-PE

*pto. Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA). Facultad de Veterinaria.*

Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza



## INTRODUCTION

Melatonin is an important hormone regulating reproductive functions and the presence of receptors for this hormone on the ram sperm surface leads to speculate about a relevant role of melatonin on sperm functionality. Certain similarities between molecular pathways activated by this hormone in somatic cells, and those implicated in sperm events such as capacitation, have been described. On the other hand, melatonin is a potent antioxidant molecule, reducing the oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS). It has been shown that *in vitro* capacitation results in increased ROS levels.

Based in all the above-mentioned, we suggest the hypothesis that melatonin play a crucial role in sperm capacitation. The aim of this study was to investigate the effect of different melatonin concentrations on several sperm parameters related to capacitation, such as hyperactivation of motility, changes in intracellular calcium distribution, increment of protein tyrosine phosphorylation and ROS levels.

## MATERIALS & METHODS

A seminal plasma-free sperm population obtained by dextran/ swim-up procedure was diluted ( $1.6 \times 10^8$  cells/mL) in TALP medium. For the induction of *in vitro* capacitation, aliquots were incubated at 39 °C for 3 h in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> in air, and a cocktail with cAMP-elevating agents, previously proved to capacitate ram spermatozoa *in vitro*, was added to all samples except to the control ones. Melatonin was added to the samples with cocktail to yield a final concentrations of 100 pM, 10 nM and 1 µM.

Sperm membrane integrity was assessed by the fluorescent staining with 6-CFDA and propidium iodide (PI) and levels of reactive oxygen species (ROS) with H<sub>2</sub>DCFDA and PI in all samples at 10 min, 1h and 3h of incubation in capacitating conditions. Both stainings were analysed by flow cytometry. Computer-assisted sperm motility analysis (CASA) was performed using the ISAS 1.0.4 software (Proiser SL) and hyperactivated sperm were considered when LIN (%linearity) ≤45% and ALH (amplitud of lateral head displacement) ≥3.5 µm. Capacitation state was evaluated by CTC (chlortetracycline) staining (changes in intracellular calcium distribution visualized by fluorescence microscopy) and quantification of phosphorylated proteins (Western Blot analysis using an monoclonal mouse antibody anti-phosphotyrosine and densitometric quantification by an Odyssey Cx apparatus, Li-Cor Biosciences).

## RESULTS & CONCLUSIONS

The results obtained showed that none of the melatonin concentrations assayed (100 pM, 10 nM and 1 µM) affected the percentage of sperm with hyperactivated motility or with integral plasma membrane (PI-). However, samples capacitated in the presence of 1 µM melatonin showed a lower percentage of non-capacitated sperm (CTC staining) ( $p < 0.001$ ) (Fig 1) together with lower levels of ROS than cocktail-capacitated samples (Fig 2) and a decrease in protein tyrosine phosphorylation (Fig 3 and 4).

This study shows that exposure of ram spermatozoa to 1 µM melatonin has direct effects by decreasing capacitation. In conclusion, these results point out the possibility of using melatonin or diluted analogues or antagonists, which activate or inhibit receptors for controlling capacitation in assisted reproductive procedures.

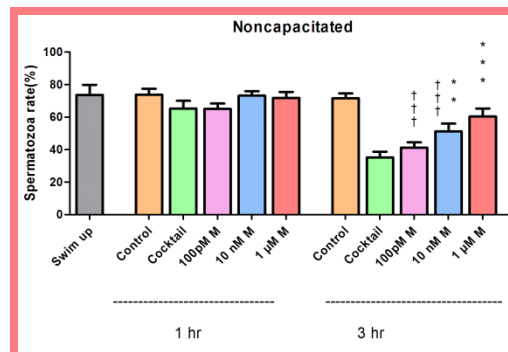


Fig.1. Percentage of non-capacitated spermatozoa evaluated by CTC staining in a free-seminal plasma sample before capacitation (swim-up) and in samples incubated 1 h and 3 h in capacitating conditions with cocktail, cocktail plus different melatonin concentrations or without this compounds (control). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=5). Significant differences comparing with cocktail sample at 3 h \*\*  $P < 0.01$  y \*\*\*  $P < 0.001$ . and with control at 3 h ††  $P < 0.01$  y †††  $P < 0.001$ .

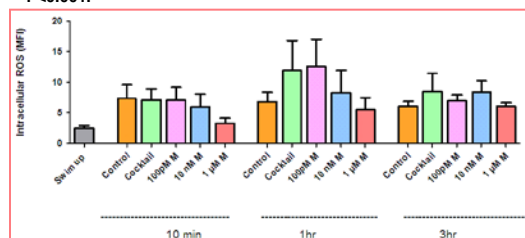


Fig. 2. Assessment of intracellular ROS in a free-seminal plasma sample before capacitation (swim-up) and in samples incubated 10 minutes, 1 h and 3 h in capacitating conditions with cocktail, cocktail plus different melatonin concentrations or without this compounds (control). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=5) of the average intensity of fluorescence corresponding to H<sub>2</sub>DCFDA in live cells (PI-) evaluated by flow cytometry (FL1).

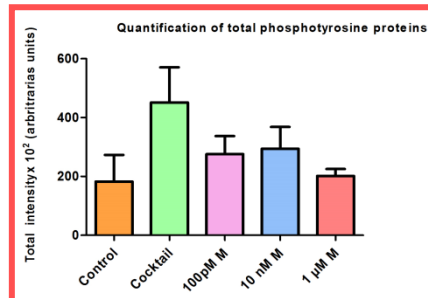


Fig. 3. Densitometric quantification of total phosphorylated proteins (phosphotyrosine) after 3 h of incubation in capacitating conditions with cocktail, cocktail plus different melatonin concentrations or without this compounds (control). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=5).

Fig. 4. Western blot analysis of total of total phosphorylated proteins (phosphotyrosine) after 3 h of incubation in capacitating conditions with cocktail, cocktail plus different melatonin concentrations or without this compounds (control). Lanes: 1, control; 2, cocktail-containing sample; 3, cocktail plus 100 pM melatonin; 4, cocktail plus 10nM melatonin; 5, cocktail plus 1 µM melatonin.

