



**Universidad**  
Zaragoza

# Trabajo Fin de Máster

## **Relación de la melatonina con el metabolismo del óxido nítrico en espermatozoides ovinos**

Autora

Silvia Calvo García

Directoras

Rosaura Pérez Pe

Adriana Casao Gascón

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y  
Celular

Facultad de Veterinaria

Septiembre 2018

Parte de los resultados derivados del presente Trabajo Fin de Master han sido aceptados para su presentación como póster en el 22nd Annual ESDAR (European Society for Domestic Animal Reproduction) Conference que se celebrará en Córdoba del 27 al 29 de Septiembre de 2018. Se incluye como anexo I el poster enviado y aceptado.

**Título: “Identification of Intracellular nitric oxide syntase isoforms in ram sperm”**

Autores: Calvo, S.; Carvajal M.; Miguel-Jiménez, S.; Casao, A.; Cebrián-Pérez, J.A.; Muiño-Blanco, T. and Pérez-Pé, R.

La Dras. Rosaura Pérez Pe y Adriana Casao Gascón, del  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la  
Universidad de Zaragoza

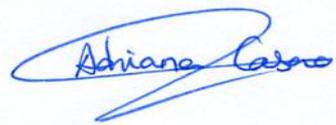
**INFORMAN:**

Que la alumna Silvia Calvo García, ha realizado bajo nuestra dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin de Máster titulado "Relación de la melatonina con el metabolismo del óxido nítrico en espermatozoides ovinos". 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 12 de septiembre de 2018.



**Rosaura Pérez Pe**



**Adriana Casao Gascón**

## ABREVIATURAS

AAAD: L-aminoácido aromático  
descarboxilasa

AC: adenilato ciclasa

ANGRA: Asociación Nacional de  
Ganaderos de raza Aragonesa

AR: reacción acrosómica

ASMT: N-acetilserotonin-O-  
metiltransferasa

BSA: albúmina sérica bovina

cAMP: adenosín monofosfato cíclico

cGMP (guanosín monofosfato cíclico)

CFDA: diacetato de carboxifluoresceína

CTC: clorotetraciclina

DAF-2 DA: fluorescente 4,5-  
Diaminofluorescein diacetate

db-cAMP: dibutiril-cAMP 1 mM

DMSO: dimetilsulfóxido

EEM: error estándar de la media

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

ESB: Extraction Sample Buffer

FIV: fecundación in vitro

FSH: hormona folículo estimulante

GnRH: hormona liberadora de  
gonadotropina

IFI: inmunofluorescencia indirecta

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

ISAS: Integrated Semen Analysis System

LH: hormona luteinizante

L-NAME: NG-nitro-L-arginina-metil-  
éster

LPS: lipopolisacáridos

MT: mótilos totales

MP: mótilos progresivos

M $\beta$ CD: metil- $\beta$ -ciclodextrinas 2,5 mM

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa o sintetasa

ONOO<sup>-</sup>: anión peroxinitrito

ONOOH: ácido peroxinitroso

PI: yoduro de propidio

PKA: proteína quinasa A

RNS: especies reactivas de nitrógeno

ROS: especies reactivas de oxígeno

SDS: dodecil sulfato sódico

SNP: nitroprusiato de sodio

SEA: Servicio de Experimentación  
Animal

T5M: triptófano-5-monooxigenasa

ZP: zona pelúcida

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1. ANTECEDENTES</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1. La melatonina</b> .....	<b>4</b>
1.1.1. Generalidades.....	4
1.1.2. La melatonina y su papel fisiológico sobre la reproducción .....	5
1.1.2.1. Melatonina y capacitación espermática .....	6
<b>1.2. El óxido nítrico y su papel en la reproducción y la funcionalidad espermática</b> .....	<b>8</b>
1.2.1. Generación del óxido nítrico: la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) .....	8
1.2.2. Efectos del óxido nítrico en la funcionalidad espermática .....	9
1.2.3. Aplicaciones del óxido nítrico en la reproducción .....	11
<b>1.3. Relación entre la melatonina, las óxido nítrico sintasas y el óxido nítrico</b> .....	<b>12</b>
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>14</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1. Procesado de muestras espermáticas</b> .....	<b>16</b>
3.1.1. Obtención del semen .....	16
3.1.2. Método <i>swim-up</i> /dextrano .....	16
3.1.3. Capacitación de muestras espermáticas <i>in vitro</i> .....	18
<b>3.2. Evaluación de muestras espermáticas</b> .....	<b>19</b>
3.2.1. Cálculo de la concentración espermática .....	19
3.2.2. Análisis de la motilidad espermática .....	19
3.2.3. Análisis de la viabilidad espermática .....	20
3.2.4. Determinación del estado de capacitación.....	21
<b>3.3. Determinación de los niveles de óxido nítrico (NO) mediante citometría de flujo</b> .....	<b>22</b>
<b>3.4. Detección de las isoformas de NOS por Western-Blot</b> .....	<b>24</b>
3.4.1. Extracción de proteínas espermáticas .....	24
3.4.2. SDS-PAGE y Western-Blot.....	24
<b>3.5. Determinación de la distribución de las isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) por inmunofluorescencia indirecta</b> .....	<b>25</b>
<b>3.6. Análisis estadístico</b> .....	<b>27</b>

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1. Efecto de la melatonina sobre los niveles de óxido nítrico en muestras espermáticas sometidas a capacitación .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2. Identificación de las isoformas de la NOS en espermatozoides ovinos.....</b>	<b>32</b>
4.2.1. Optimización de un procedimiento de detección de las isoformas de la óxido nítrico sintasa por Western Blot.....	32
4.2.2. Identificación de las isoformas de la óxido nítrico sintasa mediante Western Blot....	33
4.2.3. Optimización del protocolo de inmunofluorescencia indirecta para la identificación de las isoformas de la óxido nítrico sintasa .....	36
4.2.4. Identificación de las isoformas de la óxido nítrico sintasa por inmunofluorescencia indirecta .....	36
<b>4.3. Cambios en la distribución de las isoformas de la óxido nítrico sintasa en muestras espermáticas capacitadas en presencia de melatonina .....</b>	<b>39</b>
4.3.1. Efecto de la melatonina sobre la distribución de la eNOS en espermatozoides ovinos capacitados .....	40
4.3.2. Efecto de la melatonina sobre la distribución de la nNOS en espermatozoides ovinos capacitados .....	42
4.3.3. Efecto de la melatonina sobre la distribución de la iNOS en espermatozoides ovinos capacitados .....	43
<b>5. DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>45</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>48</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>49</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>56</b>

## RESUMEN

En la especie ovina la reproducción tiene un carácter estacional muy marcado regulado por la secreción de melatonina. Esta molécula tiene, además, una gran capacidad antioxidante y es capaz de reducir, entre otras especies reactivas, los niveles de óxido nítrico (NO). El NO se genera vía oxidación de L-arginina por la actividad de la óxido nítrico sintasa o sintetasa (NOS). Existen tres isoformas de esta enzima: la neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS) y la inducible (iNOS). En espermatozoides humanos se han identificado las tres isoformas de NOS y se ha demostrado que su actividad se incrementa a lo largo del proceso de capacitación *in vitro*. En espermatozoides ovinos, cuya capacitación *in vitro* resulta mucho más complicada que en otras especies, no existen estudios que hayan identificado alguna de las isoformas de NOS.

Por tanto, el objetivo de este Trabajo de Fin de Master es estudiar la acción de la melatonina a diferentes concentraciones fisiológicas, sobre los niveles de NO en espermatozoides ovinos incubados en condiciones capacitantes, identificar si las tres isoformas descritas de NOS están presentes en espermatozoides ovinos y evaluar el efecto de la melatonina sobre estas isoformas de NOS.

Para ello, espermatozoides ovinos seleccionados por *swim-up* se incubaron durante 3 horas en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>) en medio TALP (control), con alto cAMP (*cocktail*) y con dos concentraciones de melatonina (100 pM y 1 µM) añadidas al medio *cocktail*, y se evaluaron los niveles de NO mediante citometría de flujo. Para determinar si este efecto estaba mediado por la acción de la óxido nítrico sintasa, previamente se identificaron en espermatozoides ovinos las tres isoformas de la enzima descritas para otras especies, tras poner a punto los protocolos de western blot y de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Finalmente se evaluaron los cambios en la distribución de estas isoformas de NOS mediante IFI tras incubación de los espermatozoides en presencia de melatonina.

Los resultados obtenidos indican que la melatonina, a concentración 1 µM, es capaz de reducir significativamente los niveles de NO, los cuales se ven incrementados durante la capacitación espermática. Además se han identificado, por primera vez en el espermatozoide ovino, las tres isoformas de NOS, mediante western blot e inmunofluorescencia indirecta. La IFI también reveló tres inmunotipos espermáticos para cada una de las isoformas de NOS, cuyos porcentajes se modificaron durante la capacitación y el tratamiento con melatonina.

Así, la localización en el borde apical de las isoformas eNOS e iNOS disminuye con la capacitación y la melatonina, a concentración 1  $\mu$ M y 100 pM, modifica el efecto producido por los agentes capacitantes sobre el porcentaje de los inmuntipos de la nNOS e iNOS, revirtiéndolo en la primera y aumentándolo en la segunda.

Por tanto, la melatonina durante la capacitación de los espermatozoides ovinos parece ejercer un papel antioxidante reduciendo los niveles de NO, posiblemente generado por las isoformas identificadas de la NOS. Además, el tratamiento con melatonina parece modificar la localización de alguna de las isoformas de la NOS en el espermatozoide ovino.

## ABSTRACT

Sheep are highly seasonal in terms of reproductive capability and it is regulated by melatonin secretion. Melatonin is a molecule with a high antioxidant power capable of reducing, among other reactive species, the levels of nitric oxide (NO). NO is generated via oxidation of L-arginine by the activity of nitric oxide synthase or syntetase (NOS). There are three isoforms of this enzyme, neuronal (nNOS), endothelial (eNOS), and inducible (iNOS). In human sperm, the three NOS isoforms have been identified and their activity has been shown to increase throughout the *in vitro* capacitation process. In ram spermatozoa, where *in vitro* capacitation is much more complicated than in other species, there are no studies that have identified NOS isoforms.

This Master's Thesis aims to study the action of melatonin, at different physiological concentrations, on the levels of NO in ram spermatozoa incubated in capacitating conditions, to identify if the three isoforms described exist in ram spermatozoa, and evaluate the effect of melatonin on these isoforms.

Ram spermatozoa selected by *swim-up* were incubated for 3 hours under capacitating conditions (39°C and 5% CO<sub>2</sub>) in TALP medium (control), with high cAMP (*cocktail*) and with two concentrations of melatonin (100 pM and 1  $\mu$ M) added to the cocktail medium, and nitric oxide levels were evaluated by flow cytometry. In order to determine if this effect was mediated by the action of nitric oxide synthase, the three isoforms of the enzyme described for other species were previously identified in ram sperm, after the protocols of western blot and indirect immunofluorescence (IIF) were optimized. Finally, changes in the distribution of NOS isoforms by IIF after incubation of the sperm in the presence of melatonin were evaluated.

The results here presented indicate that melatonin, at 1 $\mu$ M concentration, is capable of significantly reducing NO production levels, which are increased during sperm capacitation. Besides, we have identified for the first time in ram sperm, the three isoforms of NOS, by indirect immunofluorescence and western blot assays. The IIF also revealed three immunotypes for each of the NOS isoforms, whose percentages were modified during sperm capacitation and melatonin treatment. Thus, the location of the eNOS and iNOS isoforms on the apical edge decreases with the capacitation and melatonin, at 1  $\mu$ M and 100 pM, modifies the effect produced by the capacitating agents on the percentage of the nNOS and iNOS immunotypes in ram sperm, reversing it in the first and increasing it in the second case.

Therefore, melatonin during sperm capacitation seems to exert an antioxidant role by reducing the levels of NO, possibly generated by the identified isoforms of NOS. In addition, treatment with melatonin appears to modify the localization of some of the isoforms of NOS in ram sperm.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. La melatonina

#### 1.1.1. Generalidades

La melatonina es una molécula altamente conservada (Tan et al., 2007), que se encuentra en multitud de taxones filogenéticamente distantes, y está ampliamente distribuida en los diferentes organismos. Su presencia, prácticamente ubicua, se ha identificado en bacterias, eucariotas unicelulares, algas, hongos, plantas y animales. La distribución de la melatonina en este extenso espectro de clados sugiere un origen evolutivo temprano de la misma, así como un papel funcional relevante en múltiples procesos fisiológicos (Tan et al., 2009).

La función biológica primaria de la melatonina en organismos unicelulares primitivos sería la protección frente al estrés oxidativo, al ser esta molécula capaz de interactuar con especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS). Posteriormente, durante la evolución, la melatonina habría sido adoptada por los organismos multicelulares para realizar otras funciones biológicas. Entre ellas, se encontraría la tolerancia ambiental en hongos y plantas (Tan et al., 2013), y la regulación del ritmo circadiano y la reproducción estacional en animales (Chemineau et al., 2008). Además, constituye una señal química de luz y oscuridad (Tan et al., 2007), promueve el sueño (Marczynski et al., 1964), y presenta actividad antiinflamatoria y propiedades inmunorreguladoras, entre otras muchas funciones (Tan et al., 2007).

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina, es sintetizada a partir del aminoácido triptófano. El proceso de biosíntesis consta de 4 pasos. En primer lugar, la enzima triptófano-5-monooxigenasa (T5M) hidroxila al triptófano dando lugar a 5-hidroxitriptófano; a continuación se produce una descarboxilación que da lugar a la serotonina o 5-hidroxitriptamina por acción de la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AAAD); la serotonina a su vez es acetilada a N-acetilserotonina por acción de la serotonin-N-acetiltransferasa (AANAT) y finalmente la N-acetilserotonin-O-metiltransferasa (ASMT) cataliza el paso final a melatonina (Boutin et al., 2005).

En mamíferos, la melatonina es una hormona secretada principalmente durante la noche por la glándula pineal, pero también es sintetizada en distintos tejidos extrapineales tales como la retina, cerebro, timo, epitelio de las vías respiratorias, médula ósea, intestino, ovario, testículo, placenta, y piel (Tan et al., 2007) a nivel local, con escasa aportación a los niveles de melatonina circulantes.

En relación a su distribución, se ha detectado la presencia de melatonina en diversos fluidos biológicos además del plasma sanguíneo (Carpentieri et al., 2012): saliva, orina, líquido amniótico, leche materna, líquido folicular, líquido cefalorraquídeo, bilis, médula ósea y plasma seminal.

En cuanto a su presencia en el tracto reproductor masculino, la melatonina ha sido identificada en el plasma seminal de seres humanos (Luboshitzky et al., 2002) y otros mamíferos como el morueco (Casao et al., 2010a), el caballo, el burro, el toro, el perro y el cerdo (González-Arto et al., 2016).

### **1.1.2. La melatonina y su papel fisiológico sobre la reproducción**

Una de las principales funciones de la melatonina es su papel en la regulación de la reproducción en especies estacionales, entre las que se incluye la ovina. Ebling y Hasting (1992) identificaron las bases de la reproducción estacional, de forma que la luz percibida por la retina sincroniza el ritmo circadiano endógeno con el ciclo externo del día y la noche a través de la melatonina. Así, la duración de la secreción nocturna de melatonina es directamente proporcional a la duración de la noche y, por tanto, su ritmo de producción se modifica a lo largo del año en función de la duración de los días, siendo su periodo de secreción más largo durante los días cortos de otoño e invierno (Ebling et al. 1992). Esto permite la sincronización de las actividades reproductivas en los animales con reproducción estacional, con el objetivo de que las crías puedan sobrevivir y madurar antes del inicio de los duros meses de invierno (Reiter, 1991).

La especie ovina tiene una reproducción de carácter estacional muy marcado, también regido por la secreción de melatonina, y caracterizado por la alternancia de un periodo no reproductivo en primavera y verano, y de un periodo de actividad reproductiva en otoño e invierno.

Pese a que la estacionalidad está menos marcada en el macho ovino que en la hembra, en la estación no reproductiva se produce una reducción en el volumen y el diámetro testicular, un descenso de la calidad seminal y una modificación de los perfiles hormonales (Langford et al., 1987). También se ha demostrado que el tratamiento con melatonina exógena durante la estación no reproductiva parece revertir el efecto de la estacionalidad en la especie ovina (Haresign et al., 1990). De hecho, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el tratamiento con implantes subcutáneos de melatonina durante la época no reproductiva en sementales ovinos permite aumentar la motilidad progresiva espermática (Casao et al., 2013) y mejorar otros parámetros reproductivos, dando como resultado un aumento de la fertilidad *in vivo* (Casao et al., 2013).

Asimismo, esta melatonina exógena causa un incremento en los niveles de testosterona y estradiol en plasma seminal ovino, así como un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, lo que también influye en el aumento de la calidad espermática (Casao et al., 2013).

Esta acción de los implantes de melatonina podría deberse al efecto de la hormona pineal sobre el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, que aumentaría la secreción de GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) (Lincoln and Clarke, 1997), FSH (hormona folículo estimulante) y LH (hormona luteinizante), y por tanto, de testosterona (Webster et al., 1991; Rosa et al., 2000). Sin embargo, estudios llevados a cabo por nuestro grupo también han demostrado una acción directa de la melatonina sobre el espermatozoide ovino, sobre el que ejerce un efecto antioxidante y modulador de la capacitación (Casao et al., 2010b).

#### **1.1.2.1. Melatonina y capacitación espermática**

La capacitación espermática constituye el conjunto de cambios que sufre el espermatozoide en el tracto reproductor femenino y que le permiten adquirir la capacidad fecundante (Yanagimachi, 1994). Es un proceso complejo y secuencial que se produce de forma natural en el interior del tracto reproductor femenino, en las cercanías del ovocito. Entre otros eventos fisiológicos y bioquímicos, el proceso de capacitación cursa con un aumento de la fluidez de la membrana plasmática (Gadella et al., 2008), cambios en la distribución del calcio intracelular (Grasa et al., 2006) y la activación de diferentes rutas de señalización celular (Yanagimachi, 1994). Estos eventos facultan a los espermatozoides para experimentar un cambio en el patrón de movimiento conocido como hiperactivación flagelar, interactuar con la zona pelúcida (ZP) del ovocito, sufrir la reacción acrosómica (AR) e iniciar la fusión con la membrana plasmática del ovocito (Yanagimachi, 1994).

Algunos trabajos previos han descrito un efecto directo de la melatonina sobre la capacitación espermática en especies como la humana (Bejarano et al., 2014), y la porcina (Rocco et al., 2018). Sin embargo, la relación entre melatonina y capacitación ha sido poco estudiada, y los datos aportados por la literatura son poco concluyentes. Nuestro grupo de investigación ha descrito que la melatonina puede ejercer acciones opuestas en el proceso de capacitación en espermatozoides ovinos, dependiendo de la concentración utilizada. Así, la melatonina actúa como agente capacitante a concentraciones de 100 pM, mientras que a una concentración de 1 µM inhibe la capacitación espermática.

Estos resultados han sido corroborados mediante experimentos de fecundación *in vitro* (FIV), que revelaron tasas de división embrionaria superiores en los ovocitos fecundados con muestras espermáticas tratadas con melatonina 100 pM, lo que se traduce en una mayor capacidad fecundante (Casao et al., 2010b).

El mecanismo de acción de la melatonina sobre la modulación de la capacitación espermática no se conoce en profundidad. Los efectos aparentemente contradictorios de la melatonina sobre la capacitación espermática podrían deberse, en parte, a su acción antioxidante. La melatonina es capaz de reducir los niveles de ROS/RNS (especies reactivas de oxígeno/nitrógeno) en muestras espermáticas, lo que evitaría el daño mitocondrial y por tanto la muerte celular. Pero, para que se produzca la capacitación es necesario cierto nivel de estas especies reactivas. Así, concentraciones altas de melatonina evitarían en parte la capacitación por eliminación de ROS/RNS, mientras que concentraciones más bajas de melatonina mantendrían unos niveles suficientes de las ROS/RNS, que actuarían como segundos mensajeros en la capacitación (Agarwal et al., 2003), sin obviar la posibilidad de otros mecanismos de acción. De esta manera, la melatonina del plasma seminal, que se encuentra en concentración elevada, podría proteger a los espermatozoides eyaculados del daño oxidativo (Reiter et al., 2009), así como prevenir la capacitación prematura eliminando gran parte de los radicales libres (Casao et al., 2010b). Sin embargo, al pasar al tracto reproductor femenino, los espermatozoides están expuestos a una concentración de melatonina menor, ya que esta hormona que se encuentra presente en el fluido folicular, llegaría en bajas concentraciones al fluido oviductal con la ovulación. Estas bajas concentraciones de melatonina, por tanto, favorecerían la capacitación espermática en las inmediaciones del ovocito, que es dónde debe ocurrir de forma fisiológica para que se produzca la fecundación.

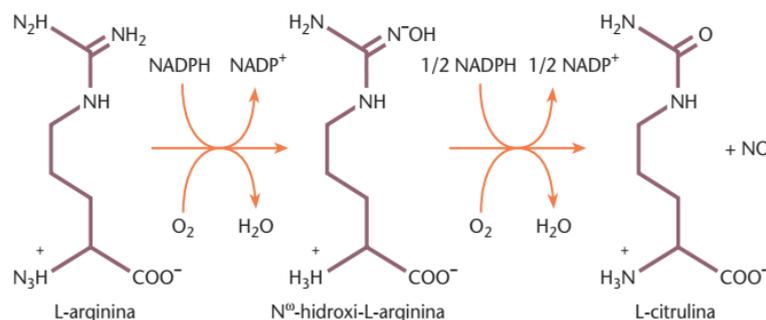
Exceptuando la acción antioxidante, la melatonina, al menos en células somáticas, ejerce la mayoría de sus funciones mediante la interacción con receptores específicos de membrana. Nuestro grupo de investigación ha identificado los receptores específicos de melatonina MT1 y MT2 en la membrana del espermatozoide ovino (Casao et al., 2012), y ha demostrado que la modulación de la capacitación espermática por la melatonina podría estar mediada por su unión al receptor MT2 (Gonzalez-Arto et al., 2016). Sin embargo, no debemos olvidar que, debido a su naturaleza anfipática, la melatonina también es capaz de atravesar la membrana plasmática y llevar a cabo alguno de sus efectos directamente en el citoplasma celular, mediante la unión a proteínas intracelulares de unión al calcio, como la calmodulina (Pozo et al., 1997) y la calreticulina (Macías et al., 2003).

## 1.2. El óxido nítrico y su papel en la reproducción y la funcionalidad espermática

El óxido nítrico (NO) es un gas diatómico que actúa como molécula de señalización celular, regulando diversos procesos fisiológicos en la célula. Se trata de un radical libre y permeable a las células, que controla funciones relevantes en el sistema cardiovascular, el sistema gastrointestinal, los tejidos secretores, el cerebro y el sistema inmune. En los últimos años, se ha evidenciado un papel fundamental del NO en la funcionalidad espermática.

### 1.2.1. Generación del óxido nítrico: la enzima óxido nítrico sintasa (NOS)

El NO se genera vía oxidación de L-arginina por la actividad de la óxido nítrico sintasa o sintetasa (NOS en sus siglas en inglés), usando NADPH y oxígeno como cofactores (**Figura 1**). Existen tres isoformas de esta enzima, la neuronal (nNOS), descrita por primera vez en tejido neuronal; la endotelial (eNOS), identificada originalmente en células endoteliales; y la inducible (iNOS), descrita por primera vez en macrófagos (Weinberg et al., 1995). Las isoformas caracterizadas de las NOS contienen un grupo hemo y presentan una estructura dimérica en condiciones nativas, con una masa molecular monomérica que oscila entre 126 y 160 kDa (Nathan, 1992; Centelles et al; 2004).



**Figura 1.** Reacción de la enzima Óxido Nítrico Sintasa para producir óxido nítrico a partir de L-arginina. Imagen obtenida de Centelles et al (2004).

Mientras que las isoformas neuronal y endotelial son constitutivas y muestran afinidad por el calcio y la calmodulina, la isoforma inducible es independiente de ambos (Buzadzic et al., 2015a). En cuanto a sus niveles de producción de NO, la isoforma iNOS es capaz de producir concentraciones del orden  $\mu\text{M}$ - $\text{mM}$ , en comparación con las isoformas eNOS y nNOS, que producen NO en concentraciones del rango  $\text{nM}$ - $\mu\text{M}$  (Nathan, 1992).

La existencia de una cuarta isoforma de la NOS, mtNOS o isoforma mitocondrial, se encuentra en entredicho ya que todavía no se ha conseguido su caracterización completa (Buzadzic et al., 2015a).

Hasta la fecha, la localización y función de las isoformas de la NOS se ha descrito en espermatozoides de la especie humana, en ganado bovino, y roedores (Leal et al., 2009). En la **Tabla 1** se esquematizan las funciones desempeñadas por cada una ellas, así como su localización en el tracto reproductor masculino.

**Tabla 1.** Función específica y localización de las isoformas de la NOS en el tracto reproductor masculino. Información obtenida de Buzadzic et al., (2015).

Isoforma	Localización	Función
<b>eNOS</b>	Células germinales, células de Sertoli, células de Leydig, miofibroblastos, células endoteliales de los vasos sanguíneos, espermatozoides	Apoptosis de células germinales, motilidad espermática, reacción acrosómica, espermatogénesis, erección del pene
<b>nNOS</b>	Células de Sertoli, células de Leydig, miofibroblastos, células endoteliales de los vasos sanguíneos, acrosoma de los espermatozoides	Motilidad espermática, erección del pene
<b>iNOS</b>	Células germinales, células de Sertoli, células de Leydig, espermatozoides	Apoptosis de células germinales, fertilización, interacción espermatozoide-ovocito, concentración espermática

### 1.2.2. Efectos del óxido nítrico en la funcionalidad espermática

En diversos estudios, llevados a cabo principalmente en la especie humana, se ha descrito que el NO ejerce diversos efectos sobre la funcionalidad espermática. Concretamente, se ha descrito su implicación en la motilidad, viabilidad, hiperactivación, capacitación, reacción acrosómica y la unión de los espermatozoides a la zona pelúcida. Asimismo, también se le ha atribuido un papel antiapoptótico en espermatozoides (Herrero et al., 2003).

Hellstrom y cols., (1994) demostraron que el empleo de nitroprusiato de sodio (SNP, compuesto liberador de NO) a bajas concentraciones (25-100 nM) mejora la motilidad y viabilidad de los espermatozoides humanos post-congelación, a la vez que reduce la peroxidación lipídica, mientras que experimentos llevados a cabo con altas concentraciones de NO puro (25-125 mM) y SNP (0,25-2,5 mM) revelaron una disminución en la motilidad espermática progresiva, posiblemente debido a una inhibición de la respiración mitocondrial espermática (Hellstrom et al., 1994).

Asimismo, se ha demostrado que la adición de un inhibidor competitivo de la NOS al medio de incubación, como es L-NAME (NG-nitro-L-arginina-metil-éster), reduce significativamente la motilidad espermática (Donnelly et al., 1997). Estos trabajos sugieren que el NO ejerce un papel bimodal sobre la motilidad espermática, de forma que bajas concentraciones de NO aumentan la motilidad, mientras que niveles elevados de NO actúan negativamente sobre dicho parámetro. El NO ejercería este efecto modulador sobre la motilidad espermática vía síntesis de cGMP (guanósil monofosfato cíclico) y la activación de quinasas dependientes (Miraglia et al., 2011).

En relación con la viabilidad espermática, este parámetro también estaría afectado por el NO de forma similar a la motilidad, de modo que muestras espermáticas humanas tratadas con altas concentraciones SNP presentan porcentajes de viabilidad inferiores a las no tratadas; mientras que el empleo de concentraciones bajas de SNP, aumentaría la viabilidad (Agarwal et al., 2003).

En cuanto al efecto del NO sobre la capacitación espermática, se ha demostrado que el tratamiento con diversos compuestos productores de NO acelera este proceso, mientras que el tratamiento con inhibidores lo reduce significativamente (Herrero et al., 1999). Además, recientemente se ha evidenciado mediante espectroscopia de resonancia paramagnética que la producción de NO se incrementa hasta siete veces durante la capacitación en espermatozoides humanos (Belén-Herrero et al., 2000). Estos datos indicarían que el NO endógeno es necesario para que los espermatozoides adquieran la capacidad fecundante completa. Asimismo, se ha demostrado que el O<sub>2</sub> y el NO se generan en las etapas iniciales de la capacitación, y que controlan diversos procesos, tales como la generación de cAMP (adenosín monofosfato cíclico), la fosforilación en serina y treonina de los sustratos de la PKA (proteína quinasa A), y la fosforilación en tirosina de proteínas del flagelo (de Lamirande et al., 2009).

La hiperactivación espermática, mencionada anteriormente en relación a la capacitación, confiere a los espermatozoides fuerza de propulsión para penetrar en el ovocito y es necesaria para la fecundación. Los efectos del NO sobre la hiperactivación son similares a los observados en la motilidad: concentraciones de NO inferiores a 1 μM aumentan la hiperactivación, mientras concentraciones superiores la reducen (Donnelly et al., 1997).

Sólo el espermatozoide hiperactivado y capacitado es capaz de llegar hasta el ovocito y unirse a la zona pelúcida del mismo. Tras ello, el espermatozoide experimentará la reacción acrosómica, que consiste en la exocitosis de enzimas proteolíticas del acrosoma del espermatozoide, que permitirán la penetración de la zona pelúcida y la fusión con la membrana plasmática del ovocito.

En cuanto a la implicación del NO en la reacción acrosómica, se ha demostrado que el NO es capaz de estimular la reacción exocítica mediante la activación de la adenilato ciclasa (AC) y moléculas posteriores de la ruta (Zini et al., 1995). De hecho, muestras espermáticas humanas capacitadas con bajas concentraciones de SNP muestran una mayor inducción de la reacción acrosómica, y un incremento en el porcentaje de espermatozoides unidos a la zona pelúcida (Revelli et al., 2001). Por el contrario, la unión espermatozoide-ovocito se reduce mediante la adición de L-NAME (inhibidor competitivo de la NOS) a distintas concentraciones (Francavilla et al., 2000).

### **1.2.3. Aplicaciones del óxido nítrico en la reproducción**

Las aplicaciones terapéuticas del NO han sido estudiadas desde una perspectiva enfocada al tratamiento de pacientes estériles. No obstante, algunas aproximaciones podrían ser tenidas en cuenta para mejorar la eficiencia reproductiva en ganadería, y concretamente, en la producción ovina.

El interés clínico principal del NO reside en el uso del sildenafil, conocido comercialmente como Viagra®, como agente terapéutico para prevenir la disfunción eréctil masculina. El sildenafil inhibe la actividad de la fosfodiesterasa dependiente de cGMP, aumentando los niveles de cGMP y NO. Además, se ha descrito que este fármaco estimula la capacitación y la hiperactivación de los espermatozoides humanos mediante la inhibición de la actividad fosfodiesterasa total, con un aumento en los niveles de cAMP (Lefièvre et al., 2000).

También se han llevado a cabo ensayos orientados a la mejora de la funcionalidad espermática mediante el uso de un precursor de la síntesis de NO, la L-arginina. Empíricamente, se ha visto que el tratamiento con L-arginina mejora la concentración y la motilidad espermática en pacientes con oligospermia y astenospermia mediante la generación de NO (Scibona et al., 1994). Stanislavov y cols., (2009) también describieron que el tratamiento con una combinación de pignogenol, un agente antioxidante, y aspartato de L-arginina en pacientes subfértiles mejoraba los parámetros de calidad espermática, aumentando significativamente el volumen, la concentración y la motilidad de los eyaculados (Stanislavov et al., 2009).

Otra posible aplicación terapéutica sería el empleo de inhibidores de NO como posible tratamiento dirigido a pacientes estériles con niveles elevados de NO en el semen (Buzadzic et al., 2015b).

Todos estos trabajos sugieren que una mejor comprensión del mecanismo de acción del NO sobre la funcionalidad espermática permitiría implementar aproximaciones terapéuticas enfocadas al control del NO endógeno de una manera efectiva.

### 1.3. Relación entre la melatonina, las óxido nítrico sintasas y el óxido nítrico

Como se ha comentado, la actividad antioxidante de la melatonina se ha relacionado, no sólo con su capacidad de neutralizar ROS, sino también RNS. En sistemas libres de células, Zhang y cols. demostraron que la melatonina es capaz de neutralizar, tanto NO, como el anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y el ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ) (Zhang et al., 1999).

No obstante, los efectos reguladores de la melatonina sobre el NO son variados, incluso bimodales, y obedecen a distintos mecanismos bioquímicos, no elucidados por completo.

La acción de la melatonina frente a la isoforma eNOS en células endoteliales constituye el objeto de estudio de varios trabajos. Se ha evidenciado que la melatonina aumenta la producción del NO y el patrón de expresión de eNOS en riñón de rata con daño inducido por alcohol (Sönmez et al., 2012). Además, la melatonina previene la disfunción endotelial incrementando los niveles de NO y la expresión de eNOS en ratas con hipoxia crónica permanente (Hung et al., 2013). Estos resultados indican que la melatonina ejerce funciones protectoras regulando positivamente la expresión de eNOS en células endoteliales, ya que el NO tiene importantes funciones en el control de la función renal (Zou and Cowley, 1999).

En cuanto a la isoforma nNOS, estudios *in vitro* han revelado que la melatonina a concentraciones fisiológicas inhibe la actividad de esta isoforma en la retina, hipotálamo, y cerebelo (Blanco et al., 2017). En contraste, se ha visto que la melatonina es capaz de regular positivamente la expresión de nNOS en neuronas de rata lesionadas por hipoxia (Blanco et al., 2017). Además, en células HaCat (queratinocitos humanos) se ha demostrado que la melatonina, a concentraciones del orden de nanomolar, es capaz de aumentar la expresión de la isoforma nNOS, y de los productos de oxidación del óxido nítrico, como nitrito y nitrato; y que a concentraciones micromolares mantiene su actividad antioxidante. No obstante, la expresión de las isoformas eNOS e iNOS no resultó afectada por la melatonina en este estudio (Sarti et al., 2013).

Como se ha comentado, la mayor parte del NO es producido por la isoforma iNOS. Diversos estudios concluyen que la melatonina puede reducir la actividad de esta isoforma en neuronas, células gliales, macrófagos, y en ciertos modelos animales de enfermedad (Blanco et al., 2017). Recientemente, Djordjevic y cols., demostraron que los niveles de la isoforma iNOS en retina de rata con diabetes inducida, se reducen significativamente tras el tratamiento con melatonina, sugiriendo un potencial papel de la melatonina como agente terapéutico para la reducción del daño oxidativo (Djordjevic et al., 2018). Sin embargo, la expresión de iNOS también se ha visto incrementada por la melatonina en corteza cerebral durante intoxicación alcohólica (Blanco et al., 2017).

En espermatozoides humanos, el grupo de du Plessis y cols. (2010) ha descrito que la melatonina, a una concentración de 2mM, es capaz de disminuir los niveles de NO. El mecanismo exacto que dirige este proceso no se conoce, y los autores sugieren varias formas de actuación de la melatonina: mediante la neutralización directa del NO, la activación de otras enzimas antioxidantes o la inhibición de la función de la isoforma eNOS, previniendo así la formación del NO (du Plessis et al., 2010).

Hasta la fecha, no existen más trabajos que relacionen el efecto de la melatonina sobre el óxido nítrico ni las NOS en espermatozoides. Por tanto, un conocimiento más profundo de la relación de la melatonina sobre el óxido nítrico en espermatozoides podría permitir mejorar la eficiencia reproductiva de los animales estacionales, pero también en la especie humana.

## 2. HIPÓTESIS

La melatonina es una hormona fundamental en la regulación de la reproducción en mamíferos estacionales, actuando principalmente a través del eje hipotálamo-hipofisario gonadal. En la especie ovina, la melatonina está también presente en plasma seminal y en el tracto reproductor tanto masculino como femenino, y es capaz de ejercer acciones directas sobre los espermatozoides, aunque los mecanismos moleculares que subyacen en estas acciones no han sido del todo elucidados.

Además, la melatonina es una molécula con gran poder antioxidante capaz de reducir, entre otras especies reactivas, los niveles de óxido nítrico (NO). Este óxido nítrico desempeña un papel fundamental en la funcionalidad espermática, modulando la motilidad, viabilidad, hiperactivación, capacitación y reacción acrosómica. Sin embargo, a concentraciones elevadas, el NO afecta negativamente la funcionalidad espermática.

El NO se genera mediante la actividad de la óxido nítrico sintasa o sintetasa (NOS), de la que existen tres isoformas, la neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS) y la inducible (iNOS). Estas isoformas, hasta el momento, no se han identificado en espermatozoides ovinos. En espermatozoides humanos se ha descrito que la melatonina es capaz de disminuir los niveles de NO, aunque hasta la fecha se desconoce si esta acción en espermatozoides se lleva a cabo mediante una disminución de la actividad de NOS.

En base a los antecedentes anteriormente expuestos, la hipótesis que se planteó en este trabajo es que la melatonina podría ser capaz de reducir los niveles de NO en espermatozoides ovinos actuando sobre la actividad de la NOS.

## OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la acción de la melatonina, a diferentes concentraciones fisiológicas, sobre los niveles de NO y la posible participación de NOS en este proceso en espermatozoides ovinos. Los objetivos específicos planteados fueron los siguientes:

- 1- Analizar los niveles de óxido nítrico en espermatozoides ovinos, tras su incubación en presencia de varias concentraciones de melatonina.
- 2- Identificar si las tres isoformas descritas de NOS están presentes en espermatozoides ovinos.
- 3- Evaluar los cambios en los niveles y/o distribución de estas isoformas de NOS, tras la incubación de los espermatozoides ovinos en presencia de varias concentraciones de melatonina

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Procesado de muestras espermáticas

##### 3.1.1. Obtención del semen

El semen empleado en este trabajo se obtuvo de nueve moruecos adultos (entre 3 y 6 años) de la raza rasa aragonesa, donados por la Asociación Nacional de Ganaderos de raza Aragonesa (ANGRA) y estabulados en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Zaragoza. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a la Licencia de Proyecto PI34/11 aprobada por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, y de acuerdo a la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. El personal del SEA se encargó del mantenimiento de los sementales, así como de la obtención de las muestras. Los animales fueron sometidos a un régimen de tres extracciones de semen semanales, con periodos de abstinencia de 2 o 3 días.

Se empleó el método de la vagina artificial para la obtención del semen. Dicho procedimiento constituye la técnica de elección en la mayoría de centros de inseminación artificial de animales domésticos. Mediante esta metodología, el macho que eyacula desarrolla totalmente la cadena de reflejos y la mecánica del coito fisiológico, aun sin existir penetración ni eyaculación en la vagina de la hembra.

Estudios anteriores desarrollados por nuestro grupo de investigación, demostraron que los segundos eyaculados de los moruecos presentaban los mejores parámetros de calidad seminal que los primeros o sucesivos: mayor proporción de espermatozoides viables, con alta motilidad individual progresiva y menor porcentaje de espermatozoides reaccionados (Ollero et al., 1996). Así pues, se obtuvieron dos eyaculados consecutivos por morueco, utilizándose únicamente el segundo de ellos para la experimentación posterior. Las muestras seminales se mantuvieron a 37°C tras su recogida y se trabajó con una mezcla de segundos eyaculados de diferentes sementales con el fin de mitigar las diferencias individuales.

##### 3.1.2. Método *swim-up*/dextrano

La técnica de *swim-up* permite la separación de los espermatozoides del plasma seminal y de otros restos celulares, además de obtener una población espermática con mayor motilidad y viabilidad (García-López et al., 1996a). El plasma seminal contiene factores discapacitantes que inhiben la capacidad fecundante de los espermatozoides y por ello resulta fundamental su eliminación.

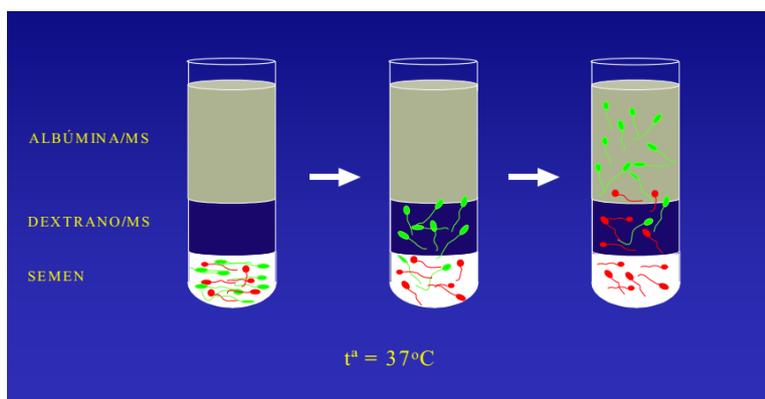
La técnica de *swim-up* se fundamenta en la capacidad de los espermatozoides de migrar desde el eyaculado depositado en el fondo de tubo hasta la superficie de una capa de medio depositado sobre ellos, atravesando una capa rica en dextrano que dificulta el paso de espermatozoides con baja motilidad y viabilidad.

Nuestro grupo desarrolló el procedimiento de *swim-up*/dextrano, adaptado para espermatozoides ovinos, a partir del método descrito por Alvarez *et al.* (1993) para espermatozoides humanos, modificando algunos de los pasos del protocolo, así como la composición del medio (Alvarez *et al.*, 1993). Cabe destacar que esta técnica de *swim-up* específica para ovino no requiere de centrifugación, ya que los espermatozoides de esta especie son especialmente sensibles a este proceso (García-López *et al.*, 1996b).

La composición del medio empleado para la realización del *swim-up* (denominado MS) fue la siguiente: 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 y sacarosa 200 mM. A este medio se le añadió 1,5 UI/ml de penicilina y 15 mg/ml de estreptomicina para evitar su contaminación. El pH del medio se ajustó a 6,5.

Para la realización del *swim-up*/dextrano se procedió de la siguiente forma (**Figura 2**): se pipetearon 500 µl de semen y se depositaron cuidadosamente en el fondo de un tubo redondeado. Sobre el eyaculado, se añadieron 500 µl de medio MS-Dx (30 mg dextrano/ml MS). Esta capa de dextrano es atravesada únicamente por los espermatozoides móviles y viables.

A continuación, se depositaron muy lentamente 1,5 ml de medio MS-A (5 mg albúmina sérica bovina (BSA)/ml MS), que constituye el medio de recogida de los espermatozoides. Se dejó incubar la preparación a 37 °C en posición vertical durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se recogieron los 750 µl de la fase superior, que se descartaron por contener restos de plasma seminal. Este proceso se repitió 3 veces más, añadiendo 750 µl de MS-A tras cada recogida, y conservando en otro tubo la mezcla de los 3 sobrenadantes obtenidos, constituyendo la muestra seleccionada por *swim-up*.



**Figura 2.** Esquema del proceso de selección espermática mediante el método *swim-up*/dextrano

### 3.1.3. Capacitación de muestras espermáticas *in vitro*

La muestra obtenida mediante el protocolo de *swim-up* fue sometida a un proceso de capacitación *in vitro*, en estufa a 39 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad durante 3 horas (condiciones capacitantes). Para ello, las muestras se incubaron en medio TALP completo, 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. Al medio referido se le adicionó 5 mg/ml de BSA (constituyéndose así el medio TALP-BSA) y se ajustó el pH a 7,4 (Parrish et al., 1988).

Asimismo, a las alícuotas de capacitación (excepto a la muestra **control**) se les añadió una mezcla de sustancias (o *cocktail*) descritas previamente como estimulantes de la capacitación *in vitro* en espermatozoides ovinos (Colas et al., 2008): dibutilil-cAMP 1 mM (db-cAMP, análogo del cAMP), cafeína 77,24 mM y teofilina 1 mM (sustancias inhibitoras de fosfodiesterasas), ácido okadaico 0,2 µM (OA, inhibidor de fosfatasa) y metil-β-ciclodextrinas 2,5 mM (MβCD, agente secuestrador de colesterol). En general, esta mezcla de sustancias provoca la elevación del cAMP, necesario para la capacitación. Dichas alícuotas serán referidas en la presente memoria como muestras **cocktail** (con agentes elevadores del cAMP).

La melatonina empleada en los experimentos se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) y luego en PBS, y se añadió a muestras *cocktail* para conseguir concentraciones finales de 1 µM y 100 pM. La concentración final de DMSO en todas las muestras fue de 0,1%, incluidas la muestra control y *cocktail*.

La concentración celular de las muestras de capacitación fue de  $1,6 \times 10^8$  cel/ml en un volumen final de 500 µl. En la presente memoria, las muestras espermáticas sujeto de estudio serán denominadas con la siguiente nomenclatura: **swim-up** (muestras seleccionadas por *swim-up*/dextrano, libres del plasma seminal y sin incubar en condiciones capacitantes), **control** (muestras incubadas en condiciones capacitantes, en medio TALP-BSA), **cocktail** (muestras incubadas en condiciones capacitantes, en medio TALP-BSA junto con sustancias elevadoras del cAMP), **Mel. 1 µM** (muestras *cocktail* incubadas en condiciones capacitantes con melatonina 1 µM) y **Mel. 100 pM** (muestras *cocktail* incubadas en condiciones capacitantes con melatonina 100 pM).

## 3.2. Evaluación de muestras espermáticas

### 3.2.1. Cálculo de la concentración espermática

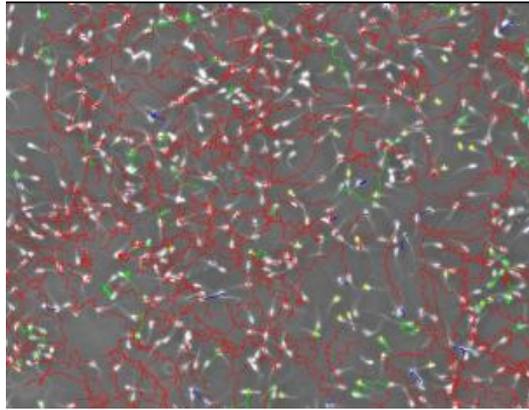
La concentración espermática (cel/ml) de las muestras obtenidas mediante el procedimiento de *swim-up* se determinó mediante el recuento de los espermatozoides existentes en 16 cuadrantes (0,1 mm<sup>3</sup>) de una cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania), tras una dilución 1/100 con agua miliQ. Se depositó una gota de 7 µl de la dilución en la cámara y se empleó el objetivo 10x en un microscopio de contraste de fases para el recuento. La fórmula consultada para el cálculo de la concentración espermática (C) fue la siguiente:

$$C \text{ (espermatozoides / ml)} = n^{\circ} \text{ espermatozoides contados} \cdot 10^4 \cdot \frac{1}{\text{dilución}}$$

### 3.2.2. Análisis de la motilidad espermática

La evaluación de la motilidad espermática de las muestras seleccionadas por *swim-up*, así como de las muestras capacitadas, se realizó mediante un sistema computarizado de análisis espermático (CASA, *Computer Assisted Semen Analysis*), específicamente el ISAS 1.0.4 (Proiser SL, Valencia, España). Para ello, fue necesario realizar una dilución 1/10 y 1/2 en medio bifase de las muestras *swim-up* y las capacitadas, respectivamente. El medio bifase empleado está compuesto por sacarosa 0,25 M, EGTA 0,1 mM, fosfato sódico 4 mM, glucosa 50 mM, HEPES 100 mM y KOH 20 mM.

Para el análisis se depositó una gota de 7 µl de cada muestra en un portaobjetos y se utilizó un microscopio de contraste de fases provisto de un objetivo 10x y conectado a una cámara de video. El programa informático ISAS evalúa la trayectoria de los espermatozoides (**Figura 3**) y los clasifica en estáticos y móviles, además de calcular la motilidad progresiva, es decir, el porcentaje de espermatozoides móviles que se desplazan en línea recta.



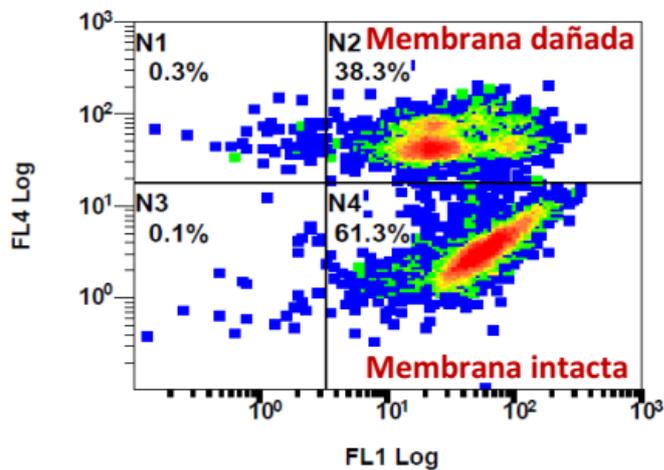
**Figura 3.** Análisis de la imagen microscópica (objetivo de 10x) integrada por el programa ISAS (Integrated Semen Analysis System). Aparecen marcados los espermatozoides estáticos (en amarillo), y la trayectoria de los espermatozoides móviles lentos (azul), medios (verde) y rápidos (rojo).

### 3.2.3. Análisis de la viabilidad espermática

La evaluación de la viabilidad espermática de las muestras de estudio se realizó con una doble tinción con diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) y yoduro de propidio (PI), según el protocolo descrito por Harrison y cols. (Harrison and Vickers, 1990). Esta técnica se fundamenta en la distinta coloración que adquieren los espermatozoides incubados con los colorantes referidos en función de su integridad de membrana. Los espermatozoides viables mantienen íntegra su membrana plasmática, por lo que son impermeables al yoduro de propidio, y además estas células contienen esterasas activas capaces de hidrolizar el diacetato de carboxifluoresceína incoloro a carboxifluoresceína, por lo que adquieren una coloración verde fluorescente. Por otro lado, los espermatozoides no viables presentan la membrana plasmática dañada, por lo que el yoduro de propidio penetra al interior de la célula, se une al DNA, y les proporciona una coloración rojo fluorescente.

Para esta tinción, las muestras se diluyeron en medio de bifase hasta un volumen final de 500  $\mu\text{l}$  y una concentración final de células de  $6 \times 10^6$  células/ml. Seguidamente, se añadieron 3  $\mu\text{l}$  de diacetato de carboxifluoresceína (10  $\mu\text{M}$  en DMSO) y 3  $\mu\text{l}$  yoduro de propidio (7,3  $\mu\text{M}$  en agua destilada), y las células se fijaron con 5  $\mu\text{l}$  de formaldehído (0,5% en agua destilada). Las muestras se incubaron en estufa y en oscuridad a 37 °C durante 15 minutos.

El análisis de viabilidad se realizó por citometría de flujo, mediante un citómetro Beckman Coulter FC 500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EEUU), que usa un láser de argón a 488 nm. La fluorescencia verde se detectó mediante un filtro de banda a 525 nm (FL-1) y la fluorescencia roja con un filtro de 675 nm (FL-4). Se evaluaron un total de 20.000 células, y se diferenciaron espermatozoides viables (PI-/CFDA+) y espermatozoides no viables (con membrana dañada, PI+) (*Figura 4*).



*Figura 4.* Diagrama representativo de la integridad de membrana evaluada por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

### 3.2.4. Determinación del estado de capacitación

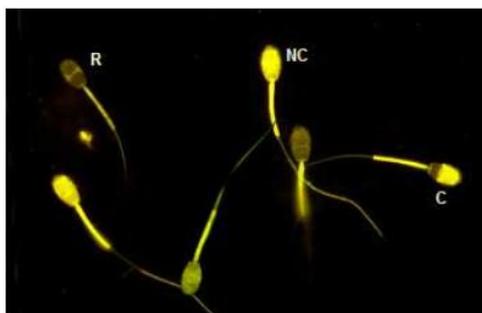
La evaluación del estado de capacitación se realizó mediante tinción con clorotetraciclina (CTC), un antibiótico capaz de penetrar al interior celular y de unirse al ión  $Ca^{2+}$  libre. La unión de la CTC al calcio da lugar a diferentes patrones de fluorescencia en función de la distribución intracelular de dicho catión, que es dependiente del grado de capacitación del espermatozoide. Así, estudiando la localización de la fluorescencia, se puede evaluar el porcentaje de espermatozoides capacitados, no capacitados y reaccionados (Mortimer and Maxwell, 2004). Para el presente estudio, se siguió el procedimiento descrito y validado para la especie ovina por nuestro grupo de investigación (Grasa et al., 2006), una versión modificada del protocolo de Ward y cols.) (Ward and Storey, 1984).

Para llevar a cabo la tinción, se mezclaron 20  $\mu$ l de muestra con 20  $\mu$ l de solución CTC (2 mg de CTC disueltos en 5 ml de un tampón compuesto por Tris 20 mM, cisteína 5  $\mu$ M y NaCl 130 mM, pH 7,8) y 5  $\mu$ l de un agente fijador (1,25% p/v de paraformaldehído en tampón TRIS-HCl 0,5 M).

Tras una incubación de 30 minutos a 4 °C en oscuridad, se depositaron en un portaobjetos 5 µl de la muestra teñida y 4 µl de trietilendiamina (DABCO (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos, 0,22M diluido en glicerol:PBS en relación 9:1 v/v) para preservar la fluorescencia. Finalmente, se colocó el cubreobjetos y se selló la preparación con esmalte. Este proceso se llevó a cabo en semi-oscuridad.

Las muestras se evaluaron con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E-400) equipado con un filtro V-2A (filtro de 420-490 nm de excitación y 510 nm de emisión) y usando el objetivo de inmersión (100x). Se llevó a cabo la evaluación de 200 espermatozoides por muestra analizada.

De acuerdo a los patrones de tinción, se distinguieron distintos tipos de espermatozoides (**Figura 5**). Aquellos que presentaban fluorescencia en la cabeza, con o sin banda ecuatorial brillante, se consideraron no capacitados (NC). Los espermatozoides con fluorescencia en la porción anterior de la cabeza se catalogaron como capacitados (C). Finalmente, las células sin fluorescencia en la cabeza se consideraron como espermatozoides con el acrosoma reaccionado (AR).



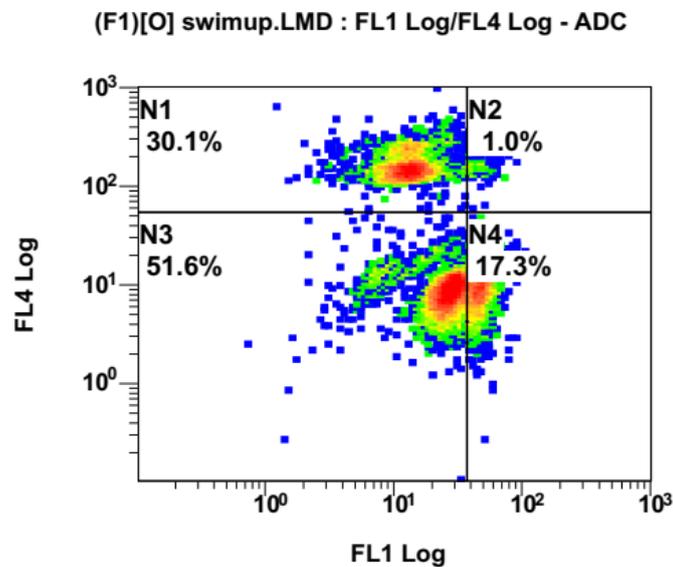
**Figura 5.** Espermatozoides ovinos teñidos con CTC y visualizados con microscopía de fluorescencia filtro V-2A y 1000x. Se pueden distinguir espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C), y reaccionados (AR).

### **3.3. Determinación de los niveles de óxido nítrico (NO) mediante citometría de flujo**

Los niveles intracelulares de NO fueron evaluados por citometría de flujo mediante la utilización de la sonda fluorescente 4,5-Diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA, Cayman Chemical, Ann Arbor, Míchigan, Estados Unidos). Se trata de un compuesto permeable capaz de penetrar al interior celular donde es hidrolizado por esterasas intracelulares a DAF-2, que reacciona con el NO, dando lugar al compuesto fluorescente DAF-2T. Las longitudes de onda de excitación y emisión del DAF-2 DA se sitúan en 485 nm y 538 nm, respectivamente.

Para la realización de los experimentos, nos basamos en el protocolo descrito previamente por du Plessis y cols. para espermatozoides humanos (du Plessis et al., 2010). Las muestras seleccionadas por *swim-up*, y las muestras capacitadas se diluyeron en medio bifase (1/60 y 1/30 respectivamente), hasta una concentración aproximada de  $5 \times 10^6$  cel/ml. Las muestras se tiñeron con 3  $\mu$ l de DAF-2 DA (10  $\mu$ M en DMSO) y 3  $\mu$ l de yoduro de propidio (PI; 7,3  $\mu$ M en agua destilada), y se fijaron con 5  $\mu$ l de formaldehido 0,5% v/v.

La determinación de los niveles de NO se realizó por citometría de flujo (**Figura 6**), empleando un citómetro Beckman Coulter FC 500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EEUU) y los filtros FL1-525  $\pm$  5 nm (para DAF-2) y FL4-675 $\pm$  5 nm (para PI). Se evaluaron un total de 20000 células. Así, pudieron diferenciarse espermatozoides no viables con bajos niveles de NO (PI<sup>+</sup>/DAF2<sup>-</sup>), viables con bajos niveles de NO (PI<sup>-</sup>/DAF2<sup>-</sup>), viables con altos niveles de NO (PI<sup>-</sup>/DAF2<sup>+</sup>), y no viables con altos niveles de NO (PI<sup>+</sup>/DAF2<sup>+</sup>).



**Figura 6.** Diagrama representativo de la determinación de los niveles de NO evaluada por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

### 3.4. Detección de las isoformas de NOS por Western-Blot

#### 3.4.1. Extracción de proteínas espermáticas

La extracción de las proteínas se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Colas y cols. (Colas et al., 2008). Así, se tomaron 200  $\mu$ l de cada muestra y se añadieron 200  $\mu$ l de medio bifase. Estas mezclas se centrifugaron a 800 x g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El *pellet* resultante se resuspendió en 200  $\mu$ l de 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), e inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos).

No obstante, previamente a la optimización del método se testaron distintos métodos de extracción de las proteínas: los medios Cell Lysis Buffer (Cell Signaling TECHNOLOGY), y PathScan® Sandwich ELISA Lysis Buffer (Cell Signaling TECHNOLOGY), ambos pertenecientes a kits comerciales. Cabe añadir que se probó a utilizar microconcentradores con el objetivo de concentrar las proteínas de alto peso molecular.

A continuación, las muestras se incubaron durante 5 minutos a 100 °C en un baño de arena. Pasado este tiempo, las preparaciones se centrifugaron a 10000 x g durante 8 minutos y se recogió el sobrenadante. Finalmente, se añadieron 5  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol, 5  $\mu$ l de glicerol al 20% y 2  $\mu$ l de azul bromofenol al 1 % con un 10% de glicerol por cada 100  $\mu$ l de sobrenadante, y los lisados se almacenaron a -20 °C hasta su uso posterior.

#### 3.4.2. SDS-PAGE y Western-Blot

El siguiente paso fue la separación de las proteínas en una dimensión, de acuerdo al método descrito por *Laemmli* y cols. (Laemmli, 1970). Previamente se llevó a cabo un proceso de optimización del protocolo para la detección de las isoformas de la NOS.

Cabe añadir que, debido a la escasa señal obtenida en los primeros experimentos, se intentó llevar a cabo un método de concentración de las proteínas de alto peso molecular extraídas, utilizando microconcentradores (Amicon Ultra 0,5 ml 50k) y realizando un centrifugación de 30 minutos a 13000 g y a 4 °C. No obstante, los resultados obtenidos fueron similares a la no utilización de los mismos.

Para la realización de las electroforesis, se ensayaron distintas concentraciones de acrilamida (8%, 10%, o 12%), y para llevar a cabo la transferencia, se probaron dos métodos distintos: un sistema de transferencia en húmedo (Mini Trans-Blot® Cell, BioRad, Hercules, CA) y un sistema de transferencia rápido (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad Laboratories, USA).

Finalmente, las proteínas se separaron en geles de acrilamida al 8%, a 130 V durante 90 minutos y a 4 °C. Se utilizaron patrones de comparación de pesos moleculares de 10 a 250 kDa (Bio-rad, Hercules, California, Estados Unidos). Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Amersham Hybond P 0.45 PVDF blotting membrane) mediante el sistema de transferencia húmedo (Mini Trans-Blot® Cell, Bio-Rad Laboratories, USA), a 22 V durante 20 horas a 4 °C, y empleando un medio de transferencia compuesto por TRIS 25mM, glicina 192 mM y metanol.

Posteriormente, se procedió al bloqueo de los sitios no específicos de unión de las membranas mediante una incubación de 4 horas en PBS con 5% BSA (p/v) a temperatura ambiente. Tras tres lavados de 15 minutos con PBS-Tween (0,1% p/v de Tween-20 en PBS), las membranas se incubaron a 4 °C durante toda la noche con los anticuerpos primarios para las tres isoformas de NOS: anticuerpo policlonal de conejo frente a eNOS, anticuerpo monoclonal de conejo frente a iNOS y anticuerpo monoclonal de conejo frente a nNOS (todos de Abcam, Cambridge, Reino Unido). Se realizaron pruebas con los anticuerpos diluidos 1/500 y 1/1000 (v/v) en PBS Tween con 1% BSA (p/v).

Tras esto, se efectuaron 3 lavados de 15 minutos con PBS-Tween y las membranas se incubaron durante 75 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, con el anticuerpo secundario IRDye® 680RD Donkey anti-Rabbit diluido 1:15000 PBS-Tween con 1% BSA (p/v). Tras tres nuevos lavados, las membranas se visualizaron utilizando el sistema de adquisición de imágenes para Western Blot basado en fluorescencia Odyssey Clx Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, Estados Unidos).

### **3.5. Determinación de la distribución de las isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) por inmunofluorescencia indirecta**

La localización de las isoformas de la NOS, epitelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS), en espermatozoides ovinos se estudió mediante inmunofluorescencia indirecta.

El primer paso fue la optimización del protocolo de inmunofluorescencia indirecta para las isoformas de la NOS. Para ello, primero se ensayaron distintas diluciones de los anticuerpos primarios en PBS con BSA al 1% (v/v): 1/100, 1/50 y 1/25. La concentración de las células fijadas ( $8 \times 10^6$  cel/ml y  $4 \times 10^6$  cel/ml) fue otra de las variables ensayadas.

Asimismo, se evaluó la concentración adecuada de formaldehído como fijador: 3,7% y 0,5% (v/v). Finalmente, las muestras *swim-up* y capacitadas se diluyeron a una concentración de  $8 \times 10^6$  cel/ml en medio bifase con un volumen final de 500  $\mu$ l, y se fijaron con 50  $\mu$ l formaldehído al 0,5% (v/v).

Las muestras se incubaron para su fijación durante 20 minutos en una rueda giratoria a temperatura ambiente. Tras ello, se centrifugaron durante 6 minutos a 900 x g, y tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 500  $\mu$ l de PBS (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,76 mM, pH 7,4).

Posteriormente, 40  $\mu$ l de cada suspensión de células se depositaron en un portaobjetos polilisinado (Superfrost Plus, Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos), dejando secar la gota a temperatura ambiente.

Una vez las células se adhirieron a la superficie del portaobjetos, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS en agitación. Como las NOS son enzimas citoplasmáticas, las células se permeabilizaron con Tritón 0,5% (v/v) en PBS, y se volvieron a fijar con paraformaldehído (1,25 % p/v en tampón TRIS-HCl 0,5M). De nuevo, se realizaron tres lavados de 5 minutos en PBS en agitación y posteriormente los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con BSA al 5% (p/v) en PBS a 4 °C durante toda la noche. Pasado este tiempo, se volvieron a lavar las muestras tres veces más en PBS y se añadieron los anticuerpos primarios (anticuerpo policlonal de conejo frente a eNOS, anticuerpo monoclonal de conejo frente a iNOS, y anticuerpo monoclonal de conejo frente a nNOS, todos ellos de Abcam, Cambridge, Reino Unido). Los anticuerpos se utilizaron finalmente a una dilución 1/25 (v/v) en PBS con BSA al 1% (v/v). Las muestras se incubaron con los anticuerpos a 4 °C durante toda la noche.

Al día siguiente, las muestras se lavaron otras tres veces con PBS y se añadió un anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488 anti-conejo generado en pollo, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) conjugado con un fluorocromo. La incubación se realizó durante 90 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras otros tres lavados, se añadió DABCO para preservar la fluorescencia, se colocó el cubreobjetos y se selló la preparación con esmalte.

Las muestras se evaluaron por microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse E-400 con iluminación de epifluorescencia y un filtro V-2) con un objetivo de inmersión (100x). Cabe señalar que la congelación de las muestras durante al menos 24 horas, previamente a la observación de las mismas mejoró la calidad de la señal obtenida. Para la captura de las imágenes se empleó el software NIS Elements D 2.30 (Nikon), se aplicó un nivel de exposición entre 1 y 1,5 segundos para las isoformas neuronal y epitelial; y de 3 segundos para la isoforma inducible. Se analizaron 200 espermatozoides por muestra.

### **3.6. Análisis estadístico**

Los resultados mostrados en la presente memoria se representan como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM) del número de experimentos (n), indicados en cada caso. Los análisis estadísticos se efectuaron con el software GraphPad Prism 5 (v. 5.03; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Las diferencias en motilidad, viabilidad, estado de capacitación, así como el porcentaje de células vivas con altos niveles de NO entre los distintos grupos experimentales se analizaron por chi-cuadrado. El mismo análisis estadístico se utilizó para evaluar las diferencias entre los distintos inmnotipos detectados para cada una de las isoformas NOS. Además, las correlaciones descritas (entre el porcentaje de los distintos inmnotipos y los niveles de NO con respecto al grado de capacitación y la motilidad de las muestras) se llevaron a cabo mediante la realización del test de correlación de Spearman.

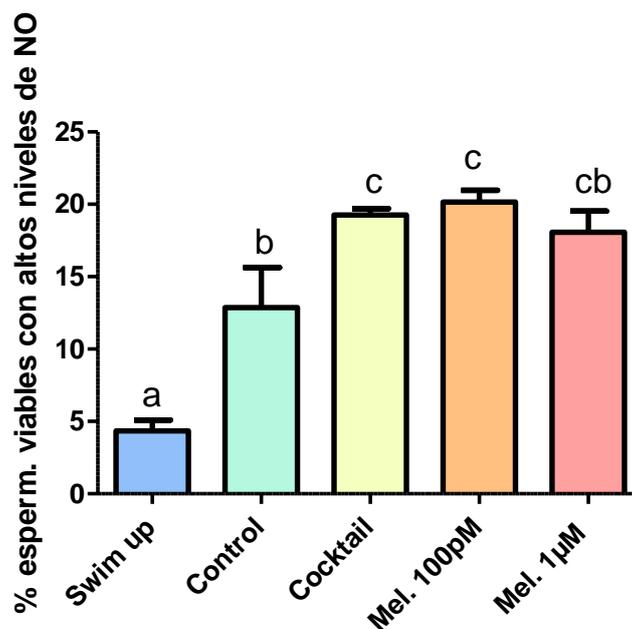
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Efecto de la melatonina sobre los niveles de óxido nítrico en muestras espermáticas sometidas a capacitación

Como primer objetivo del trabajo se estudiaron los niveles de NO en muestras *swim up*, control y *cocktail*, así como en muestras incubadas con melatonina 100 pM y 1  $\mu$ M, con el objetivo de valorar la influencia de la melatonina sobre los niveles de NO. Conjuntamente, se evaluaron cambios en el estado de capacitación por tinción con CTC, la motilidad (total y progresiva) y la integridad de membrana.

El proceso de capacitación dio lugar a un incremento significativo de los niveles de NO espermáticos en todas las muestras en comparación con la muestra swim-up ( $P < 0.05$ ). La adición de agentes elevadores del cAMP provocó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de los espermatozoides viables con altos niveles de NO (muestra *cocktail*,  $19,4 \pm 0,4 \%$ ) en comparación con la muestra control ( $12,9 \pm 2,9\%$ ).

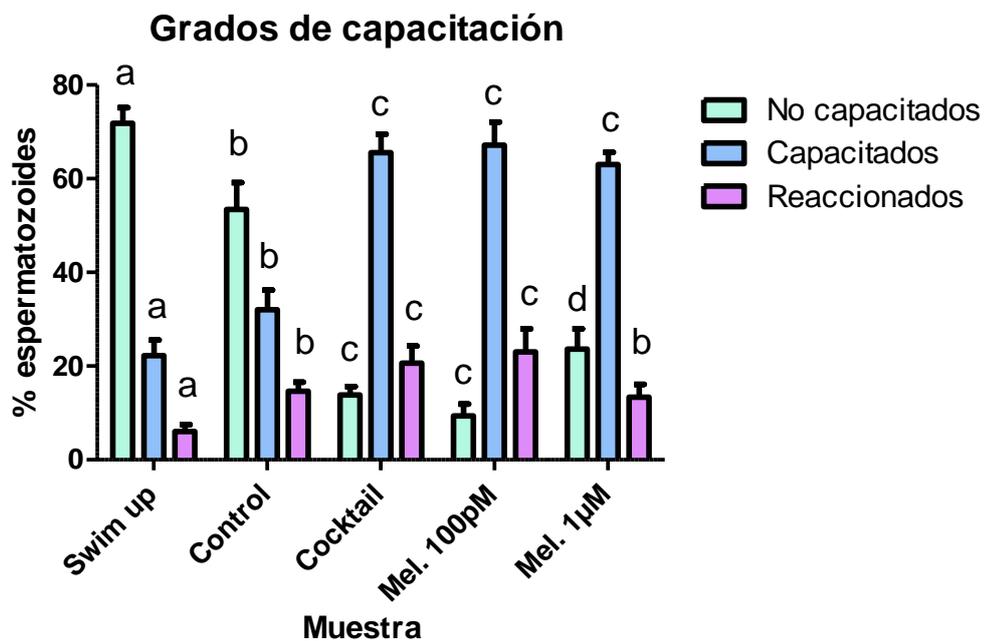
Además, mientras que se produjo un aumento significativo en los niveles de NO en las muestras *cocktail* y Mel.100 pM con respecto al control, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de NO entre las muestras control y Mel. 1 $\mu$ M. Estos datos indicarían que la melatonina a concentración 1  $\mu$ M es capaz de prevenir el aumento en la producción de NO, a niveles similares a la capacitación solo con medio TALP.



**Figura 7.** Porcentaje de espermatozoides viables con altos niveles de NO ( $PI/DAF2^+$ ) antes de la capacitación (*swim-up*) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes ( $39^\circ C$  y  $5\%$  de  $CO_2$ ) en medio TALP (control), con alto cAMP (*cocktail*) y con diferentes concentraciones de melatonina añadidas al medio *cocktail*. Los valores se representan como media  $\pm$  EEM ( $n=3$ ).

En cuanto al estado de capacitación, como era de esperar, tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes el incremento de espermatozoides capacitados en la muestra *cocktail* fue muy significativo, llegando a ser de un  $66,6 \pm 3,9$  %, frente a un  $32,0 \pm 4,2$  % en la muestra control (**Figura 8**). Esto se correspondería con resultados previos de nuestro grupo, que demostraron que para que se produzca la capacitación en los espermatozoides ovinos son necesarias sustancias que incrementen los niveles de cAMP, debido probablemente a la importante cantidad de fosfodiesterasas presentes en el espermatozoide ovino (Colas et al., 2008). La adición de melatonina a las muestras *cocktail* no modificó significativamente el porcentaje de espermatozoides capacitados a ninguna de las concentraciones ensayadas ( $67,2 \pm 4,9$  % y  $63,0 \pm 2,7$  % para 100 pM y 1  $\mu$ M, respectivamente).

Como se observa en la **Figura 8**, el porcentaje de espermatozoides no capacitados fue significativamente mayor en la muestra Mel. 1 $\mu$ M ( $23,6 \pm 4,4$  %) que en las muestras *cocktail* ( $13,8 \pm 1,9$  %) y Mel. 100pM ( $9,4 \pm 2,5$  %). Estos resultados corroboran los obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación sobre el efecto descapacitante de la melatonina en el espermatozoide ovino a concentraciones altas, y capacitante a bajas concentraciones (Casao et al., 2010b).



**Figura 8.** Porcentaje de espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados según la tinción con clorotetraciclina (CTC), 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 CAMP (*cocktail*) y con diferentes concentraciones de melatonina añadidas al medio *cocktail*. Los valores se representan como media  $\pm$  EEM (n=5). Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras (P<0,05)

En cuanto al porcentaje de espermatozoides reaccionados, éste se incrementa en las muestras sometidas a condiciones capacitantes, con respecto a la muestra *swim up* ( $6,0 \pm 1,5 \%$ ), presentando el porcentaje más elevado la muestra incubada con 100 pM de melatonina ( $23,0 \pm 5,0 \%$ ).

Además, el test de correlación de Spearman reveló que las muestras con altos niveles de NO se correlacionaban positivamente con las muestras más capacitadas ( $P < 0,05$ ,  $r = 0,63$ ) y negativamente con las muestras menos capacitadas ( $P < 0,05$ ,  $r = -0,75$ ). Por lo tanto, se puede concluir que el proceso de capacitación espermática provoca un aumento en los niveles de producción de NO y/o que estos niveles son necesarios para que el proceso se produzca, tal y como se ha observado en estudios previos (Herrero et al., 1999; Belén-Herrero et al., 2000; de Lamirande et al., 2009).

Asimismo, este análisis reveló que unos niveles más elevados de NO también se correlacionan negativamente ( $P < 0,05$ ,  $r = -0,90$ ) con la motilidad progresiva, que es un parámetro que disminuye normalmente durante la capacitación, ya que, como hemos comentado, durante este proceso se produce la hiperactivación flagelar. Recordemos que la hiperactivación es un cambio en el patrón de movimiento, que deja de ser progresivo y se caracteriza por un batido asimétrico del flagelo (Yanagimachi, 1994). Los procesos de capacitación e hiperactivación son complementarios y se desarrollan simultáneamente en condiciones fisiológicas (Ho and Suarez, 2001).

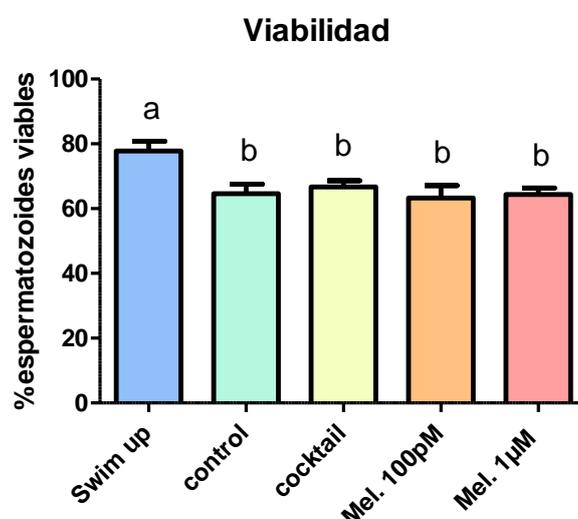
Como se puede observar en la **Tabla 2**, tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes se pudo observar un descenso de la motilidad total en todas las muestras estudiadas, observándose diferencias estadísticamente significativas con respecto al *swim up*. En cuanto al porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, todas las muestras presentaron valores inferiores a los de la muestra *swim up*, resultando dichos descensos estadísticamente significativos en todas las muestras excepto en el control. La muestra incubada con 1  $\mu\text{M}$  de melatonina mostró la menor motilidad progresiva.

**Tabla 2.** Porcentaje de espermatozoides móviles totales y móviles progresivos 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 CAMP (*cocktail*) y con diferentes concentraciones de melatonina añadidas al medio *cocktail*. Los resultados se muestran como media ± EEM de 3 experimentos. Se muestran solo las diferencias significativas con respecto al *swim-up*: \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P < 0,001.

Motilidad					
	<i>Swim up</i>	Control	<i>Cocktail</i>	Mel. 100 pM	Mel. 1 μM
Motilidad total (%)	91,67 ± 3,18	85,00 ± 2,08*	81,67 ± 4,67***	77 ± 4,72***	82,67 ± 6,17***
Motilidad progresiva (%)	36,33 ± 4,91	36,33 ± 4,91	15,00 ± 0,58***	17,33 ± 3,84***	15,33 ± 2,73***

En cuanto a la integridad de membrana, el proceso de capacitación redujo significativamente la viabilidad de todas las muestras. Así, se pasó de un 91,7 ± 3,0% de espermatozoides viables en la muestra obtenida tras el *swim up*, a valores en torno al 60% en todas las muestras incubadas en condiciones capacitantes durante 3 horas, sin diferencias significativas entre ellas: control (64,6 ± 3,0 %), *cocktail* (66,7 ± 1,9 %), Mel. 100 pM (63.3 ± 3,8 %) y Mel. 1μM (64,4 ± 2,0 %) (**Figura 9**).

Las diferencias mencionadas en los niveles de producción de NO, no se deben a diferencias en la viabilidad de las células y el NO no parece ejercer efectos citotóxicos ni perjudicar la integridad de membrana de los espermatozoides (**Figura 9**).



**Figura 9.** Porcentaje de espermatozoides viables 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 CAMP (*cocktail*) y con diferentes concentraciones de melatonina añadidas al medio *cocktail*. Los valores se representan como media ± EEM (n=4). Diferentes letras indican diferencias significativas (P<0,05)

La capacidad de la melatonina de disminuir los niveles de NO ya fue descrita por du Plessis *et al* (2010) en espermatozoides humanos y también por otros autores en células somáticas (Blanco *et al.*, 2017) (Sarti *et al.*, 2013) (Djordjevic *et al.*, 2018) (du Plessis *et al.*, 2010). Es interesante incidir en el papel bimodal de la melatonina en cuanto a su influencia en los niveles de NO en función de la concentración. Así, cantidades elevadas de melatonina, como las presentes de forma fisiológica en el plasma seminal, podrían proteger a los espermatozoides frente al daño oxidativo, así como prevenir la capacitación reduciendo los niveles de ROS/RNS. Una vez en el tracto reproductor femenino, el espermatozoide estaría 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 estas bajas concentraciones de melatonina no reducirían tanto los niveles de ROS/RNS, permitiendo por tanto, la capacitación espermática.

Precisamente, tal y como se observa en la **Figura 8**, el porcentaje de espermatozoides no capacitados en la muestra Mel. 1 $\mu$ M (23,6  $\pm$  4,4) es significativamente superior que en las muestras *cocktail* (13,8  $\pm$  1,9) y Mel. 100pM (9,4  $\pm$  2,5), lo que de nuevo indicaría que la capacitación está estrechamente relacionada con la producción de NO. Es decir, la melatonina a concentración 1  $\mu$ M reduce la capacitación espermática, y una posible vía sería disminuyendo los niveles de NO.

## **4.2. Identificación de las isoformas de la NOS en espermatozoides ovinos**

### **4.2.1. Optimización de un procedimiento de detección de las isoformas de la óxido nítrico sintasa por Western Blot**

La identificación de las isoformas de NOS mediante Western Blot requirió de un proceso de optimización del protocolo más adecuado para estas enzimas.

El primer paso fue la elección del medio adecuado para la extracción de las proteínas. Para ello, se probaron los medios Cell Lysis Buffer (Cell Signaling TECHNOLOGY), y PathScan® Sandwich ELISA Lysis Buffer (Cell Signaling TECHNOLOGY), ambos pertenecientes a kits comerciales. Asimismo, también se extrajeron las proteínas utilizando el medio ESB (*Extraction Sample Buffer*).

Para la preparación del gel separador, se probaron distintos porcentajes de acrilamida, concretamente del 12%, 10% y 8%, con el objetivo de conseguir una separación más efectiva de las proteínas de alto peso molecular. La cantidad de proteína a cargar constituyó otra variable a optimizar, se probó a cargar volúmenes entre 10 y 50  $\mu\text{l}$  de muestra de proteínas, que corresponderían a las proteínas extraídas de  $8 \times 10^9$  y  $1,6 \times 10^9$  espermatozoides.

Asimismo, se probaron dos métodos para la transferencia de las proteínas: utilizando una unidad de transferencia en húmedo (Mini Trans-Blot® Cell BioRad, Hercules,CA) y un sistema de transferencia rápido (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad Laboratories, USA). Adicionalmente, también se probaron distintos tiempos de transferencia de las proteínas en ambos sistemas: de 5 hasta 20 minutos con el sistema de transferencia rápido y de 1 a 20 horas con el sistema de transferencia en húmedo.

Otra variables a optimizar fueron las diluciones de los anticuerpos primarios (se ensayaron 1/500 y 1/1000 en PBS Tween con 1% BSA (p/v)) y el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario (de 1 hasta 4 horas).

Así, tras múltiples ensayos se decidió que el protocolo que aportaba los mejores resultados es el que aparece descrito en la **Tabla 3**.

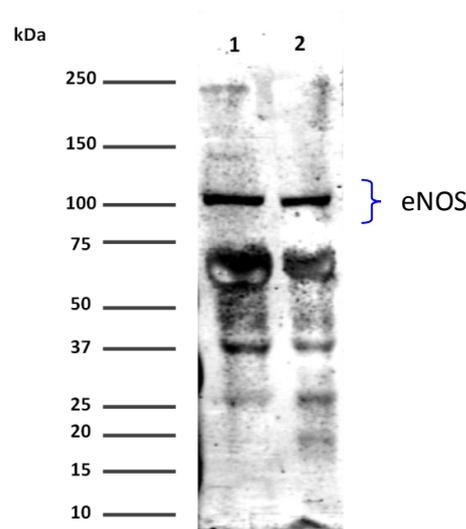
**Tabla 3.** Condiciones optimizadas del protocolo de Western Blot para la detección de las isoformas de la NOS.

Medio extracción de proteínas	<b>ESB</b>
% Acrilamida gel separador	<b>8%</b>
Volumen de células a cargar	<b><math>8 \times 10^9</math> - <math>1,6 \times 10^9</math></b>
Método transferencia de proteínas	<b>Mini Trans-Blot® Cell, 130V 20 horas</b>
Concentración Ac primarios	<b>1/500</b>
Tiempo de incubación con el Ac secundario	<b>4 horas</b>

#### 4.2.2. Identificación de las isoformas de la óxido nítrico sintasa mediante Western Blot

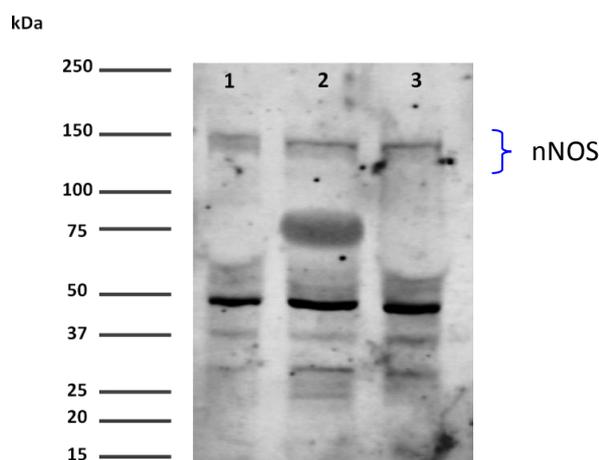
Aplicando el protocolo optimizado, se han podido identificar, por primera vez, las tres isoformas de la NOS en espermatozoides ovinos.

Como se puede apreciar en la **Figura 10**, perteneciente a una membrana representativa de varios análisis de western-blot, se ha logrado identificar la isoforma endotelial de la NOS (eNOS) en espermatozoide ovino como una banda intensa de aproximadamente 100 kDa. Sin embargo, de acuerdo a la ficha técnica del anticuerpo, el tamaño de esta isoforma en células humanas sería de 140 kDa. La diferencia de tamaño podría deberse a que se trata de proteínas de diferentes especie. Asimismo, aparecen varias bandas con un peso molecular inferior a 50 kDa, que podrían coincidir con posibles fragmentaciones de la isoforma.



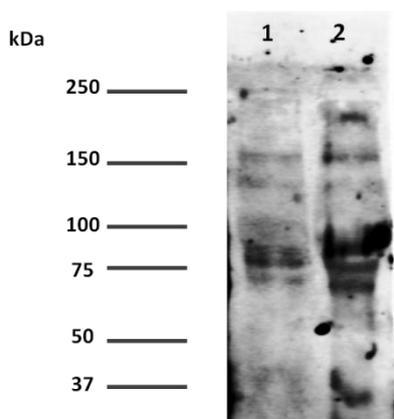
**Figura 10:** Imagen de Western-blot representativo de la identificación de la isoforma endotelial de NOS utilizando un anticuerpo anti-eNOS en proteínas de muestras de espermatozoides ovinos antes de la capacitación (*swim-up*, carril 1) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>) con alto cAMP (*cocktail*, carril 2).

La isoforma neuronal de NOS (nNOS) se ha podido identificar en espermatozoides ovinos como una banda de un peso molecular aproximado de 150 kDa en las tres muestras testadas: *swim up*, control y *cocktail* (**Figura 11**). La ficha técnica del anticuerpo indica que esta isoforma en tejido cerebral de ratón presenta un tamaño de 161 kDa. De nuevo, estas diferencias en peso molecular obedecerían al distinto origen de las isoformas y las distintas especies en que se ha estudiado. Por otro lado, además de la banda principal se observa una banda de un peso ligeramente inferior, y con menor intensidad, que podría deberse a la fragmentación de la isoforma, dadas las condiciones desnaturizantes de la técnica. Asimismo, cabría mencionar que este anticuerpo, tal y como informa la ficha técnica suministrada por la casa comercial, puede unirse de forma inespecífica a algunas proteínas que no son nNOS, dando lugar a la aparición de bandas de 50 y 25 kDa, aproximadamente, como es nuestro caso.



**Figura 11.** Imagen de Western-blot representativo de la identificación de la isoforma neuronal de la NOS, utilizando anticuerpo anti-nNOS en proteínas de muestras espermáticas ovinas antes de la capacitación (swim up, carril 1) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>) en medio TALP (control, carril 2), y con alto cAMP (cocktail, carril 3).

Finalmente, el western blot para la isoforma inducible de la NOS (iNOS), reveló varias bandas poco definidas y con un nivel de intensidad débil, con pesos moleculares que oscilan entre 75 y 170 kDa (**Figura 12**), lo que sugiere posibles fragmentaciones de la proteína. Basándonos en la ficha técnica del anticuerpo, en que se menciona que la isoforma iNOS presenta un tamaño de 131 kDa en macrófagos de ratón, la isoforma iNOS en espermatozoides ovinos podría corresponderse con alguna de las dos bandas próximas al marcador de 150 kDa. Sin embargo, la activación de la isoforma iNOS depende de ciertos estímulos, como la acción de los lipopolisacáridos (LPS) (Nathan and Xie, 1994), y por ello, es posible que la falta de una inducción concreta haya dificultado la identificación de la isoforma en estas células.



**Figura 12:** Imagen de Western-blot representativo de la identificación de la isoforma inducible de la NOS, utilizando un anticuerpo anti-iNOS en proteínas de muestras de espermatozoides ovinos antes de la capacitación (swim up, carril 1) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>) con alto cAMP (cocktail, carril 2).

Hasta el momento, únicamente aparecen tres estudios descritos en la literatura en los que se hayan identificado las isoformas de la NOS en espermatozoides mediante western-blot. Así, Revelli f y cols. detectaron la isoforma eNOS (145 kDa) en eyaculado humano (Revelli et al., 1999), Meiser y Schulz la nNOS (161 kDa) y eNOS (133 kDa) en toro (Meiser and Schulz, 2003), y Aquila y cols. las tres isoformas en cerdo, con pesos moleculares de 130 kDa para la iNOS, 135 kDa para la eNOS y 160 kDa para la nNOS (Aquila et al., 2011).

El protocolo de western-blot empleado en estos estudios es similar al utilizado en este trabajo, con la salvedad de los tampones empleados y la detección de las proteínas, que se realizó por quimioluminiscencia. Las isoformas identificadas en los estudios referidos presentan pesos moleculares que distan ligeramente de las isoformas aquí identificadas, y estas diferencias obedecerían al distinto origen de las isoformas.

#### **4.2.3. Optimización del protocolo de inmunofluorescencia indirecta para la identificación de las isoformas de la óxido nítrico sintasa**

Al igual que en el caso del western blot, la identificación de las isoformas de NOS mediante inmunofluorescencia indirecta también requirió de un proceso de optimización del protocolo.

En primer lugar, fue necesario partir de una concentración de células de  $8 \times 10^6$  cél/ml, pues con una concentración inferior, de  $4 \times 10^6$  cél/ml, los recuentos de los distintos inmunotipos no se podían realizar con precisión.

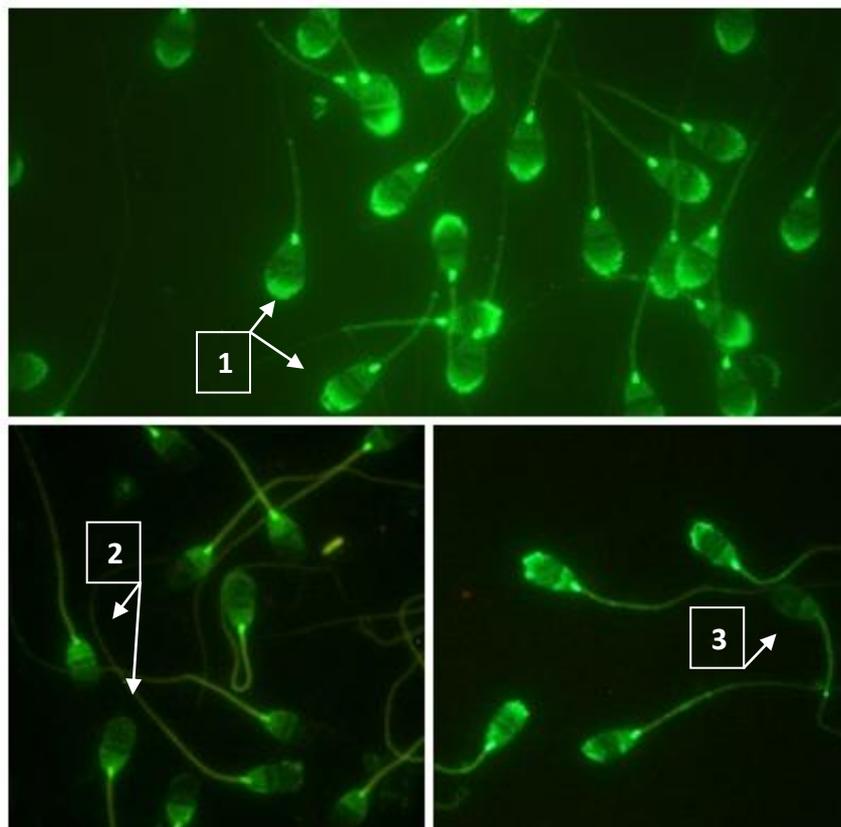
Además, se utilizó una concentración de formaldehído como fijador del 0,05% (v/v), ya que empleando la concentración del 3,7%, habitual en la mayor parte de los protocolos de IFI, las células mostraban unos niveles inferiores de fluorescencia.

Finalmente, se optó por emplear una dilución 1/25 de los anticuerpos primarios para las tres isoformas de la NOS, ya que esta concentración permitió la identificación de los distintos inmunotipos, mientras que diluciones inferiores, de 1/50 y 1/100 resultaron poco definidas y con un nivel de fluorescencia insuficiente.

#### **4.2.4. Identificación de las isoformas de la óxido nítrico sintasa por inmunofluorescencia indirecta**

El protocolo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) optimizado permitió no solo la identificación de cada una de las tres isoformas de la NOS en el espermatozoide ovino, sino que reveló la existencia de varios patrones de fluorescencia o inmunotipos en el espermatozoide para cada isoforma de NOS analizada y con variaciones dependiendo del tratamiento aplicado.

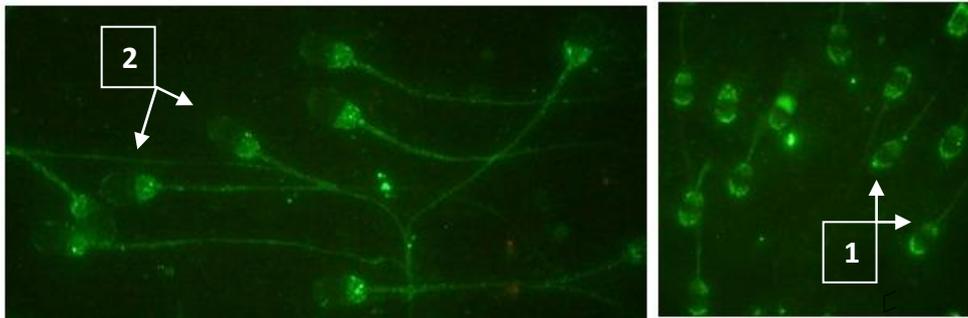
Con respecto a la isoforma endotelial de la NOS, los resultados permitieron identificar tres inmunotipos. Así, se distinguieron espermatozoides con fluorescencia en el cuello, post-acrosoma, borde apical y flagelo (**Figura 13, 1**), espermatozoides con marcaje en el cuello, postacrosoma y flagelo, pero no en el borde apical (**Figura 13, 2**); y espermatozoides toda la cabeza marcada con una menor intensidad que en los inmunotipos anteriores, lo que podría corresponderse con un marcaje inespecífico (**Figura 13, 3**).



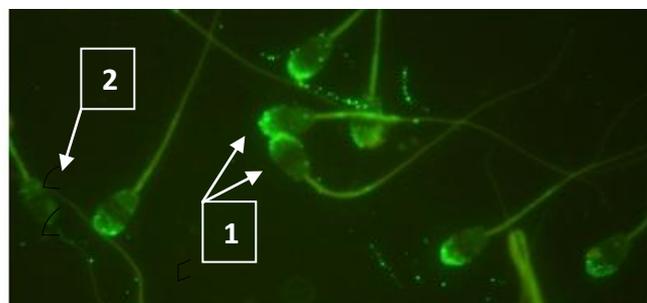
**Figura 13.** Imágenes representativas de la distribución de la isoforma eNOS en los espermatozoides ovinos, identificada mediante inmunofluorescencia indirecta y evaluada por microscopía de fluorescencia. Las imágenes mostradas pertenecen a muestras de swim-up.

En cuanto a la isoformas neuronal (**Figura 14**) e inducible (**Figura 15**) de la NOS, los resultados revelaron también tres inmunotipos de marcaje en cada una de ellas, muy similares a los de la eNOS pero sin presentar fluorescencia en el cuello del espermatozoide. Así, se identificaron espermatozoides con fluorescencia en el post-acrosoma, borde apical y flagelo (**Figura 14, 1 y 15, 1**), espermatozoides con marcaje únicamente en el post-acrosoma y flagelo (**Figura 14, 2 y 15, 2**), y un tercer tipo de marcaje inespecífico y minoritario, que como en la eNOS, se apreciaba en toda la cabeza del espermatozoide pero con una menor intensidad.

A pesar de que la iNOS y la nNOS presentaban el mismo patrón de marcaje, en esta última la intensidad de la fluorescencia era mucho más débil que en el caso de eNOS e iNOS.



**Figura 14.** Imágenes representativas de la distribución de la isoforma nNOS en los espermatozoides ovinos, identificada mediante inmunofluorescencia indirecta y evaluada por microscopía de fluorescencia. Las imágenes mostradas pertenecen a muestras de swim-up.



**Figura 15.** Imagen representativa de la distribución de la isoforma iNOS en los espermatozoides ovinos, identificada mediante inmunofluorescencia indirecta y evaluada por microscopía de fluorescencia. Las imágenes mostradas pertenecen a muestras de swim-up.

La identificación de las isoformas de la NOS en otras especies por IFI, concretamente en espermatozoide humano, ratón y toro, ha sido llevada a cabo por otros grupos de investigación. Así, los estudios realizados por O'Bryan y cols. identificaron únicamente la isoforma eNOS en espermatozoides humanos, asociando los patrones característicos de tinción con el estado morfológico del espermatozoide: la localización postacrosomal y ecuatorial de eNOS con espermatozoides con morfología normal, y los patrones de tinción aberrantes con espermatozoides morfológicamente anormales (O'Bryan et al., 1998). Los resultados obtenidos en el presente trabajo en la localización de la isoforma eNOS en espermatozoides ovinos difieren de los obtenidos en la especie humana, lo que podría indicar que la localización de esta isoforma podría variar en función de la especie.

Además, a diferencia de la especie humana, los espermatozoides ovinos apenas presentan alteraciones morfológicas, lo que explicaría la existencia de únicamente dos inmunotipos mayoritarios.

En espermatozoides de ratón, Herrero y cols. identificaron las isoformas de NOS en la cabeza y en el flagelo de los espermatozoides, distinguiendo tres patrones de tinción: fluorescencia intensa en el acrosoma, ausencia de fluorescencia en la cabeza, y fluorescencia tenue en el casquete acrosomal. Precisamente, este último inmunotipo recuerda al que hemos observado en espermatozoides ovinos, si asemejamos el casquete acrosomal del espermatozoide murino con un borde apical ancho en espermatozoide ovino. Además, este grupo describió que conforme transcurría el proceso de capacitación, el porcentaje de espermatozoides sin fluorescencia se incrementaba, mientras que disminuía el de espermatozoides con fluorescencia en el acrosoma (Herrero et al., 2003). Esta observación sugiere que la capacitación espermática podría estar relacionada con la distribución de las NOS en la cabeza del espermatozoide, y que el NO podría estar involucrado en este proceso.

Por su parte, Meiser y Schulz localizaron mediante microscopía laser confocal las isoformas eNOS y nNOS en espermatozoide de toro. Concretamente, se detectó fluorescencia relativa a la isoforma neuronal en el acrosoma y en el flagelo, mientras que la isoforma epitelial se localizó únicamente en el acrosoma (Meiser and Schulz, 2003).

Teniendo en cuenta los estudios referidos, cabría esperar que la localización de las isoformas de la NOS en espermatozoides sea dependiente de la especie analizada, y del estado fisiológico de los espermatozoides.

#### **4.3. Cambios en la distribución de las isoformas de la óxido nítrico sintasa en muestras espermáticas capacitadas en presencia de melatonina**

Con el objetivo de determinar si la incubación con melatonina en condiciones capacitantes afecta a la distribución de los distintos inmunotipos para las tres isoformas de NOS en espermatozoide ovino, se analizaron por inmunofluorescencia indirecta muestras espermáticas *swim-up*, control, *cocktail*, Mel. 1  $\mu$ M y Mel. 100 pM.

Conjuntamente, se evaluaron cambios en la motilidad (total y progresiva), y el estado de capacitación por tinción con CTC para comprobar que la capacitación se estaba produciendo de forma adecuada, y estudiar posibles correlaciones con los distintos inmunotipos.

Al igual que en los experimentos anteriores, se observó un descenso de la motilidad total y progresiva ( $p < 0.05$ ) en todas las muestras tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (**Tabla 4**).

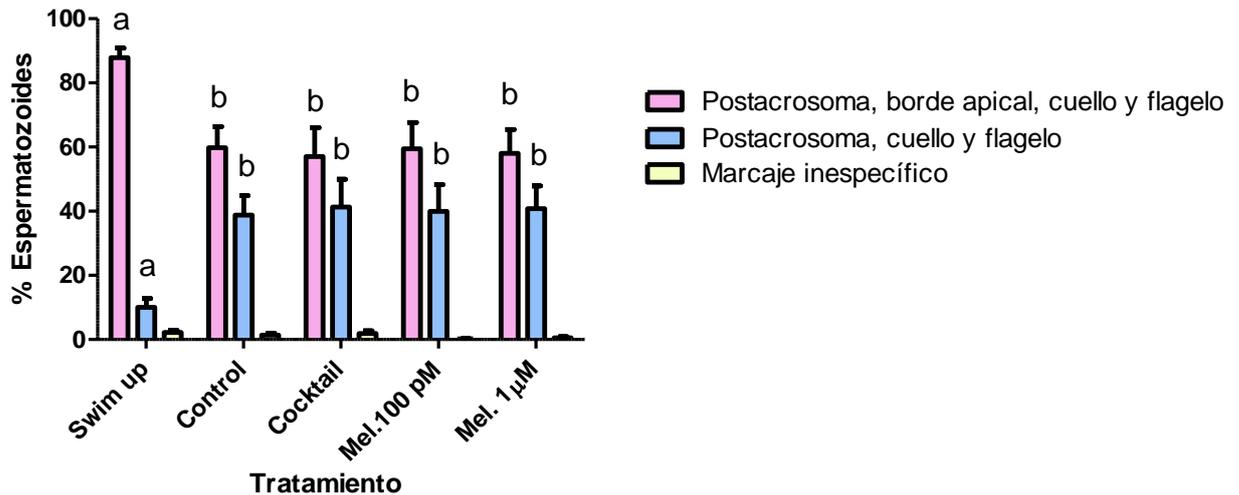
**Tabla 4.** Porcentaje de espermatozoides móviles totales (MT) y móviles progresivos (MP) antes de la capacitación (*swim-up*) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>) en medio TALP (control), con alto CAMP (*cocktail*) y con diferentes concentraciones de melatonina añadidas al medio *cocktail*. Los resultados se muestran como media  $\pm$  EEM de 4 experimentos. Se muestran solo las diferencias significativas con respecto al *swim-up*: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

	Motilidad				
	<i>Swim up</i>	Control	<i>Cocktail</i>	Mel.100 pM	Mel. 1 $\mu$ M
Móviles totales (%)	86,50 $\pm$ 2,39	76,50 $\pm$ 5,31***	82,00 $\pm$ 3,48	83,75 $\pm$ 2,17	78,00 $\pm$ 9,35**
Motilidad progresiva (%)	32,50 $\pm$ 5,57	25,00 $\pm$ 3,89*	12,25 $\pm$ 2,50***	18,25 $\pm$ 3,49***	16,25 $\pm$ 3,73***

Así mismo, el análisis de las muestras tras tinción con CTC reveló un esperado incremento de espermatozoides capacitados en las muestras incubadas con agentes elevadores del cAMP muy significativo (datos no mostrados).

#### 4.3.1. Efecto de la melatonina sobre la distribución de la eNOS en espermatozoides ovinos capacitados

Como se aprecia en la **Figura 17**, tras tres horas de incubación en condiciones capacitantes, el porcentaje de espermatozoides que presentaban fluorescencia en el postacrosoma, borde apical, cuello y flagelo, disminuyó significativamente ( $P < 0,05$ ) en las muestra control (59,8  $\pm$  6,5 %), *cocktail* (57,0  $\pm$  9,0 %), Mel. 100 pM (59,4  $\pm$  8,2 %) y Mel. 1  $\mu$ M (58,1  $\pm$  7,4 %), con respecto a la muestra *swim-up* (87,9  $\pm$  2,9 %), a la vez que aumentó significativamente ( $P < 0,05$ ) el porcentaje de espermatozoides que presentaban fluorescencia en el postacrosoma, cuello y flagelo. Sin embargo, el tratamiento con melatonina durante la capacitación no afectó a la distribución de la eNOS, y no se apreciaron diferencias significativas en comparación con los grupos control o *cocktail*.



**Figura 17:** Porcentaje de distintos inmunotipos para la isoforma endotelial de la NOS en espermatozoide ovino, evaluados mediante inmunofluorescencia indirecta, 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 CAMP (cocktail) y con diferentes concentraciones de melatonina añadidas al medio cocktail. Los resultados se muestran como media ± EEM de 6 experimentos.

Para corroborar estos resultados que apuntan a una variación en la distribución de la eNOS durante la capacitación espermática, se llevó a cabo el test de correlación de Spearman entre los datos del estado de capacitación analizados por CTC y los de los inmunotipos para esta isoforma. Los resultados del test revelaron que el porcentaje de espermatozoides capacitados correlaciona positivamente ( $P < 0,05$ ,  $r = 0,55$ ) con aquellos en que se localiza únicamente en postacrosoma, cuello y flagelo, y, por tanto, negativamente con aquellos espermatozoides en los que la eNOS se localiza en postacrosoma, borde apical, cuello y flagelo ( $P < 0,05$ ,  $r = -0,55$ ).

Por tanto, estos resultados sugieren que la localización de la isoforma endotelial de la NOS en el borde apical de la cabeza del espermatozoide desaparece durante la capacitación. Durante este proceso complejo y secuencial tienen lugar una serie de profundas alteraciones bioquímicas y biofísicas en el espermatozoide que podrían explicar estos cambios en la distribución de la eNOS. Así, durante la capacitación, la salida del colesterol de la membrana plasmática conduce a un aumento en su fluidez y a una mayor permeabilidad de la misma (Flesch et al., 2001), que podrían motivar la pérdida de la eNOS en el borde apical del acrosoma.

Cabe añadir que en la capacitación, la asimetría transversal de la membrana plasmática del espermatozoide puede alterarse 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 (Harrison et al., 1996). Este proceso también podría contribuir a la pérdida de la eNOS en el borde apical del acrosoma.

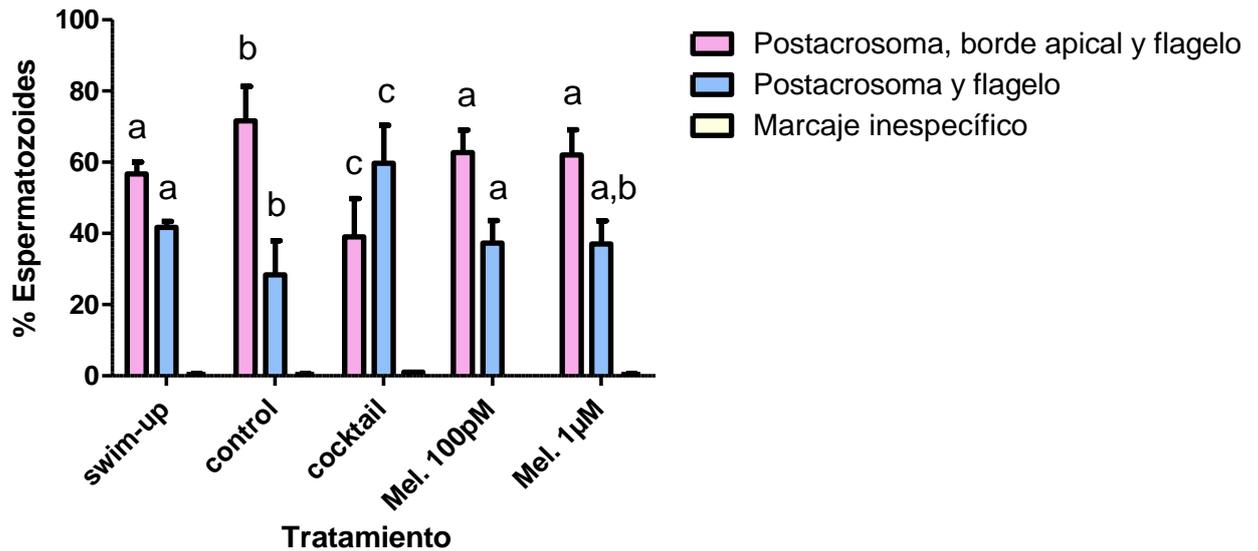
Además, el análisis de correlación también reveló que muestras con una mayor motilidad progresiva se correlacionan positivamente con aquellas en las que la eNOS se localiza principalmente en postacrosoma, borde apical, cuello y flagelo ( $P < 0,05$ ,  $r = 0,40$ ), y negativamente con las que eNOS no está presente en el borde apical ( $P < 0,05$ ,  $r = -0,40$ ). Así, la localización de la isoforma endotelial de la NOS en el borde apical de la cabeza del espermatozoide se ve reducida en muestras con menor motilidad progresiva. Esta afirmación es compatible con lo observado para la capacitación espermática, pues la pérdida de motilidad progresiva en muestras espermáticas se ha visto asociada con la capacitación de las mismas (Yanagimachi, 1994; Ho and Suarez, 2001).

#### 4.3.2. Efecto de la melatonina sobre la distribución de la nNOS en espermatozoides ovinos capacitados

Tal y como se observa en la **Figura 18**, el inmunotipo caracterizado por la presencia de fluorescencia en el borde apical (espermatozoides con fluorescencia en el postacrosoma, borde apical y flagelo) es el predominante en todas las muestras excepto en la muestra *cocktail*, donde es más frecuente el inmunotipo caracterizado por la ausencia de fluorescencia en el borde apical. Estos resultados apuntan a que, el proceso de incubación en condiciones capacitantes incrementa significativamente el porcentaje de espermatozoides con fluorescencia en el borde apical en la muestra control ( $71,7 \pm 9,6$  %) con respecto al *swim-up* ( $56,7 \pm 3,4$  %), y que la adición de agentes elevadores del cAMP (*cocktail*) provoca la pérdida de señal en ese borde apical, probablemente porque dispara la capacitación de forma más intensa ( $39,0 \pm 10,8$  %).

Sin embargo, la presencia de melatonina en esas muestras, es capaz de restaurar la inversión del porcentaje de inmunotipos observado en las muestras incubadas sólo con *cocktail*, de forma que el porcentaje de los inmunotipos de las muestras Mel. 100pM ( $62,7 \pm 6,3$  %) y Mel. 1 $\mu$ M ( $62,0 \pm 7,1$  %) es similar al que presenta la muestra *swim-up*, es decir, antes del proceso de capacitación.

El test de correlación de Spearman no mostró correlaciones significativas entre el porcentaje de cada uno de los inmunotipos y los porcentajes de capacitación evidenciados por CTC ni con la motilidad total o progresiva.



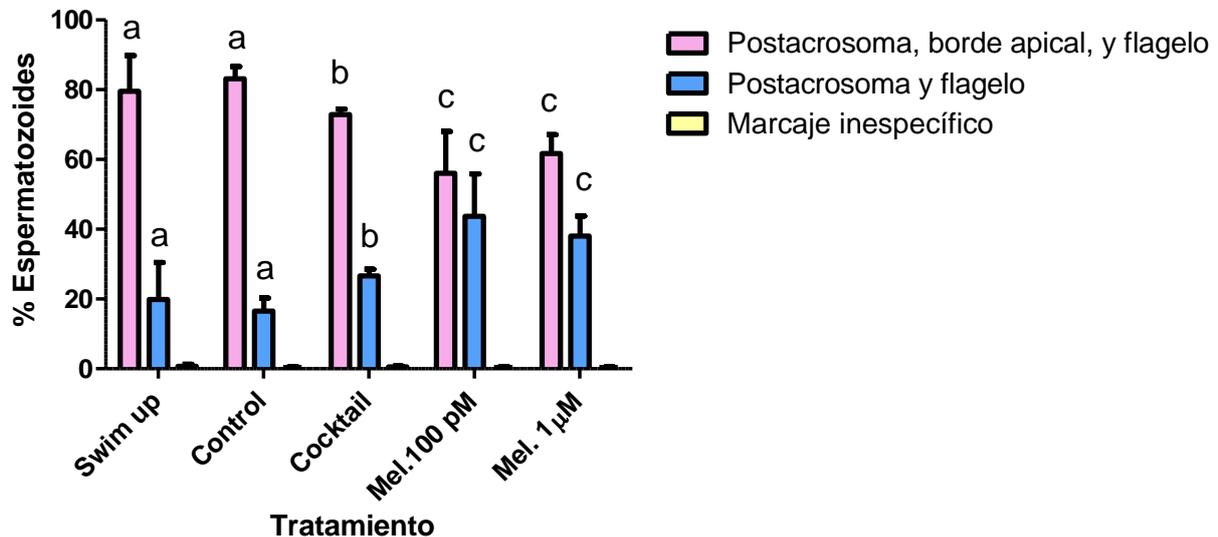
**Figura 18.** Porcentaje de distintos patrones de distribución de la isoforma neuronal de la NOS en espermatozoide ovino, evaluados mediante inmunofluorescencia indirecta, antes de la capacitación (*swim-up*) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>) en medio TALP (*control*), con alto cAMP (*cocktail*) y con diferentes concentraciones de melatonina añadidas al medio *cocktail*. Los resultados se muestran como media ± EEM de 3 experimentos.

#### 4.3.3. Efecto de la melatonina sobre la distribución de la iNOS en espermatozoides ovinos capacitados

En este caso, la incubación de las muestras en condiciones capacitantes en medio TALP (*control*), no provocó cambios en la distribución de esta isoforma en comparación con la muestra sin capacitar (*swim-up*). Sin embargo, la presencia de agentes elevadores del cAMP (*cocktail*) disminuyó significativamente ( $P < 0,05$ ) el porcentaje de espermatozoides en los que la iNOS se localizó en postacrosoma, borde apical y flagelo en comparación con el *control*, a la vez que aumentaron aquellos en los que la iNOS sólo se localizaba en postacrosoma y flagelo (**Figura 19**).

Además, la presencia de melatonina, a ambas concentraciones evaluadas, incrementa todavía más esa tendencia, de forma que el porcentaje de espermatozoides con fluorescencia en el postacrosoma, borde apical y flagelo se reduce también significativamente ( $P < 0,05$ ) en comparación con la muestra *cocktail*, a la vez que aumenta el porcentaje de espermatozoides con fluorescencia en el postacrosoma y flagelo.

Blanco y cols. demostraron que el tratamiento con melatonina es capaz de reducir la expresión de la isoforma iNOS, en un modelo de rata con daño cerebral (Blanco et al., 2017). Nuestros resultados apuntan en esa dirección, indicando que la melatonina influye sobre el patrón de expresión de la iNOS, concretamente sobre su localización en la cabeza del espermatozoide. El efecto antioxidante de la melatonina podría ser responsable de esos cambios en la distribución diferencial de la isoforma iNOS.



**Figura 19.** Porcentaje de distintos patrones de distribución de la isoforma inducible de la NOS en espermatozoide ovino, evaluados mediante inmunofluorescencia indirecta, 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 CAMP (cocktail) y con diferentes concentraciones de melatonina añadidas al medio cocktail. Los resultados se muestran como media ± EEM de 3 experimentos.

El test de correlación de Spearman reveló una tendencia a la significación positiva ( $P < 0,1$ ,  $r = 0,44$ ) entre el inmunotipo caracterizado por la presencia de fluorescencia en el borde apical y los espermatozoides no capacitados, y una correlación negativa ( $P < 0,05$ ,  $r = -0,71$ ) con los espermatozoides reaccionados.

A su vez, la presencia de iNOS solo en postacrosoma y flagelo muestra una tendencia a la significación negativa ( $P < 0,1$ ,  $r = -0,44$ ) con los espermatozoides no capacitados, y correlaciona positivamente ( $P < 0,05$ ,  $r = 0,73$ ) con los espermatozoides reaccionados. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la localización de la isoforma iNOS en el borde apical se pierde con la capacitación, del mismo modo que disminuía la localización de la isoforma eNOS, y también durante la reacción acrosómica.

Como se ha comentado previamente, la reacción acrosómica es un proceso de exocitosis que permite a los espermatozoides ya capacitados penetrar en la zona pelúcida del ovocito y llevar a cabo la fecundación (Yanagimachi, 1994). Durante este proceso, se produce la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa y la liberación del contenido del acrosoma. Por tanto, una posible explicación acerca de la pérdida de la localización de la isoforma iNOS en el borde apical de la cabeza del espermatozoide podría estar relacionados con el aumento de fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática por la salida del colesterol durante la capacitación, como se ha hipotetizado en el caso de la eNOS, pero también a la rotura de la membrana acrosomal durante la reacción acrosómica.

Finalmente, no se encontraron correlaciones significativas entre el porcentaje de cada inmunotipo y los valores de motilidad total ni progresiva.

## **5. DISCUSIÓN GENERAL**

En el presente Trabajo de Fin de Master se ha estudiado la acción de la melatonina sobre el metabolismo del NO y la funcionalidad espermática ovina. Así, se han evaluado los cambios en los niveles de NO tras el tratamiento con distintas concentraciones de melatonina en condiciones capacitantes. También se han identificado y localizado, por primera vez en espermatozoide ovino, las tres isoformas de la NOS, enzima responsable de la producción del NO: eNOS, nNOS e iNOS. Los resultados revelan que la melatonina actúa modificando los niveles de NO durante la capacitación, así como la distribución de nNOS y la iNOS.

El papel del NO sobre la funcionalidad espermática ha sido estudiado previamente en espermatozoides humanos. En relación con la motilidad y la viabilidad, se ha demostrado que bajas concentraciones de NO incrementarían estos parámetros, mientras que cantidades elevadas los reducirían (Hellstrom et al., 1994; Donnelly et al., 1997; Miraglia et al., 2011; Agarwal et al., 2003). En el caso del espermatozoide ovino, los resultados de este TFM revelaron que altos niveles de NO se correlacionan positivamente con la motilidad espermática total, y negativamente con la motilidad progresiva. Además, los altos niveles de NO no afectaron a la integridad de la membrana plasmática, y por tanto el NO producido de forma fisiológica en espermatozoides ovinos durante la incubación en condiciones capacitantes no presenta propiedades citotóxicas.

Tal y como se ha comentado previamente, el NO es fundamental para que se produzca la capacitación espermática. Al igual que se ha descrito en otras especies (Herrero et al., 1999; Belén-Herrero et al., 2000), nuestros resultados revelaron que los niveles de NO se incrementan significativamente durante el proceso de capacitación espermática, lo que sugiere que el óxido nítrico participa en las rutas bioquímicas que controlan la capacitación en la especie ovina (Colas et al., 2008).

En relación con el efecto de la melatonina sobre la capacitación espermática, nuestro grupo de investigación determinó que esta hormona ejerce un papel bimodal sobre la misma, de forma que concentraciones de 100 pM ejercen un efecto capacitante, mientras que una concentración de 1  $\mu$ M inhibía la capacitación espermática (Casao et al., 2010). Los resultados del presente TFM corroboran que la melatonina a concentración 1  $\mu$ M reduce el porcentaje de espermatozoides capacitados, y que, además es capaz de prevenir el aumento en los niveles de NO durante este proceso. Por tanto, es posible que la reducción en los niveles de NO ejercida por la melatonina 1  $\mu$ M pueda explicar en parte el efecto descapitante que presenta esta hormona a esta concentración. Este efecto sobre los niveles de NO podría ser debido a su acción antioxidante directa o bien, a una acción sobre las enzimas del metabolismo del óxido nítrico.

El NO se genera vía oxidación de L-arginina por la actividad de las distintas isoformas de la NOS (endotelial, neuronal e inducible). Hasta la fecha, se han logrado identificar dichas isoformas en espermatozoides humanos (Revelli et al., 1999) (O'Bryan et al., 1998), de toro (Meiser and Schulz, 2003), porcino (Aquila et al., 2011) y de ratón (Herrero et al., 2003). En este TFM se han puesto a punto los protocolos de western blot y de inmunofluorescencia indirecta, que han permitido la identificación, por vez primera en la especie ovina, de las tres isoformas de la óxido nítrico sintasa, nNOS, eNOS e iNOS, identificando varios inmunotipos de cada una de ellas.

Por tanto, la acción de la melatonina sobre los niveles del NO durante la capacitación espermática, podría estar mediada por un efecto sobre las NOS. Como una primera aproximación para comprobarlo, en el presente TFM analizamos los cambios en la distribución de estas isoformas de la NOS en el espermatozoide ovino, durante la capacitación espermática en presencia de diversas concentraciones de melatonina. Además, se estudiaron las posibles correlaciones entre los distintos inmunotipos de las isoformas de la NOS y el estado de capacitación espermática.

Los resultados revelaron que la localización en el borde apical de las isoformas eNOS e iNOS disminuye con la capacitación, probablemente debido a los eventos bioquímicos que suceden durante este proceso. Herrero y cols. ya habían relacionado previamente el estado de capacitación con los inmunitipos de las isoformas de la NOS en espermatozoides de ratón, de forma que la localización de las isoformas de las NOS en el casquete acrosomal se reduce con la capacitación. Así, teniendo en cuenta las diferencias en la morfología espermática de ambas especies, nuestros datos corroboran esos resultados, y que la distribución de las isoformas de la NOS varía según el estado de capacitación del espermatozoide.

Podríamos hipotetizar que la redistribución de las isoformas de la NOS se relaciona con un aumento en la actividad enzimática de las mismas, aumentando en consecuencia los niveles de NO durante la capacitación.

En este TFM se demuestra que la presencia de melatonina durante la incubación en condiciones capacitantes, afecta a la distribución de las isoformas nNOS e iNOS, pues es capaz de revertir los cambios observados tras la adición de agentes elevadores del cAMP (estimuladores de la capacitación en el espermatozoide ovino).

Así, podríamos especular que la melatonina a concentración 1  $\mu$ M sería capaz de reducir la producción de NO durante la capacitación espermática ovina, por medio de su acción sobre las isoformas neuronal e inducible de la NOS. Evidentemente se hace necesaria la realización de otros experimentos para demostrar esta hipótesis, entre ellos la determinación semi-cuantitativa por western-blot de las isoformas de la NOS y el estudio de la actividad enzimática de las mismas, en presencia o no de melatonina.

El presente trabajo asentaría las bases para la realización de futuros estudios, enfocados a la acción de la melatonina sobre el metabolismo del NO, lo que permitiría mejorar la eficiencia reproductiva en ovinos, pero también trasladar los resultados a otras especies de mamíferos, incluida la especie humana.

## 6. CONCLUSIONES

1. El proceso de capacitación espermática provoca un aumento en los niveles de óxido nítrico (NO) en espermatozoides ovinos.
2. La melatonina a concentración 1  $\mu$ M es capaz de evitar este aumento en los niveles de óxido nítrico.
3. El espermatozoide ovino presenta las tres isoformas de la óxido nítrico sintasa descritas para otras especies: epitelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS), con distintos inmunotipos para cada una de las tres isoformas
4. La localización en el borde apical de las isoformas eNOS e iNOS disminuye con la capacitación.
5. La melatonina, a concentración 1  $\mu$ M y 100 pM, modifica el efecto producido por los agentes capacitantes sobre el porcentaje de los inmunotipos de la nNOS e iNOS en el espermatozoide ovino.

## CONCLUSIONS

1. The process of sperm capacitation causes an increase of NO levels in ram spermatozoa.
2. Melatonin at a concentration of 1  $\mu\text{M}$  is able to prevent this increase of NO.
3. Ram spermatozoa presents the three isoforms of nitric oxide synthase described for other species: epithelial (eNOS), neuronal (nNOS) and inducible (iNOS), with different immunotypes for each of the three isoforms.
4. The location at the apical edge of the eNOS and iNOS isoforms decreases with capacitation.
5. Melatonin, at 1  $\mu\text{M}$  and 100 pM, modifies the effect produced by the capacitating agents on the percentage of nNOS and iNOS immunotypes in ram sperm.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, A., Saleh, R.A., and Bedaiwy, M.A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 79, 829–843.
- Alvarez, J.G., Lasso, J.L., Blasco, L., Nuñez, R.C., Heyner, S., Caballero, P.P., and Storey, B.T. (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. Oxf. Engl.* 8, 1087–1092.
- Aquila, S., Giordano, F., Guido, C., Rago, V., and Carpino, A. (2011). Nitric oxide involvement in the acrosome reaction triggered by leptin in pig sperm. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9, 133.
- Bejarano, I., Monllor, F., Marchena, A.M., Ortiz, A., Lozano, G., Jiménez, M.I., Gaspar, P., García, J.F., Pariente, J.A., Rodríguez, A.B., et al. (2014). Exogenous melatonin supplementation prevents oxidative stress-evoked DNA damage in human spermatozoa. *J. Pineal Res.* 57, 333–339.
- Belén-Herrero, M., Chatterjee, S., Lefièvre, L., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (2000). Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 522–536.
- Blanco, S., Hernández, R., Franchelli, G., Ramos-Álvarez, M.M., and Peinado, M.Á. (2017). Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 62, 32–43.
- Boutin, J.A., Audinot, V., Ferry, G., and Delagrangé, P. (2005). Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 412–419.
- Buzadzic, B., Vucetic, M., Jankovic, A., Stancic, A., Korac, A., Korac, B., and Otasevic, V. (2015a). New insights into male (in)fertility: the importance of NO. *Br. J. Pharmacol.* 172, 1455–1467.
- Buzadzic, B., Vucetic, M., Jankovic, A., Stancic, A., Korac, A., Korac, B., and Otasevic, V. (2015b). New insights into male (in)fertility: the importance of NO: NO and male (in)fertility. *Br. J. Pharmacol.* 172, 1455–1467.
- Carpentieri, A., Díaz de Barboza, G., Areco, V., Peralta López, M., and Tolosa de Talamoni, N. (2012). New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol. Res.* 65, 437–444.
- Casao, A., Cebrián, I., Asumpção, M., Pérez-Pé, R., Abecia, J.A., Forcada, F., Cebrián-Pérez, J.A., and Muiño-Blanco, T. (2010a). Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8, 59.
- Casao, A., Mendoza, N., Pérez-Pé, R., Grasa, P., Abecia, J.-A., Forcada, F., Cebrián-Pérez, J.A., and Muino-Blanco, T. (2010b). Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *J. Pineal Res.* 48, 39–46.
- Casao, A., Gallego, M., Abecia, J.A., Forcada, F., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., and Cebrián-Pérez, J.Á. (2012). Identification and immunolocalisation of melatonin MT1 and MT2 receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 953.

- Casao, A., Pérez-Pé, R., Abecia, J.A., Forcada, F., Muiño-Blanco, T., and Cebrián-Pérez, J.Á. (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*, 168–174.
- Centelles, J., Esteban, C., Imperial, S. (2004). Óxido nítrico. Un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea. *Ámbito farmacéutico. Bioquímica.*
- Chemineau, P., Guillaume, D., Migaud, M., Thiry, J., Pellicer-Rubio, M., and Malpoux, B. (2008). Seasonality of Reproduction in Mammals: Intimate Regulatory Mechanisms and Practical Implications. *Reprod. Domest. Anim.* *43*, 40–47.
- Colas, C., James, P., Howes, L., Jones, R., Cebrian-Perez, J.A., and Muiño-Blanco, T. (2008). Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation. *Reprod. Fertil. Dev.* *20*, 649–658.
- Djordjevic, B., Cvetkovic, T., Stoimenov, T.J., Despotovic, M., Zivanovic, S., Basic, J., Veljkovic, A., Velickov, A., Kocic, G., Pavlovic, D., et al. (2018). Oral supplementation with melatonin reduces oxidative damage and concentrations of inducible nitric oxide synthase, VEGF and matrix metalloproteinase 9 in the retina of rats with streptozotocin/nicotinamide induced pre-diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* *833*, 290–297.
- Donnelly, E.T., Lewis, S.E., Thompson, W., and Chakravarthy, U. (1997). Sperm nitric oxide and motility: the effects of nitric oxide synthase stimulation and inhibition. *Mol. Hum. Reprod.* *3*, 755–762.
- Flesch, F.M., Brouwers, J.F., Nievelstein, P.F., Verkleij, A.J., van Golde, L.M., Colenbrander, B., and Gadella, B.M. (2001). Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J. Cell Sci.* *114*, 3543–3555.
- Francavilla, F., Santucci, R., Macerola, B., Ruvolo, G., and Romano, R. (2000). Nitric oxide synthase inhibition in human sperm affects sperm-oocyte fusion but not zona pellucida binding. *Biol. Reprod.* *63*, 425–429.
- Gadella, B.M., Tsai, P.-S., Boerke, A., and Brewis, I.A. (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int. J. Dev. Biol.* *52*, 473–480.
- García-López, N., Ollero, M., Cebrián-Pérez, J.A., and Muiño-Blanco, T. (1996a). 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*, 137–143.
- García-López, N., Ollero, M., Muiño-Blanco, T., and Cebrián-Pérez, J.A. (1996b). A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma. *Theriogenology* *46*, 141–151.
- González-Arto, M., Vicente-Carrillo, A., Martínez-Pastor, F., Fernández-Alegre, E., Roca, J., Miró, J., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., et al. (2016). Melatonin receptors MT1 and MT2 are expressed in spermatozoa from several seasonal and nonseasonal breeder species. *Theriogenology* *86*, 1958–1968.

- Gonzalez-Arto, M., Luna, C., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., and Casao, A. (2016). New evidence of melatonin receptor contribution to ram sperm functionality. *Reprod. Fertil. Dev.* *28*, 924.
- Grasa, P., Cebrian-Perez, J.A., and Muino-Blanco, T. (2006). Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reproduction* *132*, 721–732.
- Haresign, W., Peters, A.R., and Staples, L.D. (1990). The effect of melatonin implants on breeding activity and litter size in commercial sheep flocks in the UK. *Anim. Prod.* *50*, 111–121.
- Harrison, R.A., and Vickers, S.E. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* *88*, 343–352.
- Harrison, R.A., Ashworth, P.J., and Miller, N.G. (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*, 378–391.
- Hellstrom, W.J., Bell, M., Wang, R., and Sikka, S.C. (1994). Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability, and lipid peroxidation. *Fertil. Steril.* *61*, 1117–1122.
- Herrero, M.B., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (1999). Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro. *Biol. Reprod.* *61*, 575–581.
- Herrero, M.B., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (2003). Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. *Curr. Pharm. Des.* *9*, 419–425.
- Ho, H.C., and Suarez, S.S. (2001). Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reprod. Camb. Engl.* *122*, 519–526.
- Hung, M.-W., Kravtsov, G.M., Lau, C.-F., Poon, A.M.-S., Tipoe, G.L., and Fung, M.-L. (2013). Melatonin ameliorates endothelial dysfunction, vascular inflammation, and systemic hypertension in rats with chronic intermittent hypoxia. *J. Pineal Res.* *55*, 247–256.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
- de Lamirande, E., Lamothe, G., and Villemure, M. (2009). Control of superoxide and nitric oxide formation during human sperm capacitation. *Free Radic. Biol. Med.* *46*, 1420–1427.
- Langford, G.A., Ainsworth, L., Marcus, G.J., and Shrestha, J.N. (1987). Photoperiod entrainment of testosterone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and prolactin cycles in rams in relation to testis size and semen quality. *Biol. Reprod.* *37*, 489–499.
- Leal, A.C.M.S., Caldas-Bussiere, M.C., Carvalho, C.S.P. de, Viana, K.S., and Quirino, C.R. (2009). Role of nitric oxide on quality of freshly ejaculated bull spermatozoa during heparin-induced in vitro capacitation. *Anim. Reprod. Sci.* *116*, 38–49.
- Lefièvre, L., De Lamirande, E., and Gagnon, C. (2000). The cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor, sildenafil, stimulates human sperm motility and capacitation but not acrosome reaction. *J. Androl.* *21*, 929–937.

- Lincoln, G.A., and Clarke, I.J. (1997). Refractoriness to a static melatonin signal develops in the pituitary gland for the control of prolactin secretion in the ram. *Biol. Reprod.* *57*, 460–467.
- Luboshitzky, R., Shen-Orr, Z., and Herer, P. (2002). SEMINAL PLASMA MELATONIN AND GONADAL STEROIDS CONCENTRATIONS IN NORMAL MEN. *Arch. Androl.* *48*, 225–232.
- Macías, M., Escames, G., Leon, J., Coto, A., Sbihi, Y., Osuna, A., and Acuña-Castroviejo, D. (2003). Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur. J. Biochem.* *270*, 832–840.
- Marczynski, T.J., Yamaguchi, N., Ling, G.M., and Grodzinska, L. (1964). Sleep induced by the administration of melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine) to the hypothalamus in unrestrained cats. *Experientia* *20*, 435–437.
- Meiser, H., and Schulz, R. (2003). Detection and Localization of Two Constitutive NOS Isoforms in Bull Spermatozoa. *Anat. Histol. Embryol. J. Vet. Med. Ser. C* *32*, 321–325.
- Miraglia, E., De Angelis, F., Gazzano, E., Hassanpour, H., Bertagna, A., Aldieri, E., Revelli, A., and Ghigo, D. (2011). Nitric oxide stimulates human sperm motility via activation of the cyclic GMP/protein kinase G signaling pathway. *Reproduction* *141*, 47–54.
- Mortimer, S.T., and Maxwell, W.M.C. (2004). Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Camb. Engl.* *127*, 285–291.
- Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *6*, 3051–3064.
- Nathan, C., and Xie, Q.W. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* *78*, 915–918.
- O'Bryan, M.K., Zini, A., Cheng, C.Y., and Schlegel, P.N. (1998). Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: correlation with sperm motility. *Fertil. Steril.* *70*, 1143–1147.
- Ollero, M., Muiño-Blanco, T., López-Pérez, M.J., and Cebrián-Pérez, J.A. (1996). Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *Int. J. Androl.* *19*, 287–292.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Winer, M.A., and First, N.L. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* *38*, 1171–1180.
- du Plessis, S.S., Hagenaar, K., and Lampiao, F. (2010a). The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. *Andrologia* *42*, 112–116.
- Pozo, D., Reiter, R.J., Calvo, J.R., and Guerrero, J.M. (1997). Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J. Cell. Biochem.* *65*, 430–442.
- Reiter, R.J. (1991). Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions\*. *Endocr. Rev.* *12*, 151–180.

- Reiter, R.J., Tan, D.-X., Manchester, L.C., Paredes, S.D., Mayo, J.C., and Sainz, R.M. (2009). Melatonin and Reproduction Revisited. *Biol. Reprod.* *81*, 445–456.
- Revelli, A., Soldati, G., Costamagna, C., Pellerrey, O., Aldieri, E., Massobrio, M., Bosia, A., and Ghigo, D. (1999). Follicular fluid proteins stimulate nitric oxide (NO) synthesis in human sperm: a possible role for NO in acrosomal reaction. *J. Cell. Physiol.* *178*, 85–92.
- Revelli, A., Costamagna, C., Moffa, F., Aldieri, E., Ochetti, S., Bosia, A., Massobrio, M., Lindblom, B., and Ghigo, D. (2001). Signaling pathway of nitric oxide-induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol. Reprod.* *64*, 1708–1712.
- Rocco, M., Betarelli, R., Placci, A., Fernández-Novell, J.M., Spinaci, M., Casao, A., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., Peña, A., Rigau, T., et al. (2018). Melatonin affects the motility and adhesiveness of in vitro capacitated boar spermatozoa via a mechanism that does not depend on intracellular ROS levels. *Andrology*.
- Sarti, P., Magnifico, M., Altieri, F., Mastronicola, D., and Arese, M. (2013). New Evidence for Cross Talk between Melatonin and Mitochondria Mediated by a Circadian-Compatible Interaction with Nitric Oxide. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 11259–11276.
- Scibona, M., Meschini, P., Capparelli, S., Pecori, C., Rossi, P., and Menchini Fabris, G.F. (1994). [L-arginine and male infertility]. *Minerva Urol. E Nefrol. Ital. J. Urol. Nephrol.* *46*, 251–253.
- Sönmez, M.F., Narin, F., Akkuş, D., and Türkmen, A.B. (2012). Melatonin and vitamin C ameliorate alcohol-induced oxidative stress and eNOS expression in rat kidney. *Ren. Fail.* *34*, 480–486.
- Stanislavov, R., Nikolova, V., and Rohdewald, P. (2009). Improvement of seminal parameters with Prelox: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Phytother. Res. PTR* *23*, 297–302.
- Tamura, H., Takayama, H., Nakamura, Y., Reiter, R.J., and Sugino, N. (2008). Fetal/placental regulation of maternal melatonin in rats. *J. Pineal Res.* *44*, 335–340.
- Tan, D.-X., Manchester, L.C., Terron, M.P., Flores, L.J., and Reiter, R.J. (2007). One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res.* *42*, 28–42.
- Tan, D.-X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Paredes, S.D., Korkmaz, A., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Fuentes-Broto, L., and Reiter, R.J. (2009). The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol. Rev.* no-no.
- Tan, D.-X., Manchester, L.C., Liu, X., Rosales-Corral, S.A., Acuna-Castroviejo, D., and Reiter, R.J. (2013). Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *J. Pineal Res.* *54*, 127–138.
- Ward, C.R., and Storey, B.T. (1984). Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev. Biol.* *104*, 287–296.

- Webster, J.R., Suttie, J.M., Veenvliet, B.A., Manley, T.R., and Littlejohn, R.P. (1991). Effect of melatonin implants on secretion of luteinizing hormone in intact and castrated rams. *J. Reprod. Fertil.* *92*, 21–31.
- Weinberg, J.B., Doty, E., Bonaventura, J., and Haney, A.F. (1995). Nitric oxide inhibition of human sperm motility. *Fertil. Steril.* *64*, 408–413.
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote Camb. Engl.* *2*, 371–372.
- Zhang, H., Squadrito, G.L., Uppu, R., and Pryor, W.A. (1999). Reaction of Peroxynitrite with Melatonin: A Mechanistic Study. *Chem. Res. Toxicol.* *12*, 526–534.
- Zini, A., De Lamirande, E., and Gagnon, C. (1995). Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. *J. Androl.* *16*, 424–431.
- Zou, A.P., and Cowley, A.W. (1999). Role of nitric oxide in the control of renal function and salt sensitivity. *Curr. Hypertens. Rep.* *1*, 178–186.

# ANEXO I

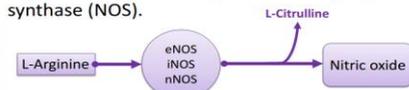
## Identification of intracellular nitric oxide synthase isoforms in ram sperm

Calvo, S.; Carvajal M.; Miguel-Jiménez, S.; Casao, A.; Cebrián-Pérez, J.A.; Muño-Blanco, T. and Pérez-Pé, R.  
 Department of Biochemistry and Molecular and Cellular Biology. Faculty of Veterinary, University of Zaragoza  
 Environmental Sciences Institute of the University of Zaragoza (IUCA), Spain



### INTRODUCTION

Nitric oxide (NO) plays a fundamental role in sperm functionality. It is synthesized by nitric oxide synthase (NOS).



Three isoforms of NOS (endothelial (eNOS), inducible (iNOS) and neuronal (nNOS)) have been identified in somatic cells and in the spermatozoa of several species. Also, it has been detected an increment in NOS activity during *in vitro* sperm capacitation.

**Thus, the objective of this work was to determine the presence and localization of the NOS isoforms in ram spermatozoa and their possible changes during *in vitro* capacitation.**

### MATERIALS AND METHODS

Second ejaculates from nine *Rasa Aragonesa* rams

Sperm selection by swim-up /dextran method

Control TALP medium vs Cocktail (K) TALP + cAMP elevating agents

***In vitro* capacitation:**  
 3 hours  
 39 °C  
 5 % CO<sub>2</sub>  
 100% humidity

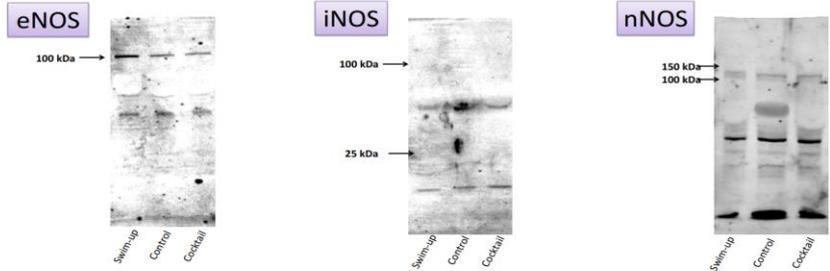
Western blot: SDS-PAGE electroforesis, 8% polyacrylamide gel, 20 hours, 22V wet transfer

Indirect immunofluorescence: Poly-L-lysine slides

Antibodies (Abcam)			
Dilution: 1/500 (v/v)	Anti-eNOS	ab5589	Dilution: 1/25 (v/v)
	Anti-iNOS	ab178945	
	Anti-nNOS	76067	

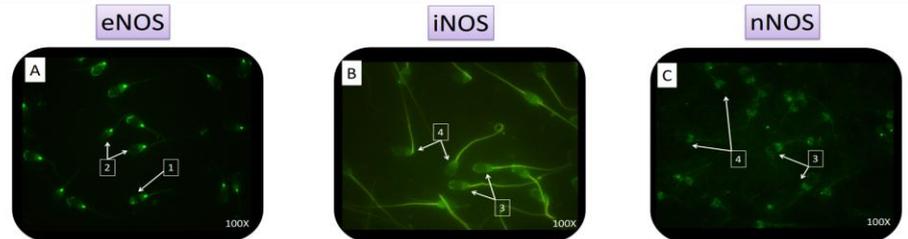
### RESULTS

#### Western blot

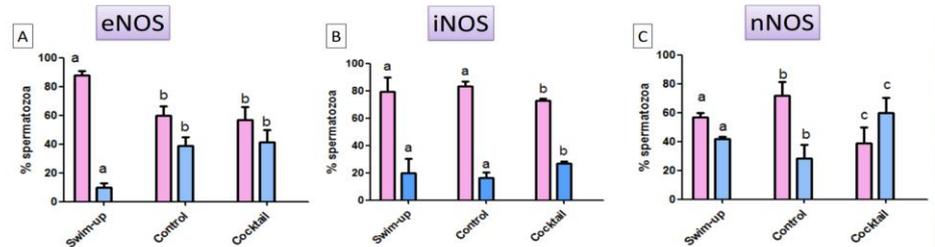


**Fig. 1:** Identification of nitric oxide synthase isoforms eNOS, iNOS and nNOS by Western Blot in swim-up selected and *in vitro* capacitated (incubated in capacitating conditions in TALP without (control) or with cAMP elevating agents (cocktail)) ram sperm proteins. The antibody against the eNOS revealed a 100 kDa band, and the antibody against nNOS recognized proteins of approximately 120 kDa. No bands corresponding to iNOS isoform were detected.

#### Indirect immunofluorescence



**Fig. 2:** Identification by indirect immunofluorescence of nitric oxide synthase isoforms eNOS (A), iNOS (B) and nNOS (C) evaluated by fluorescence microscopy. Two immunotypes can be seen in each isoform: labelling in post-acrosomal region + neck + apical edge (1) or post-acrosomal region + neck (2) in eNOS; post-acrosomal region + apical edge (3) or post-acrosomal region (4) in iNOS and nNOS.



**Fig. 3:** Percentages of the immunotypes for eNOS (A), iNOS (B) and nNOS (C), detected by indirect immunofluorescence in swim-up selected and incubated in capacitating conditions in TALP without (control) or with cAMP elevating agents (cocktail) in ram spermatozoa. Pink bars represent immunotype 1 for eNOS (Fig. 1A) and immunotype 3 for iNOS and nNOS (Fig. 1B and C), whereas blue bars represent immunotype 2 for eNOS (Fig. 1A) and immunotype 4 for iNOS and nNOS (Fig. 1B and C). Results are shown as mean ± SEM (A: n = 6; B, C: n = 3). Different letters (a-b) indicate statistical differences between treatments (p<0.05).

### CONCLUSIONS

- Nitric oxide synthase isoforms, eNOS, iNOS and nNOS, are present in ram spermatozoa.
- The changes in immunotypes percentages after *in vitro* capacitation detected by indirect immunofluorescence in eNOS and nNOS suggests a possible role of these isoforms in ram sperm capacitation.

This study was supported by projects: AGL-2017-83799-R, DGA 2016-A26, BES-2015-072034