



**Universidad
Zaragoza**



**Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza**

TRABAJO FIN DE GRADO

Implicación de la NOX5 en la acción antioxidante y sobre la capacitación de la melatonina en los espermatozoides

Autora

Blanca Pina Beltrán

Directoras

Dr. Adriana Casao

Silvia Gimeno Martos

Departamento en Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Grado en Biotecnología

Junio 2019

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Especies reactivas de oxígeno: Implicaciones en la fisiología espermática	3
2.2 NADPH-oxidasa 5 (NOX5): Características y función	4
2.3 Modulación de la capacitación y efectos antioxidantes de la melatonina en espermatozoides	5
3. HIPÓTESIS	7
4. OBJETIVOS	7
5. MATERIALES Y MÉTODOS	8
5.1 Procesado de las muestras espermáticas.....	8
5.1.1 Obtención de las muestras seminales	8
5.1.2. Separación y selección espermática (<i>Swim-up/Dextrano</i>)	8
5.1.3 Capacitación <i>in vitro</i>	9
5.2 Evaluación de las muestras espermáticas	10
5.2.1 Evaluación de la motilidad espermática	10
5.2.2 Evaluación de la integridad de la membrana plasmática (viabilidad)	10
5.2.3 Estudio de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)	11
5.2.4 Evaluación del estado de capacitación (Tinción con clorotetraciclina)	11
5.3 Determinación de la distribución de la NADPH Oxidasa 5 por inmunofluorescencia indirecta (IFI)	12
5.4 Detección y cuantificación de la NADPH Oxidasa 5 mediante Western Blot	13
5.5 Análisis estadístico.....	14
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
6.1 Identificación de la NADPH oxidasa 5 por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Western Blot	14
6.1.1 Optimización del protocolo e identificación por IFI	14
6.1.2 Optimización del protocolo para identificación de la NADPH Oxidasa mediante Western Blot.....	16
6.2 Efecto de la melatonina sobre NOX5 en espermatozoides ovinos.....	17
6.2.1 Evaluación de la motilidad y viabilidad espermática	17
6.2.2 Evaluación del estado de capacitación	17
6.2.3 Evaluación de la presencia de especies reactivas de oxígeno	18

6.2.4 Efecto de la melatonina sobre la distribución de NOX5.....	19
6.2.5 Análisis densitométrico de NOX5 mediante Western Blot.....	20
7. CONCLUSIONES	22
CONCLUSIONS.....	22
8. BIBLIOGRAFÍA.....	23
9. ANEXOS.....	26



La Dra. Adriana Casao Gascón, Profesora Titular y Silvia Gimeno Martos, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

INFORMAN:

Que la alumna Dña. Blanca Pina Beltrán, ha realizado bajo nuestra dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin de Grado titulado "Implicación de la NOX5 en la acción antioxidante y sobre la capacitación de la melatonina en espermatozoides". Este trabajo cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFG en Biotecnología, por lo que consideran procedente su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos firman la presente en Zaragoza a 25 de julio de 2019.



Departamento de
Bioquímica y Biología
Molecular y Celular
Universidad Zaragoza



Adriana Casao Gascón

Silvia Gimeno Martos

Parte de los resultados derivados del presente Trabajo Fin de Grado han sido aceptados para su presentación como póster en el 35th Annual AETE (Association of Embryo Technology in Europe) Conference que se celebrará en Murcia del 13 al 14 de Septiembre de 2019.

Título: "Identification and localization of NADPH oxidase 5 in ram spermatozoa"

Autores: Silvia Gimeno-Martos, Blanca Pina-Beltrán, Adriana Casao, Jose A. Cebrián-Pérez, Teresa Muiño-Blanco, Rosaura Pérez-Pé

1. RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel muy importante en el proceso de capacitación de los espermatozoides de mamífero. Una de las enzimas involucradas en la producción de ROS en el espermatozoide es la NADPH oxidasa 5 (NOX5). Por otro lado, la melatonina es una hormona capaz de disminuir los niveles de ROS en las células, y regular la actividad de NOX en células somáticas. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar la NOX5 en el espermatozoide ovino y analizar la acción de la melatonina sobre esta enzima.

Para ello, se seleccionaron espermatozoides libres de plasma seminal mediante el método *Swim-up* y NOX5 se identificó mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Western Blot tras poner a punto los protocolos. Posteriormente, los espermatozoides seleccionados por *Swim-up* se incubaron durante 3 horas en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂) en un medio TALP o un medio TALP con sustancias potenciadoras de la capacitación (Cocktail), con y sin melatonina 1 μM. Tras la incubación se evaluó motilidad, viabilidad, estado de capacitación y especies reactivas de oxígeno. Además, para determinar un posible efecto de la melatonina sobre NOX5, se evaluó la distribución de NOX5 mediante IFI y se cuantificó por densitometría tras Western Blot.

Los resultados demostraron la presencia de NOX5 en el espermatozoide ovino, con la identificación mediante Western Blot de una banda de 85 kDa, compatible con el peso molecular de esta enzima. Además, la IFI reveló la presencia de 6 inmunotipos distintos en estas células, con marcaje en la pieza intermedia, acrosoma, zona apical, zona apical y postacrosomal, acrosoma y postacrosoma o sólo postacrosoma. Asimismo, la capacitación en medio TALP y Cocktail produjo una variación en el porcentaje de los distintos inmunotipos para NOX5 con respecto a la muestra *Swim-up*, mientras que la incubación con melatonina revirtió el porcentaje de los distintos inmunotipos a niveles similares a los de la muestra inicial. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el análisis densitométrico tras la capacitación, y la melatonina sólo disminuyó el porcentaje de células con bajos niveles de ROS en el medio TALP.

En conclusión, NOX5 está presente en el espermatozoide ovino, y la melatonina en condiciones capacitantes afecta a la distribución pero no a la concentración de esta enzima.

1. ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) play a very important role in the capacitation of mammalian spermatozoa. One of the enzymes involved in ROS production in the spermatozoa is NADPH oxidase 5 (NOX5). On the other hand, melatonin can decrease cellular ROS levels, and regulates NOX activity in somatic cells. Therefore, the objective of this work was to identify NOX5 in ram spermatozoa and to analyze the influence of melatonin on this enzyme.

Thus, seminal plasma-free spermatozoa were selected by Swim-up, and NOX5 was identified by indirect immunofluorescence (IFI) and Western Blot, after adjusting the protocols. After that, *Swim-up* selected spermatozoa were incubated for 3 hours under capacitating conditions (39 °C and 5% CO₂) in a TALP medium or a TALP medium with capacitation-enhancing compounds (Cocktail), with and without 1 μM melatonin. After incubation, motility, viability, capacitation status, and reactive oxygen species were evaluated. Also, the melatonin effects on NOX5 distribution was determined by IFI, and NOX5 was quantified by densitometry after Western Blot.

The results revealed the presence of NOX5 in ram spermatozoa, with a 85 kDa band identified by Western Blot and compatible with the molecular weight of this enzyme. Moreover, the IFI revealed the existence of 6 different immunotypes in these cells, with NOX5 located in the sperm middle piece, acrosome, apical ridge, apical and post-acrosomal zones, acrosome and post-acrosome or only post-acrosome. Moreover, capacitation in TALP and Cocktail medium caused a significant variation in the percentage of the different NOX5 immunotypes compared to *Swim-up* sample, whereas incubation with melatonin reverts these percentages to levels similar to the initial sample. However, no significant differences were observed in the densitometric analysis after capacitation, and melatonin only reduced the percentage of cells with low levels of ROS in the TALP medium.

In conclusion, NOX5 is present in ram spermatozoa, and melatonin, under capacitating conditions, can affect its distribution within the cells, but not its concentration.

quinasa (PTK) que a su vez fosforila a las proteínas en sus residuos de tirosina, imprescindible para la capacitación espermática.

En las células espermáticas se postulan varias fuentes como las causantes del aumento de especies reactivas de oxígeno. En situaciones patológicas (7), un aumento de ROS puede deberse a contaminación por leucocitos, disminución de la actividad de los sistemas de producción de moléculas antioxidantes o una excesiva activación de los sistemas fisiológicos productores de ROS, mientras que de forma fisiológica las ROS se generarían como consecuencia de la pérdida de electrones del complejo protéico I y III pertenecientes a la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (8) o serían producidas por NADPH-oxidasas localizadas en la membrana plasmática del espermatozoide, entre las que se encuentra la NADPH-oxidasa 5 (9).

2.2 NADPH-oxidasa 5 (NOX5): Características y función

Las NADPH-oxidasas son una familia de proteínas transmembrana productoras de especies reactivas de oxígeno compuesta por 7 miembros: 5 oxidasas simples (NOX1-NOX5) y 2 oxidasas dobles (DUOX 1 y 2) (10). La NADPH-oxidasa 5 fue la última en ser identificada ya que no está presente en el genoma de roedores, lo que en cierto modo ha dificultado su estudio (10)

Existen seis isoformas de la NOX5: cuatro denominadas largas en conjunto (NOX5L): NOX5 α , β , γ , y δ , una corta (NOX5S) y una predicción de la que no existen datos experimentales (NOX5- ζ) (UniProtKB-Q96PH1). Estas isoformas se considera que podrían darse por splicing alternativo (11) o bien por la existencia de promotores intragénicos que regulen su transcripción (12)

La NADPH oxidasa 5 se expresa mayoritariamente en tejidos como los nódulos linfáticos, áreas ricas en linfocitos del bazo, testículos, y en células como los espermatozoides (9) donde su principal función es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), indispensables para la capacitación espermática. En tejidos, las especies reactivas de oxígeno producidas por esta enzima pueden intervenir en procesos de citoquinesis, angiogénesis, proliferación celular, apoptosis y secreción de citoquinas (12). Además, se cree que su sobreexpresión puede influir en enfermedades cardiovasculares, daño renal e incluso cáncer(13). La NOX5 ha sido identificada como una de las principales fuentes de producción de especies reactivas de oxígeno en espermatozoides de perro (14), caballo (9) y humano (11),. En las dos primeras se cree que interviene en la motilidad espermática (9,14) mientras que en humano se ha visto una expresión aumentada en individuos con teratozoospermia, donde se correlaciona un aumento de su expresión con un mayor número de espermatozoides con morfologías anormales (15).

En cuanto a su localización intracelular, NOX5 se encuentra anclada tanto a la membrana plasmática como a la membrana del retículo endoplasmático (16). La NADPH-oxidasa 5 está compuesta por 4 dominios de unión al calcio, EF hand, en N-terminal (región citosólica), una región de 6 hélices- α transmembrana con 4 residuos de histidina altamente conservados que coordinan la unión de dos iones Fe²⁺, y en C-terminal un dominio REFBD (Regulatory EF-hand Binding Domain), uno de unión a FAD y otro de unión a NADPH (17) (**Figura 2**). Al contrario que el resto de oxidasas de la familia, NOX5 no requiere de subunidades regulatorias como p22 $phox$ (necesario en NOX1-NOX4) para formar el complejo activador y mejorar su estabilidad (16,18), ni de factores de maduración (necesarios en las oxidasas dobles) para su activación, ya que está principalmente regulada por la unión del ión Ca²⁺ a sus dominios EF-hands (17) y procesos de fosforilación. La unión del Ca²⁺ provocaría un cambio conformacional que permitiría la interacción entre la región N-terminal y C-terminal de la proteína, produciéndose así la generación de ROS, al permitir el paso de electrones del

dominio NADPH al FAD y posteriormente a los dos átomos de hierro, que los cederán al oxígeno formando así un anión superóxido (11).

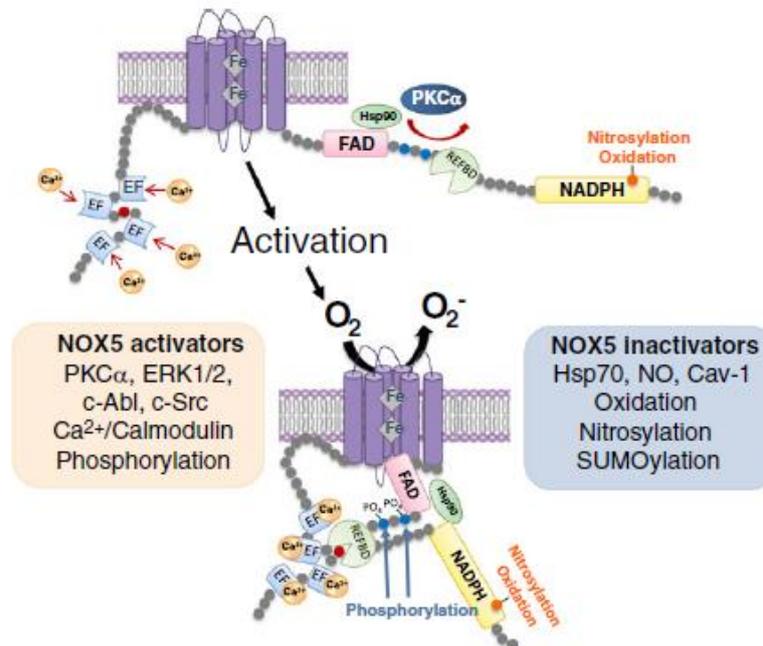


Figura 2. Diagrama que muestra los mecanismos de regulación que intervienen en el cambio conformacional para la activación de NOX5 (13).

A pesar de que experimentalmente se observa que la concentración necesaria del catión Ca^{2+} para activar a NOX5 sería superior a la que se podría encontrar a nivel celular de manera fisiológica, se ha comprobado que la fosforilación de ciertos aminoácidos por enzimas como la PKC o c-Abl, así como la unión de Ca^{2+} -calmodulina, aumenta la sensibilidad de esta enzima por el calcio, permitiendo su activación con los niveles de calcio que se encuentran en el citosol (19). Otras interacciones protéicas también son necesarias para llegar a cabo su actividad de manera efectiva, como con la chaperona Hsp 90, que media en el cambio conformacional que sufre durante su activación(13).

2.3 Modulación de la capacitación y efectos antioxidantes de la melatonina en espermatozoides

Los espermatozoides son células extremadamente sensibles al estrés oxidativo, por lo que en el tracto reproductor masculino existen diversos mecanismos de protección, ya sean enzimas o moléculas antioxidantes como la melatonina (20). La melatonina es una hormona secretada mayoritariamente por la glándula pineal (21), aunque también puede ser secretada en distintos tejidos extrapineales como la médula ósea o la retina (22). En el tracto reproductor masculino existe secreción de melatonina extrapineal en el testículo (23), lo que explicaría la presencia diurna de esta hormona en el plasma seminal (24), mientras que en el tracto reproductor femenino (25) es sintetizada en ovarios, endometrio y placenta.

La melatonina pineal regula los ritmos circadianos, ya que su concentración en plasma sanguíneo posee un pico máximo de concentración nocturno y unos niveles basales diurnos (26) y su producción está regulada por cambios de iluminación ambiental. Además, también regula los ritmos reproductivos en animales estacionales en función de las variaciones en la duración de su secreción nocturna a lo largo del año (27). El objetivo principal de la existencia de épocas reproductivas es asegurarse de que la descendencia nace en primavera o verano cuando los recursos naturales son abundantes y hay alta disponibilidad de alimento.

La especie ovina es una especie estacional de día corto, por lo que la secreción de melatonina durante las noches de otoño e invierno tiene un efecto estimulador en su reproducción (28). El aumento de la secreción nocturna de melatonina durante los días cortos regula la secreción pulsátil de GnRH por el hipotálamo y por tanto, la inducción de la actividad ovárica en hembras y el aumento de la producción de esperma en machos. Aunque la estacionalidad reproductiva está menos marcada en el macho ovino que en la hembra, y la producción de esperma es continua a lo largo de todo el año, durante la época no reproductiva hay una marcada reducción del comportamiento sexual, de la calidad seminal y del peso y volumen testicular, lo que implica una reducción de la fertilidad del morueco. (28)

A pesar de que la influencia que ejerce la melatonina en la fisiología espermática sigue siendo objeto de estudio, se ha comprobado que esta hormona puede actuar directamente sobre los espermatozoides, y que disminuye el daño oxidativo, reduciendo los niveles de ROS (29), así como los de marcadores apoptóticos (30), incluyendo la fragmentación del DNA (31). En cuanto a la capacitación espermática, hay estudios en la especie ovina que indican una influencia dosis-dependiente de la melatonina, siendo descapacitante a concentración 1 μ M, y capacitante a concentración 100 pM (30).

Además, la concentración 1 μ M de melatonina no solo provoca una disminución en el porcentaje de espermatozoides capacitados y los niveles de ROS, sino que también disminuye los de cAMP y calcio intracelular, y reduce la fosforilación en residuos de tirosina (32), lo que podría explicar el posible efecto descapacitante de esta hormona. Así, en relación con las especies reactivas de oxígeno, la melatonina podría ejercer su acción descapacitante neutralizando las ROS debido a su acción antioxidante (35) o bien modulando o inactivando la NOX5, ya que esta enzima se postula como una de las principales fuentes de ROS en espermatozoide (11).

3. HIPÓTESIS

La NADPH oxidasa es una enzima generadora de especies reactivas de oxígeno de la que se han descrito 5 isoformas (10). De todas ellas, NOX5 parece estar involucrada en la producción de ROS en espermatozoide humano (11), equino (9) y canino(14). En estas células unos niveles adecuados de ROS son necesarios para múltiples funciones espermáticas, entre las que se incluyen la capacitación y la reacción acrosómica (1), mientras que niveles elevados se han asociado con daños en el DNA y peroxidación de lípidos de la membrana plasmática que provocan baja fertilidad (15).

Por otro lado, la melatonina es una hormona fundamental en la regulación de la reproducción en mamíferos estacionales (27), así como un potente antioxidante capaz de disminuir de forma directa los niveles de ROS en el medio extracelular e intracelular (28). Además, en células somáticas también se ha descrito un efecto de esta hormona sobre los niveles de ROS a través de la regulación de la actividad de NOX(33).

Por tanto, en base a los antecedentes expuestos, se postula la hipótesis en este trabajo de que en el espermatozoide ovino la regulación de los niveles de ROS, a través de la modulación de la NOX5, podría estar implicada en el mecanismo mediante el cual la melatonina modula la capacitación espermática

4. OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo fue analizar la acción de la melatonina sobre la NOX5, así como su influencia en la producción de especies reactivas de oxígeno y sobre la capacitación espermática en la especie ovina. Para ello se definieron los siguientes objetivos específicos:

- Identificar la presencia de NOX5 en espermatozoide ovino mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Western Blot (WB)
- Evaluar los efectos de la melatonina sobre los niveles de NOX5, evaluados por IFI, WB
- Evaluar los efectos de la melatonina sobre los niveles de ROS y su relación con NOX5.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Procesado de las muestras espermáticas

5.1.1 Obtención de las muestras seminales

Las muestras seminales utilizadas en los experimentos se obtuvieron mediante vagina artificial de nueve moruecos adultos pertenecientes a la Asociación Nacional de ganaderos de la raza *Rasa Aragonesa* (ANGRA), estabulados en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Zaragoza.

De cada morueco se obtuvieron dos eyaculados consecutivos, aunque solo fue utilizado el segundo de ellos, dado que en investigaciones previas se demostró que este mostraba mejores parámetros de calidad seminal (34). Los segundos eyaculados de los distintos machos obtenidos en el día se mezclaron entre sí para evitar diferencias individuales.

Las muestras seminales se transportaron en una nevera a 37 °C hasta el laboratorio, donde se mantuvieron en una estufa a la misma temperatura durante su uso.

5.1.2 Separación y selección espermática (*Swim-up*/Dextrano)

La técnica *Swim-up*/Dextrano, puesta a punto en nuestro laboratorio para la especie ovina (35), presenta la ventaja de seleccionar una población espermática libre de plasma seminal, que a su vez está enriquecida en espermatozoides con una motilidad y viabilidad elevadas. La eliminación del plasma seminal es conveniente para evitar el efecto perjudicial que éste ejerce sobre los espermatozoides (36), así como prevenir la posible influencia que puedan tener sus componentes, en este caso la melatonina presente en este fluido (30), en los resultados de los experimentos.

El medio utilizado, denominado mHTF (35), está compuesto por NaCl 50 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 0,4 mM, K₂HPO₄ 0,3 mM, glucosa 2,8 mM, HEPES 21 mM, piruvato sódico 0,3 mM, lactato sódico 18,6 mM y sacarosa 200 mM. El pH se ajustó a 6,5. Este medio no contenía ni CaCl₂ ni NaHCO₃ con el fin de evitar una capacitación prematura de los espermatozoides (37)

Para la realización de la técnica *Swim-up*/Dextrano se colocaron cuidadosamente 0,5 ml de la muestra seminal en el fondo de un tubo redondeado de 15 mm de diámetro y se añadieron 0,5 ml de medio mHTF -Dextrano (30 mg Dextrano/ml de mHTF) lentamente sobre él, evitando en todo momento la mezcla de ambas fases. Sobre esta capa se depositaron 1,5 ml de mHTF-BSA (5 mg BSA/ml de mHTF), que constituye el medio de recogida, ya que la presencia de albúmina evita la aglutinación de los espermatozoides.

La adición de una capa de medio con alta concentración de dextrano (mHTF-Dextrano) sobre el eyaculado consigue que sólo aquellos espermatozoides con buena motilidad y membrana intacta (viables) sean capaces de atravesarla, concentrándose en el medio de recogida que constituye la capa más superior (**Figura 3**).

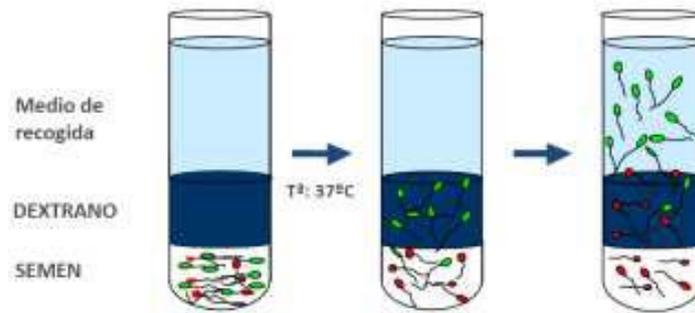


Figura 3. Esquema de la técnica de separación espermática *Swim-up*/Dextrano

El *Swim-up* se incubó manteniendo el tubo en posición vertical en estufa a 37 °C. Pasados 15 minutos desde el inicio de la incubación se extrajeron 750 µl de la capa superior y se sustituyeron por el mismo volumen de mHTF-BSA. Este proceso se repitió un total de cuatro veces, lo que conlleva la obtención de cuatro sobrenadantes. El primero de ellos se desechó por contener trazas de plasma seminal y los tres restantes se juntaron conformando la muestra denominada en este trabajo ***Swim-up***.

5.1.3 Capacitación in vitro

Para conseguir inducir el proceso de capacitación espermática *in vitro*, se prepararon alícuotas de $1,6 \times 10^8$ células/ml a partir de la muestra ***Swim-up***, que fueron incubadas en una estufa a 39 °C, en atmósfera al 5% de CO₂ y 100% de humedad, durante 3 horas.

Las incubación de todas las alícuotas se llevó a cabo en medio TALP completo (38), compuesto por NaCl 100 mM, KCl 3,1 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄ 0,3mM, lactato sódico 21,6 mM, CaCl₂ 3 mM, MgCl₂ 0,4 mM, HEPES 10 mM, piruvato sódico 1 mM y glucosa 5 mM; al cuál se añadieron 5 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA), y se ajustó a un pH de 7,3. En algunas muestras se añadió al medio TALP una mezcla de sustancias con capacidad para inducir la capacitación *in vitro* de los espermatozoides ovinos (39), que se denominaron ***Cocktail***. El ***Cocktail*** estaba compuesto por dibutilil-cAMP (análogo del cAMP; 1 mM), cafeína y teofilina (ambos inhibidores de fosfodiesterasas; 1 mM, cada uno), ácido okadaico (inhibidor de fosfatasa de amplio espectro; 0,2 µM) y metil-β-ciclodextrinas (2,5 mM).

Además, se añadió melatonina, disuelta en PBS y dimetilsulfóxido (DMSO), a una concentración final de 1 µM a determinadas alícuotas. Para no infravalorar los posibles efectos tóxicos del DMSO en los espermatozoides, se añadió 5µl del medio de dilución de la melatonina a las alícuotas sin ella, de tal modo que su concentración final de DMSO en todas ellas fue de 0,1%.

De esta forma, los grupos experimentales de este trabajo fueron los siguientes: ***Swim-up*** (muestra libre de plasma seminal sin incubar en condiciones capacitantes), **TALP** (incubada en medio TALP), **TALP - 1 µM melatonina** (incubada en medio TALP + 1 µM de melatonina), **Cocktail** (medio TALP + sustancias capacitantes), y **Cocktail - 1 µM melatonina** (medio TALP + sustancias capacitantes + 1 µM de melatonina).

5.2 Evaluación de las muestras espermáticas

5.2.1 Evaluación de la motilidad espermática

La motilidad espermática se determinó utilizando un sistema de análisis computerizado (CASA, *computer assisted sperm analysis*), concretamente el ISAS (*Integrated Semen Analysis System*) 1.0.4 (Proiser SL, Valencia, España). Este se sirve de una cámara de video (Basler A312F, Basler Vision, Exton, PA) montada sobre un microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse 50i, Nikon, Tokyo, Japón) para analizar la motilidad las muestras espermáticas.

La muestra *Swim-up* se diluyó 1:5 (v/v) en medio mHTF, mientras que las muestras capacitadas se evaluaron sin diluir. En ambos casos, 6 μ l de cada muestra se colocó entre un portaobjetos y un cubreobjetos (ambos atemperados a 37 °C) y usando un objetivo 10x se evaluaron 5 campos por cada gota, obteniéndose así los parámetros de motilidad total (% de espermatozoides móviles) y motilidad progresiva (% de espermatozoides que presentan un desplazamiento en línea recta).

5.2.2 Evaluación de la integridad de la membrana plasmática (viabilidad)

El método descrito por Harrison y Vickers (40) conocido como método del ioduro de propidio/diacetato de carboxifluoresceína (PI/CFDA) permite evaluar la integridad de membrana plasmática de los espermatozoides. Esta técnica se basa en la diferente coloración que adquieren los espermatozoides tras su incubación con estos colorantes dependiendo del estado en que se encuentre su membrana plasmática. El diacetato de carboxifluoresceína (incoloro) es capaz de atravesar la membrana del espermatozoide y una vez en su interior las esterasas propias de dicha célula lo transforman en carboxifluoresceína (verde). El ioduro de propidio (rojo) es un agente capaz de intercalarse en el DNA, pero es incapaz de penetrar la membrana del espermatozoide a menos que esta esté dañada, en cuyo caso podrá entrar en contacto con su material genético y unirse a él dotando a la célula de una tonalidad roja brillante (**figura 4A**).

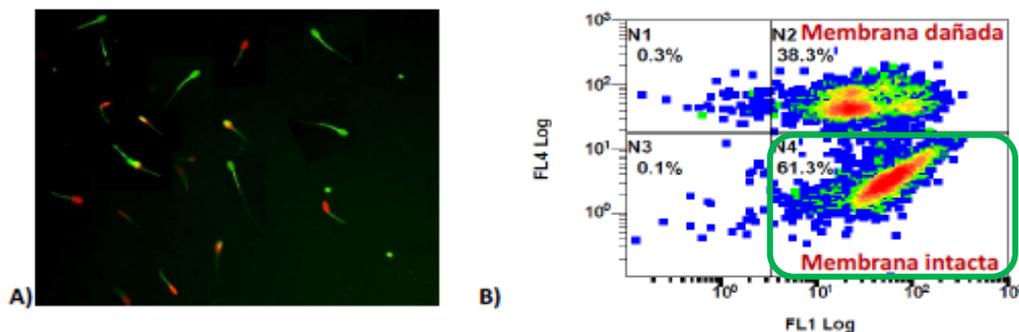


Figura 4. A) Imagen representativa de la doble tinción de los espermatozoides ovinos con ioduro de propidio y diacetato de carboxifluoresceína observado mediante microscopía de fluorescencia a través de los filtros B-2A (filtro de excitación 450-490 nm) y G-2A (filtro de excitación 510-560 nm) y 400x. B) Diagrama representativo de la integridad de membrana, donde la viabilidad espermática es evaluada por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4 (44).

Para la tinción de viabilidad, la muestra *Swim-up* se diluyó 1:60 (v/v) y las alícuotas de capacitación 1:5 (v/v), ambas en medio mHTF. Posteriormente, se añadieron 3 μ l de CFDA (0,46 mg/ml en DMSO), 3 μ l de PI (1.5 mM) y 3 μ l de formaldehído 0,5% (v/v) en agua MilliQ) para fijar la muestra. La mezcla se incubó en oscuridad a 37 °C durante al menos 15 minutos.

Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo usando un citómetro Beckman Coulter FC 500 (Beckman Coulter INC, Pasadena, CA, EEUU) equipado con un láser de argón a 488 nm y otro de estado sólido a 633 nm. La fluorescencia se detectó usando los filtros FL1-525 ± 5 nm para CFDA y FL4-675 ± 5 nm para PI. Se evaluaron un total de 20.000 eventos, con una media de 500-1.000 eventos/segundo, siendo la población de interés aquella en la que las células mantienen la membrana intacta (**Figura 4B**).

5.2.3 Evaluación de la presencia de especies reactivas de oxígeno

Este método está basado en la utilización de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H₂DCFDA) en combinación con yoduro de propidio (PI), para poder discriminar entre células vivas y muertas (41). El H₂DCFDA es un colorante capaz de atravesar las membranas del espermatozoide y penetrar al interior celular, donde es hidrolizado por esterasas intracelulares a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF, no permeable y no fluorescente). Posteriormente, el H₂DCF es oxidado por el H₂O₂ a diclorofluoresceína (DCF), que emite fluorescencia a 530 nm tras su excitación a 488nm.

Para el análisis, la muestra *Swim-up* se diluyó 1:60 (v/v) y las alícuotas de capacitación 1:30 (v/v), ambas en medio mHTF. Se incubaron con 1 µM de H₂DCFDA y 2,5 µg/ml de PI durante 15 minutos a 37 °C en oscuridad, y se fijaron con formaldehído 1,7 mM. Tras la incubación, las muestras se analizaron mediante un citómetro de flujo Beckman Coulter FC 500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). La fluorescencia correspondiente a la diclorofluoresceína (DCF) se recogió con el fotodetector FL1 (filtro FL1-525 ± 5 nm) y la propia del yoduro de propidio con el FL4 (filtro FL4-675 ± 5 nm). En este trabajo se evaluaron los espermatozoides vivos con bajos niveles de especies reactivas de oxígeno.

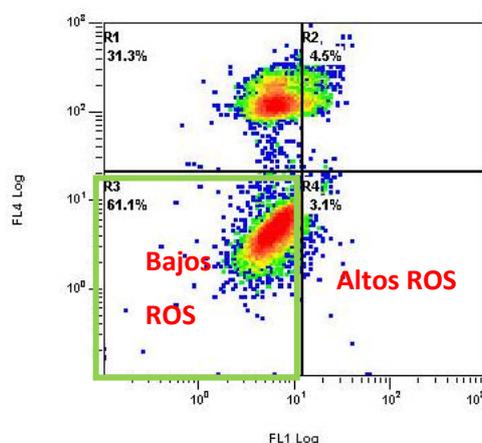


Figura 5. Diagrama representativo de los niveles de especies reactivas de oxígeno evaluados por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

5.2.4 Evaluación del estado de capacitación mediante tinción con clorotetraciclina

La clorotetraciclina (CTC) es un antibiótico que al penetrar en la célula espermática se une al calcio libre, dando lugar a patrones característicos de tinción en función de la distribución intracelular de dicho catión. En este estudio se utilizó una versión modificada del ensayo descrito por Ward y Storey (41) y validada para semen ovino por nuestro grupo de investigación (42).

Para esta tinción 20 µl de una solución preparada diariamente de clorotetraciclina (2 mg de CTC disueltos en 5 ml de un tampón compuesto por Tris 20 mM, cisteína 5 µM y NaCl 130 mM, pH 7,8) se mezclaron con 20 µl de los distintos grupos experimentales y 4 µl de una solución paraformaldehído (1,25% (p/v) en tampón Tris-HCL 0,5 M, pH 7,4) como agente fijador. Esta mezcla se incubó media

hora en refrigeración a 4 °C en oscuridad. Tras ello, 6 µl de cada muestra se colocaron en un portaobjetos junto con 3 µl de trietilnediamino 0,22 M (DABCO) diluido en glicerol:PBS (9:1 v/v) para preservar la fluorescencia. Se depositó un cubreobjetos sobre el montaje anterior, y tras presionar levemente para eliminar las posibles burbujas de aire, se selló con esmalte de uñas y se mantuvo a -20 °C y en oscuridad hasta su análisis.

La evaluación se realizó mediante 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 un objetivo de inmersión con aumento 100x. Se evaluaron 100 espermatozoides por muestra, diferenciándose 3 tipos según el patrón de fluorescencia (**Figura 6**): NC: distribución uniforme de la fluorescencia en toda la cabeza, C: fluorescencia en la porción acrosomal y R: sin fluorescencia en la cabeza, en ocasiones se tiñe la banda ecuatorial.

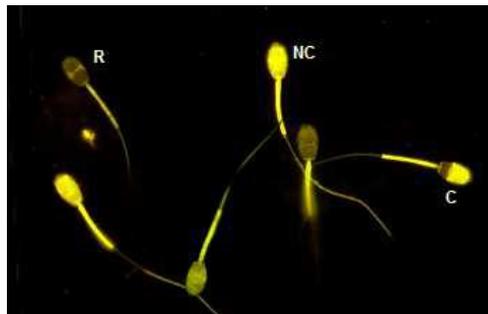


Figura 6. Imagen representativa de espermatozoides ovinos teñidos con clorotetraciclina (CTC) y visualizados con microscopía de fluorescencia bajo filtro V-2A y 100x. Se pueden distinguir espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y reaccionados (R) (44).

5.3. Determinación de la distribución de la NADPH Oxidasa 5 por inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La IFI nos permitió estudiar posibles variaciones en la distribución de la NADPH oxidasa 5 en los espermatozoides de los distintos grupos experimentales.

Se evaluaron dos concentraciones de 2×10^6 y 4×10^6 espermatozoides/ml diluidos en medio mHTF, a los que se añadieron 50 µl de formaldehído 0,05% o 3,7% (v/v) como agente fijador. Las células se incubaron durante 20 minutos en rueda a temperatura ambiente, tras lo cual las muestras se centrifugaron durante 6 minutos a 900 g. Posteriormente, se procedió a retirar el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500 µl de tampón PBS 1x (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM y KH_2PO_4 1,76 mM, pH 7,4).

A continuación, se depositaron 40 µl de cada suspensión de células en portaobjetos con su superficie cubierta con polilisina (Superfrost Plus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y para garantizar una correcta adhesión de las células se dejó secar la gota a temperatura ambiente. Una vez seca la gota, los portaobjetos se lavaron 3 veces con PBS 1x en agitación durante 5 minutos. Después de realizar los lavados, las células se permeabilizaron con 40 µl de Tritón X-100 al 0,5% (v/v) en PBS durante 15 minutos, tras lo cual se realizó una segunda fijación añadiendo 80 µl de paraformaldehído 1,25% en Tris-HCl durante 5 minutos. Tras otros 3 lavados de 5 minutos cada uno en PBS 1x se procedió al bloqueo de los diversos sitios de unión inespecíficos con BSA al 5% (p/v) en PBS 1x durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Al día siguiente se volvieron a realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno en PBS 1x, y las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-NADPH oxidasa 5 (ab191010, Abcam, Cambridge, UK) diluido en PBS con BSA al 1% (v/v) toda la

noche en cámara húmeda a 4°C. Se evaluaron varias diluciones del anticuerpo primario entre 1:500 y 1:25. Tras esta incubación se realizaron de nuevo 3 lavados en idénticas condiciones a los anteriores y al finalizar las células se incubaron con el anticuerpo secundario unido a un fluorocromo (Alexa Fluor 488 chicken anti-rabbit, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) durante 75 minutos en cámara húmeda, a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras otros 3 lavados se montaron los portaobjetos con DABCO 0,22 M en solución de glicerol:PBS 9:1, para atenuar la pérdida de fluorescencia. En el caso de no poder evaluar las muestras inmediatamente, se congelaron a -20°C hasta el momento de su análisis.

La evaluación de las muestras se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse E-400 con iluminación de fluorescencia y un filtro V-2) utilizando el objetivo de inmersión 100x. Se contaron 100 células por muestra, clasificando a los espermatozoides en distintos inmunitipos en función del marcaje observado.

5.4 Detección y cuantificación de la NADPH Oxidasa 5 mediante Western Blot

Extracción de proteínas espermáticas

En este trabajo se han probado distintas variaciones del protocolo de extracción de proteínas de membrana espermática descrito por Colás y col. (39). En el protocolo original a 200 µl de las muestras obtenidas del *Swim-up*, así como a todo el volumen de las alícuotas provenientes de la capacitación *in vitro* se les añadieron 100 µl del medio de extracción compuesto por 10% de SDS (dodecil sulfato sódico, p/v), TRIS-HCL 0,0626 mM (pH 6,8) e inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma Chemical Co., Madrid, España). La mezcla se incubó durante 5 minutos a 100 °C en baño de arena y después, se centrifugó 5 minutos a 15000 g y temperatura ambiente. Al sobrenadante recogido tras la centrifugación se añadieron 2-mercaptoetanol, glicerol y azul de bromofenol diluido en glicerol al 10%, a una concentración final de 5% y 1% y 0,002%, respectivamente. Las proteínas se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

SDS-PAGE e Inmunoblotting

Los proteínas espermáticas se separaron mediante una electroforesis en una dimensión siguiendo el método Laemli (43) y utilizando patrones de comparación de pesos moleculares, de 10 a 250 kDa (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Se utilizaron geles de acrilamida al 10% y de 1,5 mm de grosor. Se cargaron 50 µl de muestra en cada pocillo y las condiciones de electroforesis fueron 130 V durante 90 minutos, a 4 °C. Tras su finalización, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF utilizando una unidad de transferencia semiseca (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad, Hercules, California, USA). Una vez realizada la transferencia de proteínas, las membranas se bloquearon incubando 3 horas con PBS (NaCl 3,13 g/l, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l, KH₂PO₄ 0,24 g/l y, pH 7,4) con 5% de BSA (p/v) en agitación y temperatura ambiente.

La detección de la NADPH oxidasa 5 en las muestras se realizó incubando las membranas durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario monoclonal anti-NADPH oxidasa 5 (ab191010, Abcam, Cambridge, UK), probado a diluciones 1:500 y 1:400 en PBS-Tween (PBS con Tween-20 al 0,1% (p/v)) con 1% BSA (p/v). Junto con el anticuerpo anti-NADPH oxidasa 5 se añadió el anticuerpo primario monoclonal anti-tubulina (sc-398103, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EEUU) diluido 1:1000 como control de carga. Tras tres lavados de 15 minutos de duración cada uno con PBS-Tween en agitación, las membranas se incubaron durante 75 minutos en agitación y en oscuridad con los anticuerpos secundarios IRDye 800CW Donkey anti-Mouse e IRDye 700CW Donkey anti-Rabbit (LI-COR

Biosciences, Lincoln, NE, EEUU), diluidos 1:15000 y 1:10000 (v/v), respectivamente, en PBS-Tween con 1% BSA (p/v). Finalmente, las membranas se escanearon y la intensidad relativa de la banda de NADPH-oxidasa 5 se cuantificó con Odyssey Clx Infrared Imaging System (Li-COR Biosciences, Lincoln, NE, EEUU)

5.5 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software Gradpad InStat (v. 5.01, San Diego, CA, EEUU). Los resultados se muestran como la media \pm S.E.M. (error estándar de la media). Se realizó el análisis χ^2 comparando todas las muestras para detectar diferencias significativas en motilidad (total y progresiva), viabilidad, cantidad de especies reactivas de oxígeno, estado de capacitación y en la inmunolocalización de la NADPH oxidasa 5. Para estudiar los valores obtenidos en la cuantificación de NADPH oxidasa 5 mediante Western Blot se realizó un análisis de varianza (One-Way ANOVA).

Asimismo, se realizó un test de correlación de Spearman mediante el software IBM SPSS Statistics (IBM Corp. Released 2017. Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp) para evaluar la existencia de una posible relación entre los distintos inmunotipos detectados para la NOX5 y el estado de capacitación de los espermatozoides.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Identificación de la NADPH Oxidasa 5 por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Wester Blot

6.1.1. Optimización del protocolo e identificación por IFI

Para identificar la enzima NOX5 en el espermatozoide ovino fue necesario optimizar el protocolo de IFI. En primer lugar se tuvo que reducir la concentración celular de 4×10^6 células/ml a 2×10^6 células/ml para poder diferenciar mejor los distintos inmunotipos obtenidos. Además, finalmente se utilizó una concentración de formaldehido 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 cierta autofluorescencia que enmascaraba el inmunomarcaje, tal y cómo se había mostrado en otros estudios (44). Por último, tras probar varias diluciones del anticuerpo primario (1:500, 1:200, 1:100, 1:50 y 1:25) se optó por emplear la dilución 1:25, ya que esta concentración permitió diferenciar mejor los distintos inmunotipos a la hora de realizar el recuento. Pese a todo, esta concentración no fue suficiente como para poder visualizar los inmunotipos de manera directa en el microscopio y fue necesario realizar el recuento mediante el análisis de imágenes obtenidas gracias a una cámara fotográfica acoplada al microscopio.

Tras optimizar el protocolo de inmunofluorescencia indirecta se identificó por primera vez NOX5 en el espermatozoide ovino, y se detectaron 6 patrones de fluorescencia o inmunotipos en esta célula: 1) Fluorescencia en pieza intermedia sin fluorescencia en la cabeza, 2) marcaje acrosomal, 3) marcaje apical, 4) marcaje apical + postacrosomal, 5) marcaje acrosomal + postacrosomal y 6) marcaje postacrosomal (**Figura 7**). Para diferenciar entre los inmunotipos apical y acrosomal, se siguió el siguiente criterio: si el espermatozoide solo presenta una fina línea continua de fluorescencia en el borde superior de la cabeza, se considera apical, pero si en vez de una línea es una franja de un grosor mayor y que baja hasta un tercio o dos tercios de la cabeza, entonces se considera acrosomal. Además, todos los inmunotipos con fluorescencia en la cabeza presentan también fluorescencia en la pieza intermedia.

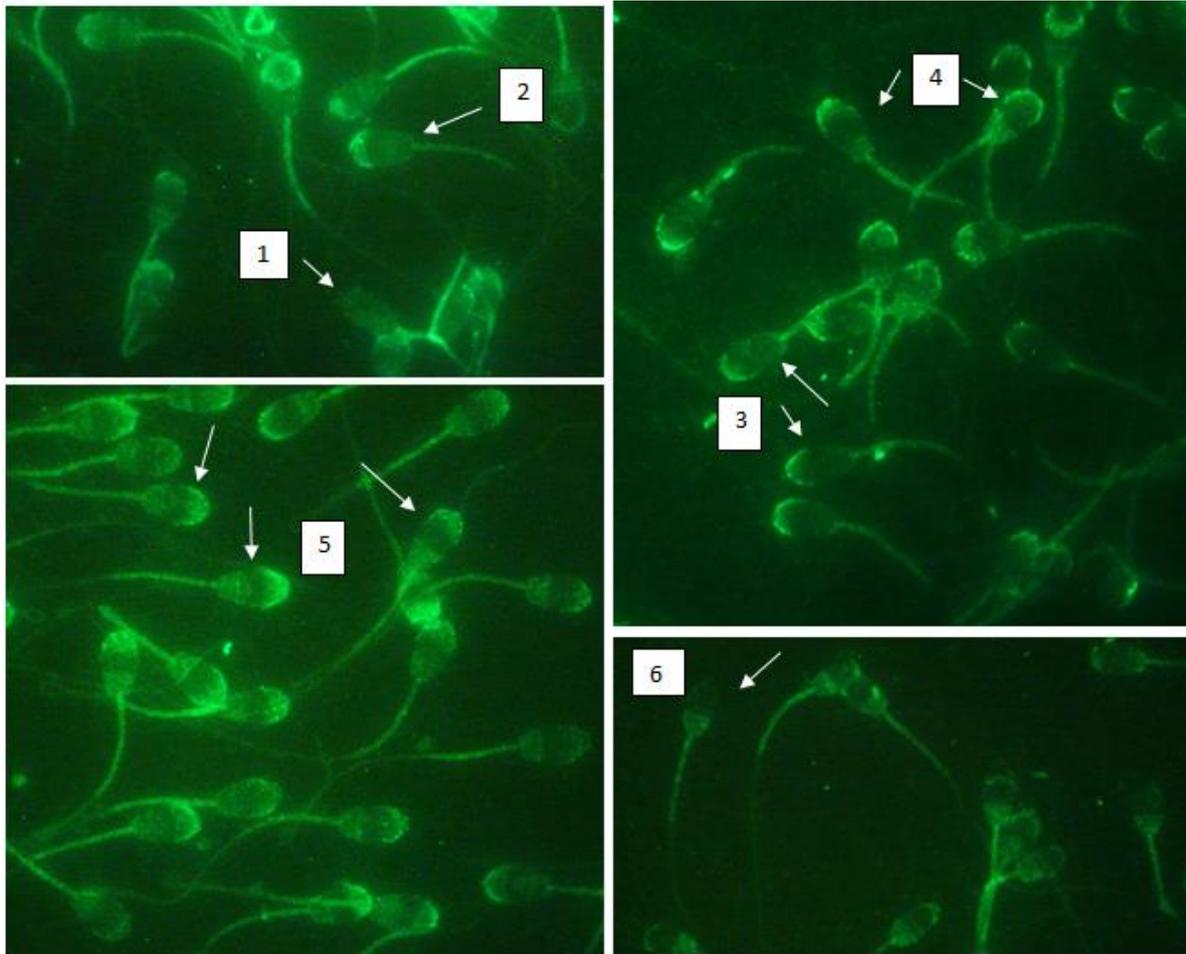


Figura 7. Imágenes representativas de la distribución de NOX5 en el espermatozoide ovino, identificada mediante inmunofluorescencia indirecta y evaluada por microscopía de fluorescencia. Se observan los siguientes inmuntipos: pieza intermedia (1), acrosomal (2), apical (3), apical + postacrosomal (4), acrosomal + postacrosomal (5) y postacrosomal (6). Los inmuntipos 2-6 también muestran la pieza intermedia del flagelo marcada.

NOX5 ha sido previamente identificada por IFI en espermatozoides otras especies como la humana (11) y equina (9). En espermatozoides humanos, NOX5 se localiza en flagelo, cuello y acrosoma de todas las células, mientras que en equino se identificaron únicamente dos inmuntipos, con marcaje en toda la cabeza, o en la zona ecuatorial y postacrosomal.

Así, la localización de NOX5 en espermatozoides ovinos difiere de los obtenidos en especie humana y equino, lo que indicaría que la localización de esta isoforma podría variar en función de la especie. Dada la presencia de distintos inmuntipos en la especie ovina, sería necesario estudiar, en trabajos posteriores, si existen diferencias individuales entre machos, o si el predominio de un inmuntipo u otro, o la cantidad de NOX5 está relacionado con la fertilidad, como ocurre en la especie humana (15).

6.1.2 Optimización del protocolo e identificación de NOX 5 mediante Western Blot

En la puesta a punto del Western Blot para NADPH Oxidasa 5 se han realizado las siguientes variaciones:

1. Centrifugación previa de las células a 900 x g durante 6 minutos antes de la extracción de proteínas para eliminar el medio y aumentar la concentración de proteínas obtenidas.
2. Dado que los resultados de inmunofluorescencia indirecta sugerían que NOX5 se encontraba en muy bajas cantidades en las células, se cargaron 50 µl de muestra de proteínas en la electroforesis en vez de los 20 µl habituales en espermatozoides ovinos.
3. Se probaron dos diluciones del anticuerpo primario (1:500 y 1:400) y se determinó que los mejores resultados se obtenían cuando se aplicaba la mayor de las concentraciones.
4. Se probó a conservar las proteínas extraídas a -80 y a -20 °C, optándose por la temperatura de -20 °C ya que a -80 °C la muestra se perdía al poco de ser congelada. Esto parece indicar que la NOX5 es sensible a temperaturas muy bajas.

Gracias a la optimización del protocolo de Western Blot se corroboró la identificación de NOX5 en espermatozoide ovino, que habíamos visualizado previamente mediante IFI. En el Western Blot se identifica una banda de aproximadamente 85 kDa (**Figura 8**), compatible con el peso molecular de NOX5. Además, se observan otras bandas de pesos moleculares de 45 kDa, 30 kDa, 15 kDa, que son demasiado pequeñas como para pertenecer a las distintas isoformas de la NOX5, ya que todas tienen pesos moleculares entre 83 y 86 kDa, salvo NOX5S, que está en torno a 64 kDa (UniProtKB - Q96PH1). Además, bandas similares aparecen también en el Western Blot de espermatozoides equinos (9), y en este caso, los autores las identificaron como resultado de procesos proteolíticos.

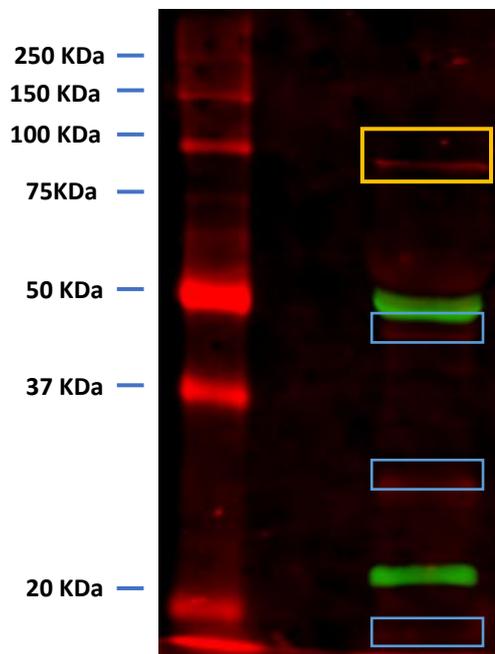


Figura 8. Imagen representativa de Western Blot para la identificación de la NOX5, utilizando un anticuerpo anti-NOX5 en proteínas de espermatozoides ovinos. En el carril de la izquierda se muestra el marcador de pesos moleculares y, en el de la derecha la muestra Swim-up. Recuadrado en naranja se muestra la proteína identificada como NOX5, de un peso molecular aproximado de 85

kDa. Recaudado en azul las bandas de aproximadamente 45 kDa, 30 kDa, 15 kDa. En verde se observa el control de carga (alfa-tubulina).

6.2. Efecto de la melatonina sobre NOX5 en espermatozoides ovinos

Una vez identificada la presencia de NOX5 en espermatozoides ovinos, se evaluó el posible efecto de la melatonina sobre esta enzima en condiciones capacitantes.

6.2.1 Evaluación de la motilidad y viabilidad espermática

Para determinar la calidad de los espermatozoides tras la incubación se evaluó su motilidad y viabilidad. Los resultados indicaron que tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes se produce un descenso de la motilidad total y la motilidad progresiva en todas las muestras estudiadas, con diferencias estadísticamente significativas con respecto a la muestra *Swim-up* (**tabla 1**). Además, la muestra Cocktail-1 μ M melatonina presentó mayor porcentaje de espermatozoides móviles progresivos ($P < 0,01$) que su control (muestra Cocktail), lo que indicaría una menor hiperactivación y por tanto una menor capacitación de la muestra incubada con melatonina, como ocurría en trabajos previos de nuestro grupo (32).

Tabla 1. Porcentaje de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y viables antes de la capacitación (*Swim-up*) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂) en medio TALP (TALP), en medio TALP con alto cAMP (Cocktail) y con 1 μ M de melatonina añadida al medio TALP (TALP-1 μ M) y Cocktail (Cocktail -1 μ M). Los resultados se muestran como media \pm EEM ($n = 6$). Se muestran las diferencias significativas con respecto al *Swim-up*: *** $P < 0,001$, y entre los dos tratamientos con y sin melatonina: ●● $P < 0,01$

	<i>Swim up</i>	TALP	TALP -1 μ M	Cocktail	Cocktail -1 μ M
Motilidad total (%)	90,67 \pm 1,69	81,00 \pm 3,82***	82,00 \pm 7,36***	87,25 \pm 4,50	83,00 \pm 3,86***
Motilidad progresiva (%)	46,83 \pm 3,85	33,60 \pm 3,43***	35,00 \pm 1,87***	24,75 \pm 3,15***	35,00 \pm 1,78***●●
Viabilidad (%)	81,69 \pm 2,27	67,96 \pm 3,04***	66,17 \pm 3,57***	71,82 \pm 3,00***	69,59 \pm 2,61***

En cuanto a los resultados de viabilidad, la incubación en condiciones capacitantes provoca una disminución de la viabilidad con respecto a la muestra *Swim-up*, pero sin diferencias significativas entre el resto de grupos experimentales (**Tabla 1**) por lo que la viabilidad no se vería influida por el tipo de tratamiento empleado. Estos resultados también son similares a los obtenidos por nuestro grupo en estudios anteriores (32).

6.2.2 Evaluación del estado de capacitación

En cuanto al estado de capacitación (**Figura 9**), tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes la muestra Cocktail presenta un porcentaje de espermatozoides capacitados significativamente superior a la muestra *Swim-up* y a la muestra TALP, incubada sin sustancias elevadoras de cAMP (68,00 \pm 3,4 %, frente a 14,00 \pm 2,43% y 21,33 \pm 4,61%, para Cocktail, *Swim up* y TALP, respectivamente; $P < 0,0001$ y $P < 0,0001$). A su vez, la incubación en medio TALP también

produjo un aumento de espermatozoides capacitados con respecto al *Swim-up* ($P < 0,01$), pero en niveles inferiores a los obtenidos con el medio Cocktail. Los resultados obtenidos concuerdan con resultados previos de nuestro grupo, donde se indica que para que se produzca la capacitación en los espermatozoides ovinos son necesarias sustancias que eleven los niveles de cAMP en el medio intracelular (39)

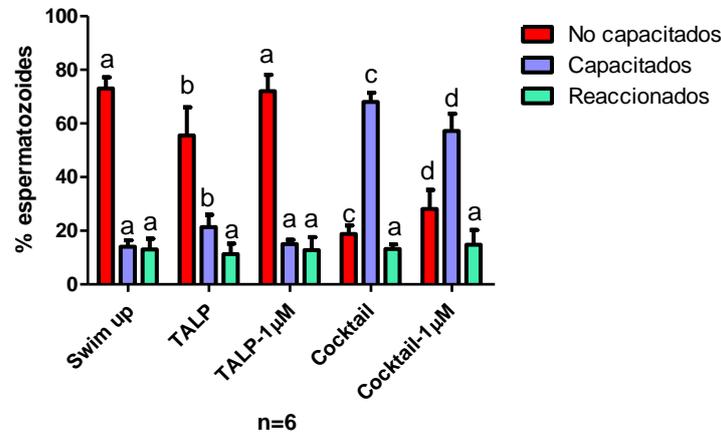


Figura 9. Porcentaje de espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados evaluados mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC), antes de la capacitación (*swim-up*) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes ($39\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 5% de CO_2) en medio TALP, con alto cAMP (Cocktail) y con $1\text{ }\mu\text{M}$ de melatonina añadida al medio TALP (TALP- $1\text{ }\mu\text{M}$) y Cocktail (Cocktail- $1\text{ }\mu\text{M}$). Los valores se representan como media \pm EEM ($n=6$). Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos experimentales ($P < 0,05$)

Además, la adición de melatonina $1\text{ }\mu\text{M}$ tanto al medio TALP como al Cocktail aumentó significativamente el porcentaje de espermatozoides no capacitados en ambos casos, llegando incluso, en el grupo TALP- $1\text{ }\mu\text{M}$ a mantener a los espermatozoides en las mismas condiciones de capacitación que se observan para el *Swim-up* (Figura 9). Estos resultados corroboran los obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación sobre el efecto descapacitante de la melatonina a concentración $1\text{ }\mu\text{M}$ en el espermatozoide ovino tanto en medios con bajo como con alto cAMP (30,32).

6.2.3 Evaluación de la presencia de especies reactivas de oxígeno

Dado que NOX5 es un enzima generadora de especies reactivas de oxígeno, se evaluaron los niveles de ROS intracelular al final de la incubación. La incubación en condiciones capacitantes produjo una disminución estadísticamente significativa en los niveles de espermatozoides viables con bajos niveles ROS al comparar todas las muestras con el *Swim up* (Figura 10), ya que unos niveles adecuados de ROS son necesarios para la capacitación espermática (42). Además la inclusión de melatonina produjo un aumento significativo de espermatozoides con bajo ROS en el medio TALP ($64,20 \pm 2,08\%$ vs. $59,03 \pm 4,36\%$ para TALP- $1\text{ }\mu\text{M}$ y TALP, respectivamente, $P < 0,05$), pero no en medio Cocktail. Este diferente efecto de la melatonina sobre los niveles de ROS en función del medio podría deberse a que el medio TALP carece de sustancias elevadores del cAMP que faciliten la capacitación, y que podrían poner en marcha mecanismos de producción de ROS sobre los que no actuaría la melatonina (32). Es decir, que la melatonina sólo parece actuar sobre los niveles de ROS en medios con bajo cAMP.

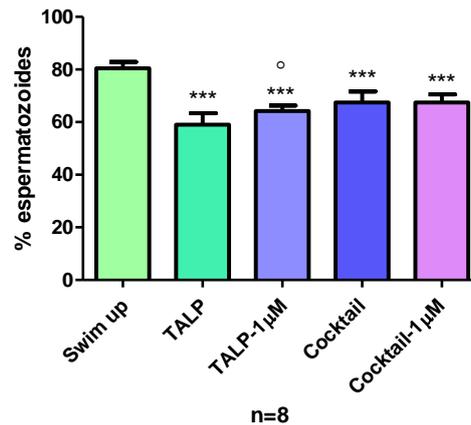


Figura 10. Porcentaje de espermatozoides viables con bajos niveles de ROS (PI-/ H₂DCFDA +) antes de la capacitación (Swim-up) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂) en medio TALP, con alto cAMP (Cocktail) y con 1µM de melatonina añadida al medio TALP (TALP-1µM) y Cocktail (Cocktail-1µM). Los valores se representan como media ± EEM (n=8). Se muestran las diferencias significativas con respecto al Swim-up: *** P < 0,001, y entre los dos tratamientos (medio TALP y alto cAMP) con y sin melatonina: ° P<0,05

6.2.4. Efecto de la melatonina sobre la distribución de NOX5

El análisis de la distribución de NOX5 en el espermatozoide ovino reveló que en la muestra *Swim-up*, antes de la capacitación, esta enzima se localizaba principalmente en la zona apical y acrosomal (**Figura 11**). La incubación en medio TALP produjo un cambio en la distribución de NOX5, con una disminución de los inmunotipos apical, acrosomal y en la pieza intermedia, a la vez que aumentaron los inmunotipos postacrosomal y acrosomal + postacrosomal con respecto al *Swim-up* (P<0,05). A su vez, la incubación en medio Cocktail produjo una redistribución de NOX5 distinta a la observada en medio TALP, con un aumento de los inmunotipos apical, post-acrosomal y en pieza intermedia, y una disminución del inmunotipo acrosomal + postacrosomal con respecto a la muestra *Swim-up*.

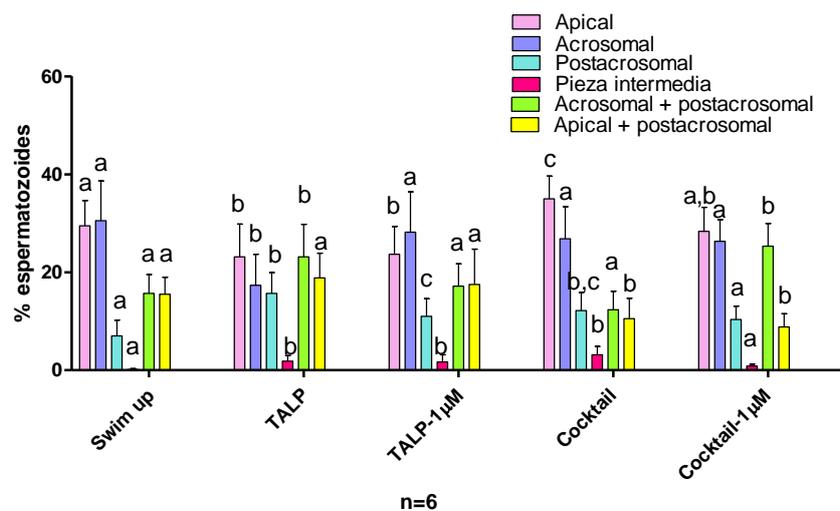


Figura 11. Porcentaje de los diferentes inmunotipos detectados para la distribución del enzima NOX5 en las muestras espermáticas antes de la capacitación (Swim-up) y tras 3 horas de incubación en

condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂) en medio TALP, con alto cAMP (Cocktail) y con 1 μM de melatonina añadida al medio TALP (TALP 1μM) y Cocktail (Cocktail 1μM). Los valores se representan como media ± EEM (n=6). Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras (P<0,05).

Al añadir melatonina tanto a la muestra TALP como a la Cocktail, la distribución de inmunotipos se revierte parcialmente a la situación inicial. De esta forma en la muestra TALP-1 μM se observó una disminución del inmunotipo acrosomal + postacrosomal y un aumento del acrosomal hasta niveles comparables a los del *Swim-up*, y significativamente distintos a los de TALP (P<0,05), mientras que en la muestra Cocktail-1μM, aunque presenta los mayores porcentajes del inmunotipo acrosomal + post-acrosomal, también se revierten los niveles de los inmunotipos apical, pieza intermedia, acrosomal y post-acrosomal a niveles similares a los de la muestra *Swim-up*, y significativamente diferentes a su control (Cocktail, P<0,05).

Además, el análisis de correlación mediante el test de Spearman entre el estado de capacitación espermática y la distribución de NOX5 reveló una correlación positiva entre espermatozoides capacitados y aquellos marcados únicamente en la pieza intermedia para NOX5 (r=0,411 y P<0,05) y entre los reaccionados y el inmunotipo apical (r=0,505 y P<0,01), lo que sugiere que NOX5 podría estar implicada en la capacitación del espermatozoide ovino.

6.2.5. Análisis densitométrico de NOX5 mediante Western Blot

Se realizó la cuantificación de la NOX5 entre los distintos grupos experimentales para evaluar el posible efecto de la melatonina sobre los niveles de NOX5 (Figura 12).

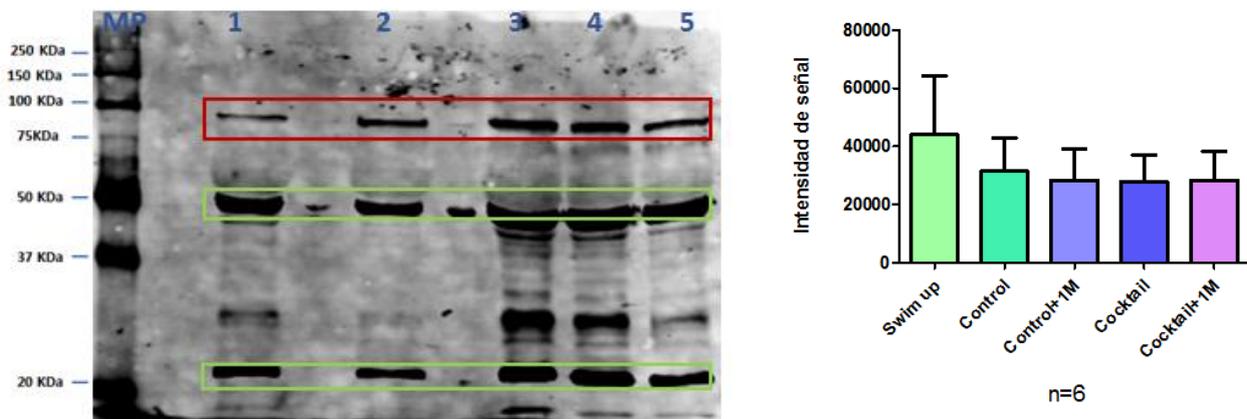


Figura 12. A. Imagen de Western Blot representativo de la identificación de la NOX5, utilizando un anticuerpo anti-NOX5 en proteínas espermáticas ovinas antes de la capacitación (*Swim-up*, carril 1) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂) con medio TALP (carril 2), medio TALP-1μM de melatonina (carril 3), Cocktail (carril 4) y Cocktail-1μM de melatonina (carril 5). Marcado en rojo se muestra la proteína identificada como NOX5, de un peso molecular aproximado de 85 kDa. Recuadrado en verde, el control de carga de tubulina que en ovino presenta 2 bandas de 55 y 25 kDa. **B.** Cuantificación por densitometría de los niveles de NOX5 antes de la capacitación (*Swim-up*) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂) en medio TALP (TALP), con alto cAMP (Cocktail) y con 1 μM de melatonina añadida al medio TALP (TALP 1μM) y Cocktail (Cocktail-1μM). Los valores se representan como media ± EEM (n=6).

A pesar de las diferencias observadas previamente en la distribución de NOX5, estos resultados demostraron que ni la presencia de melatonina ni el medio de incubación afectaron a los niveles de

esta enzima en el espermatozoide ovino en condiciones capacitantes. Algunos estudios en células somáticas (45) indican que el calcio podría activar la sobreexpresión del enzima, así como provocar un cambio conformacional que la active; sin embargo, esto no parece ser el caso del espermatozoide ovino, ya que tanto el medio TALP como el Cocktail contienen altos niveles de calcio y no se han observado diferencias significativas ni en los niveles de ROS ni en los de NOX5.

En estudios posteriores, sería interesante evaluar las diferencias en la actividad enzimática de NOX5 para los diferentes tratamientos, ya que aunque sus niveles sean similares puede que en algunos casos su actividad sea mayor que en otros. Sin embargo, los niveles de ROS evaluados sugieren que su actividad no variaría en exceso o se vería enmascarada por otras fuentes productoras de especies reactivas de oxígeno más importantes, lo que implicaría que la enzima NOX5 tal vez no sea la principal fuente de especies reactivas de oxígeno en el espermatozoide ovino.

7. CONCLUSIONES

- La enzima NOX5 está presente en el espermatozoide ovino, en el que se identifican hasta 6 inmunotipos distintos.
- La incubación en condiciones capacitantes modifica en el porcentaje de los distintos inmunotipos para NOX5 con respecto a la muestra *Swim-up*, mientras que la incubación con melatonina revierte estos porcentajes a niveles similares a los de la muestra inicial.
- Hay una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides capacitados y la presencia de NOX5 únicamente en la pieza intermedia y entre los reaccionados y el inmunotipo apical.
- A pesar de las diferencias en la distribución de NOX5, la incubación con melatonina no afecta a los niveles de esta enzima cuantificados mediante Western Blot
- La melatonina a concentración 1 μM en medio TALP aumenta el porcentaje de espermatozoides vivos con bajos niveles de ROS con respecto al control TALP.
- El efecto de la melatonina sobre NOX5 en el espermatozoide ovino no parece estar relacionado con su efecto sobre los niveles de ROS

7. CONCLUSIONS

- NOX5 is present in ram spermatozoa, with 6 different immunotypes.
- Incubation in capacitating conditions modifies the percentage of the different NOX5 immunotypes compared to the *Swim-up* sample, whereas the incubation with melatonin reverts these percentages to those present in the initial sample.
- There is a positive correlation between the rate of capacitated spermatozoa and the presence of NOX5 in the middle piece, and between reacted spermatozoa and apical immunotype.
- Despite the NOX5 distribution differences found by IIF, incubation with melatonin does not affect NOX5 levels quantified by Western Blot.
- Melatonin 1 μM in TALP medium significantly increases the percentage of viable spermatozoa with low ROS levels when compared to TALP.
- Melatonin effect on NOX5 is probably not related to its effect on ROS levels

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Vatannejad A, Tavilani H, Sadeghi MR, Karimi M, Lakpour N, Amanpour S, et al. Evaluation of the NOX5 protein expression and oxidative stress in sperm from asthenozoospermic men compared to normozoospermic men. *J Endocrinol Invest*. 8 de abril de 2019
2. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol [Internet]*. 15 de octubre de 2003;552(Pt 2):335-44.
3. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl*. junio de 1993;16(3):183-8.
4. Yanagimachi R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote Camb Engl*. noviembre de 1994;2(4):371-2.
5. Brewis IA, Boerke A, Tsai P, Gadella BM. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol*. 1 de septiembre de 2004;52(5-6):473-80.
6. Gangwar D, Atreja S. Signalling Events and Associated Pathways Related to the Mammalian Sperm Capacitation. *Reprod Domest Anim*. octubre de 2015;50(5):705-11.
7. Baker MA, Aitken RJ. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol*. marzo de 2004;216(1-2):47-54.
8. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell*. 25 de febrero de 2005;120(4):483-95.
9. Sabeur K, Ball B. Characterisation of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. *Reprod Camb Engl*. 1 de septiembre de 2007;134:263-70.
10. Pandey D, Patel A, Patel V, Chen F, Qian J, Wang Y, et al. Expression and functional significance of NADPH oxidase 5 (Nox5) and its splice variants in human blood vessels. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. 15 de mayo de 2012;302(10):H1919-28.
11. Musset B, Clark RA, DeCoursey TE, Petheo GL, Geiszt M, Chen Y, et al. NOX5 in Human Spermatozoa. *J Biol Chem*. 16 de marzo de 2012;287(12):9376-88.
12. Bedard K, Jaquet V, Krause K-H. NOX5: from basic biology to signaling and disease. *Free Radic Biol Med*. febrero de 2012;52(4):725-34.
13. Touyz RM, Anagnostopoulou A, Rios F, Montezano AC, Camargo LL. NOX5: Molecular biology and pathophysiology. *Exp Physiol*. 1 de mayo de 2019;104(5):605-16.
14. Setyawan EMN, Kim MJ, Oh HJ, Kim GA, Jo YK, Lee SH, et al. Spermine reduces reactive oxygen species levels and decreases cryocapacitation in canine sperm cryopreservation. *Biochem Biophys Res Commun*. 28 de octubre de 2016;479(4):927-32.
15. Ghani E, Keshtgar S, Habibagahi M, Ghannadi A, Kazeroni M. Expression of NOX5 in human teratozoospermia compared to normozoospermia. *Andrologia*. 2013;45(5):351-6.
16. Fulton DJR. Nox5 and the Regulation of Cellular Function. *Antioxid Redox Signal*. 30 de marzo de 2009;11(10):2443-52.

17. Kawahara T, Jackson HM, Smith SME, Simpson PD, Lambeth JD. Nox5 forms a functional oligomer mediated by self-association of its dehydrogenase domain. *Biochemistry*. 29 de marzo de 2011;50(12):2013-25.
18. Prior K-K, Leisegang MS, Josipovic I, Löwe O, Shah AM, Weissmann N, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of p22phox leads to loss of Nox1 and Nox4, but not Nox5 activity. *Redox Biol* [Internet]. octubre de 2016;9:287-95.
19. Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med*. 1 de agosto de 2007;43(3):319-31.
20. Casao A, Pérez-Pé R, Abecia JA, Forcada F, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JÁ. 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*. 1 de mayo de 2013;138(3):168-74.
21. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev*. mayo de 1991;12(2):151-80.
22. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci CMLS*. agosto de 2014;71(16):2997-3025.
23. González-Arto M, Vicente-Carrillo A, Martínez-Pastor F, Fernández-Alegre E, Roca J, Miró J, et al. Melatonin receptors MT1 and MT2 are expressed in spermatozoa from several seasonal and nonseasonal breeder species. *Theriogenology*. noviembre de 2016;86(8):1958-68.
24. Casao A, Cebrián I, Asumpção ME, Pérez-Pé R, Abecia JA, Forcada F, et al. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 11 de junio de 2010;8:59.
25. Kvetnoy IM. Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem J*. enero de 1999;31(1):1-12.
26. Turek FW. Effect of melatonin on photic-independent and photic-dependent testicular growth in juvenile and adult male golden hamsters. *Biol Reprod*. junio de 1979;20(5):1119-22.
27. Chemineau P, Guillaume D, Migaud M, Thiéry JC, Pellicer-Rubio MT, Malpoux B. Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reprod Domest Anim Zuchthyg*. julio de 2008;43 Suppl 2:40-7.
28. Cebrián-Pérez J, Casao A, González-Arto M, dos Santos Hamilton T, Pérez-Pé R, Muiño-Blanco T. Melatonin in Sperm Biology: Breaking Paradigms. *Reprod Domest Anim*. octubre de 2014;49:11-21.
29. Jang HY, Kim YH, Kim BW, Park IC, Cheong HT, Kim JT, et al. Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Reprod Domest Anim Zuchthyg*. diciembre de 2010;45(6):943-50.
30. Casao A, Mendoza N, Pérez-Pé R, Grasa P, Abecia J-A, Forcada F, et al. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *J Pineal Res*. enero de 2010;48(1):39-46.

31. Sarabia L, Maurer I, Bustos-Obregón E. Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. *Ecotoxicol Environ Saf.* febrero de 2009;72(2):663-8.
32. Gimeno-Martos S, Casao A, Yeste M, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Pérez-Pé R. Melatonin reduces cAMP-stimulated capacitation of ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* enero de 2019;31(2):420-31.
33. Patiño P, Parada E, Farré-Alins V, Molz S, Cacabelos R, Marco-Contelles J, et al. Melatonin protects against oxygen and glucose deprivation by decreasing extracellular glutamate and Nox-derived ROS in rat hippocampal slices. *NeuroToxicology.* 1 de diciembre de 2016;57:61-8.
34. Ollero M, Pascual ML, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA, López-Pérez MJ. Revealing surface changes associated with maturation of ram spermatozoa by centrifugal counter-current distribution in an aqueous two-phase system. *J Chromatogr A.* 6 de mayo de 1994;668(1):173-8.
35. García-López N, Ollero M, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. 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.* 17 de mayo de 1996;680(1-2):137-43.
36. Mortimer D. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reprod Fertil Dev.* 1994;6(1):25-31.
37. Grasa P, Pérez-Pé R, Báguena O, Forcada F, Abecia A, Cebrián-Pérez JA, et al. Ram sperm selection by a dextran/swim-up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes. *J Androl.* diciembre de 2004;25(6):982-90.
38. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin. *Biol Reprod.* 1 de junio de 1988;38(5):1171-80.
39. Colas C, James P, Howes L, Jones R, Cebrian-Perez JA, Muiño-Blanco T. Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation. *Reprod Fertil Dev.* 2008;20(6):649-58.
40. Harrison RA, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil.* enero de 1990;88(1):343-52.
41. Guthrie HD, Welch GR. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci.* 1 de agosto de 2006;84(8):2089-100.
42. Grasa P, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reprod Camb Engl.* noviembre de 2006;132(5):721-32.
43. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 15 de agosto de 1970;227(5259):680-5.
44. *Molecular and Cellular Methods in Developmental Toxicology* [Internet]. CRC Press.
45. Chen F, Wang Y, Barman S, Fulton DJR. Enzymatic regulation and functional relevance of NOX5. *Curr Pharm Des.* 2015;21(41):5999-6008.

9.ANEXOS

Abstract of Contribution 194

ID: **194**
Physiology and Reproduction in male semen technology
Student competition

Keywords: ram sperm, NADPH oxidase, melatonin

Identification and localization of NADPH oxidase 5 in ram spermatozoa

Silvia Gimeno-Martos, Blanca Pina-Beltrán, Adriana Casao, Jose A. Cebrián-Pérez, Teresa Muiño-Blanco, Rosaura Pérez-Pé

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Celular (BIOFITER). Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA). Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza; silvigima8@gmail.com

The aim of this study was to identify the presence of NADPH oxidase 5 (NOX5) in ram spermatozoa and to investigate if melatonin could modulate this enzyme during *in vitro* capacitation. Semen from nine *Rasa Aragonesa* rams was collected and pooled. Seminal plasma free spermatozoa were selected by a swim-up procedure (control sample). Spermatozoa were then incubated in TALP medium without (TALP sample) or with cAMP-elevating agents (cocktail sample, Ck) for 3 h at 39 °C and 5% CO₂. 1 μM melatonin was added to TALP and cocktail samples (TALP-Mel and Ck-Mel) (n=6). Capacitation status was evaluated by chlortetracycline (CTC) staining. Identification and distribution of NOX5 in ram spermatozoa was investigated by western-blot and indirect immunofluorescence (IIF) with the anti- rabbit NOX5 C-terminal antibody (ab191010, Abcam, Cambridge, UK). At least 200 spermatozoa were scored per sample in CTC and IIF assays. Differences between experimental groups in CTC staining and NOX5 immunolabeling were compared by means of chi-square test using GraphPad InStat software (Version 3.01).

As expected, the inclusion of cAMP-elevating agents in the cocktail sample increased the capacitated-sperm pattern by CTC compared with TALP sample after *in vitro* capacitation (p< 0.001), whereas the presence of melatonin at 1 μM in both samples increased the non-capacitated-pattern relative to samples without hormone (p<0.001). Regarding the presence of NOX5 in ram spermatozoa, Western blot analyses revealed a band of 86 kDa compatible with that reported to NOX5 in human (Musset et al., The journal of biological chemistry, 287: 9376-9383,2012) and equine (Sabeur and Ball, Reproduction 134:263-270, 2007) spermatozoa. IIF revealed six differences immunotypes depending on the presence of NOX5 in the ram sperm: I: apical region II: acrosome, III: post-acrosome, IV: apical and post-acrosomal, V: acrosome and post-acrosome (all subtypes with midpiece labelling) and VI: labelling in the midpiece of the spermatozoa. In swim-up selected (control) ram spermatozoa, the predominant NOX5 immunotypes were I and II. After incubation in capacitating conditions, these immunotypes decreased in TALP samples and increased those III and V (p< 0.001) when compared to control. In cocktail samples, there was also an increase in the rate of spermatozoa with labelling only in the midpiece of the flagellum (type VI, p<0.001). However, the presence of melatonin in TALP medium (TALP-Mel) increased II subtype and in cocktail sample (Ck-Mel) increased V immunotype (p< 0.001), spermatozoa presented a NOX5 distribution very similar to that observed control and TALP samples respectively.

In conclusion, these preliminary results reveal for the first time that NOX5 is present in ram spermatozoa, and that melatonin can prevent the NOX5 distribution changes associated with sperm capacitation.

Acknowledgements: AGL2017-83799-R, DGA-A07_17R, BES-2015-07203, red PIVEV AGL2016-81890-REDT.