EFECTOS DE LA MELATONINA SOBRE LA CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CIERVO ROJO IBÉRICO

Fernández-Alegre[1], E., Álvarez-Fernández[1], I., González-Hidalgo[1], S., Salman[1], A., y Martínez-Pastor[1], F.
[1]INDEGSAL, Universidad de León, 24071 León, España.
felipe.martinez@unileon.es

INTRODUCCIÓN

La melatonina es una hormona ampliamente distribuida en los seres vivos que regula múltiples funciones fisiológicas y neuroendocrinas. Es producida principalmente y de forma circadiana por la glándula pineal (Rosa et al., 2012), aunque también es producida por otros tejidos extrapineales (Kvetnoy, 2002). La melatonina tiene un papel importante en la reproducción masculina, con influencia directa en los niveles de testosterona y la calidad espermática (Li y Zhou, 2015), e influye en las diferencias de calidad espermática entre las épocas reproductiva y no reproductiva de las especies estacionales (Palacin et al. 2008). Se ha comprobado que está relacionada con el incremento de motilidad espermática progresiva (Casao, Vega et al., 2010), disminuye los daños apoptóticos y modula la capacitación espermática (Casao, Mendoza et al., 2010). La hipótesis de una acción directa de la melatonina sobre los espermatozoides, está apoyada por la presencia de los receptores de membrana para esta hormona MT1 y MT2 en espermatozoides de varias especies animales domésticas y en ciervo (González-Arto et al., 2016). La capacitación es un proceso complejo, que implica cambios en la membrana plasmática, movimiento de calcio (Lishko et al., 2011), así como reacción acrosómica y la capacidad para fecundar el ovulo (González-Arto et al., 2014). El fin del presente estudio es comprobar la influencia directa de la melatonina sobre los principales parámetros fisiológicos de los espermatozoides de ciervo rojo ibérico *(Cervus elaphus hispanicus*) en condiciones capacitantes y no capacitantes.

MATERIAL Y METODOS

Los reactivos generales fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.), y los fluorocromos fueron comprados a Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.). Utilizamos muestras epididimarias criopreservadas de cinco ciervos, diluidas en TALP-Hepes (sin glucosa ni heparina) a $50 \cdot 10^6$ ml^{-1}. El experimento está orientado a estudiar los cambios en la capacitación espermática debidos a la presencia de melatonina. Las muestras se incubaron en medio capacitante (TALP-Hepes con heparina 2 U/ml) y no capacitante (TALP-Hepes sin heparina), durante 4 h a 39 °C y 5% CO_2, con melatonina (1 µM, 10 nM, 100 pM, 1 pM) y sin la hormona. Las muestras fueron analizadas antes y después de la incubación con cada tratamiento, mediante citometría de flujo. Se utilizaron las sondas YO-PRO-1 (100 nM), ioduro de propidio (IP, 3 µM), Mitotracker deep red (100 nM), Fluo4 (100 nM), PNA-FITC (1 µg/ml), merocianina 540 (2 µM), mitoSOX (1 µM), CM-H_2DCFDA (5 µM) y Hoechst 33342 (5 µM), incubando 15 min a 39 °C. Para estudiar los cambios de la concentración de calcio intracelular, se incluyó un tratamiento con ionóforo de Ca^{2+} (3 µM 10 min) para todos los tubos. El análisis se realizó con un citómetro CyAn ADP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), provisto de tres láser de diodo (405 nm, violeta; 488 nm, azul; 635 nm, rojo). Los datos se analizaron con el paquete estadístico R (http://www.r-project.org) mediante modelos lineares de efectos mixtos. Los resultados se muestran como media±e.e.m. (error estándar de la media).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados más relevantes se muestran en la Tabla 1. Tras 4 horas de incubación se observó una disminución significativa en la viabilidad espermática, (IP y YO-PRO-1). La concentración intracelular de Ca^{2+} en los espermatozoides viables ($[Ca^{2+}]_i$) se incrementó significativamente tras la incubación, independientemente de la presencia de heparina. La misma dinámica se observó tras añadir ionóforo de Ca^{2+} (ión-$[Ca^{2+}]_i$), aunque el aumento de Ca^{2+} en las muestras incubadas con heparina fue menor (17,08±0,84) que en las incubadas sin heparina (19±3,78; P=0,01). La proporción de c alcio celular (%$[Ca^{2+}]_i$: $[Ca^{2+}]_i$/ión-$[Ca^{2+}]_i$)×100) fue mayor (P<0,05) en las muestras incubadas en condiciones capacitantes (50,32%±3,6) que las incubadas sin heparina (40,66%±7,74). También se observaron diferencias en los acrosomas dañados entre las muestras con heparina (27,16%±1,5) y sin

heparina (18,69%±9.3, P<0,001). Tras incubar se detectó un aumento de los espermatozoides capacitados, siendo mayor al incubar con heparina (0,63%±1,1 antes de incubar, 2,16%±0,70 sin heparina, 2,58%±0,26 con heparina; P=0,001).
Dentro de la población espermática viable, detectamos una disminución de los niveles del ión superóxido (MitoSOX) y de las especies reactivas del oxígeno (ROS, principalmente peróxido, CM-H_2DCFDA) en casi todos los tratamientos que contenían melatonina. El efecto fue más pronunciado en las concentraciones de melatonina 1 pM y 1 µM. La melatonina reduce los niveles de estrés oxidativo del medio intra y extracelular gracias a su capacidad de eliminar radicales libres (Reither et al., 2000). No obstante, es más plausible que el efecto a las concentraciones más bajas (pM) pueda deberse a la unión a los receptores de membrana MT1 y MT2, que podrían estimular vías de señalización, resultando en una menor producción de ROS. Los ROS, en concentraciones relativamente bajas, actúan como mensajeros secundarios en varios procesos fisiológicos, entre ellos la capacitación (DeLamirande y Gagnon, 1984), por lo que la modulación de sus niveles podría tener efectos sobre este proceso.
Asimismo, la melatonina podría modular la capacitación actuando sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+}. El calcio y el bicarbonato son moléculas clave en el inicio de la capacitación y en la reacción acrosómica del espermatozoide (Grasa et al., 2006), y en este estudio hemos detectado un posible efecto de la melatonina sobre los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ y ión-$[Ca^{2+}]_i$, principalmente de 1 pM y 1 µM, aunque no así sobre %$[Ca^{2+}]_i$.
En paralelo con los resultados de ROS y Ca^{2+}, la menor respuesta a la capacitación apareció en los tratamientos con 1 µM y 1 pM, mientras que, solo en la incubación con heparina, 100 pM y 10 nM incrementaron ligeramente la respuesta. En otros estudios realizados con espermatozoides de caballo, la incubación con melatonina a 1 µM presentó efectos protectores, mientras que los efectos capacitantes aparecieron con 200 pM y 50 pM (Da Silva, et al., 2011). Casao et al. (2014) observaron que la capacitación decrecía en espermatozoides de ovino a 1 µM, pero se incrementaba a 100 pM, en cierto modo de manera similar a lo observado en nuestro estudio.
En conclusión, en los espermatozoides epididimarios de ciervo rojo ibérico las concentraciones de melatonina de 1 pM y 1 µM produjeron los efectos más evidentes durante la incubación. Teniendo en cuenta estudios anteriores, es posible que los efectos en el rango pM se deban a la acción sobre los receptores de membrana, mientras que los efectos de 1 µM se deban a la acción antioxidante de la melatonina. Los efectos en las concentraciones intermedias podrían deberse a hiperestimulación de los receptores de membrana o de otros receptores, sin un efecto antioxidante directo como compensación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Casao, A., Mendoza, N., Perez-Pe, R., Grasa, P., Abecia, J. A., Forcada, F., Cebrián-Perez, J. A. & Muiño-Blanco, T. 2010. J Pineal Res 48:39-46. • Casao, A., Vega, S., Palacin, I., Perez-Pe, R., Lavina, A., Quintin, F. J., Sevilla, E., Abecia, J. A., Cebrián-Perez, J. A., Forcada, F. & Muiño-Blanco, T. 2010. Reprod Domest Anim 45:425-432. • Da Silva, C. M., Macías-García, B., Miró-Morán, A., González-Fernández, L., Morillo-Rodriguez, A., Ortega-Ferrusola, C., Gallardo-Bolaños, J. M., Stilwell, G., Tapia, J. A. & Peña, F. J. 2011. J Pineal Res 51(2):172-179. • DeLamirande, E. & Gagnon, C. 1984. J Androl 5, 269–276. • Grasa, P., Cebrian-Perez, J. A. & Muino-Blanco T. 2006. Reproduction 132:721-732. • González-Arto, M., Luna, C., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A. & Casao, A. 2014. Reproduction, Fertility and Development. • 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., Cebrián-Pérez, J. A. & Casao, A. 2016. Theriogenology 86:1958-1968. • Kvetnoy I. 2002. Neuro Endocrinol Lett 23(1):92–6. • Li, C. & Zhou, X. 2015. Clin Chim Acta 446:175-80. • Lishko, P. V., Botchkina, I. L., and Kirichok, Y. 2011. Nature 471:387-391. • Palacin, I., Abecia, J. A., Forcada, F., Casao, A., Cebrian, J. A., Muino, T., Palacios, C. & Pontes, J. M. 2008. Italian J Anim Sci 7:199-206. • Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C. & Gitto, E. 2000. J Biomed Sci 7:444-458. • Rosa, H. J. D., Silva, C. C. & Bryant, M. J. 2012. Small Rumin Res 102:197-201.

Agradecimientos: Los autores agradecen a los celadores de la Reserva de Caza de Riaño por su ayuda en la recogida de las muestras de ciervo.

Tabla 1. *Efectos de los tratamientos según el modelo estadístico. Media del control (tiempo 0)±e.e.m. y tamaño del efecto±e.e.m. (diferencia control-tratamiento tras 4 h de incubación con y sin heparina) para los principales parámetros estudiados (excepto para ACR, en espermatozoides viables): ión superóxido, ROS, Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), $[Ca^{2+}]_i$ tras exposición al ionóforo (ión-$[Ca^{2+}]_i$), %$[Ca^{2+}]_i$ ($[Ca^{2+}]_i$/ión-$[Ca^{2+}]_i$)×100), capacitación y espermatozoides con acrosomas reaccionados o dañados (ACR). Todos los números son % excepto ROS, $[Ca^{2+}]_i$ e ión-$[Ca^{2+}]_i$ (MFI, mediana de la intensidad de la fluorescencia de CM-H_2DCFDA o Fluo4). Los asteriscos indican el nivel de significación de cada efecto: (*) P<0,05; (**) P<0,001.*

Tratamiento/[melatonina]	Superóxido	ROS	$[Ca^{2+}]_i$	Ión-$[Ca^{2+}]_i$	%$[Ca^{2+}]_i$	Capacitados	ACR
Control 0 M	1,07±0,22	4,5±0,42	5,02±0,90	11,62±2,18	50,28±3,53	0,62±1,12	3,44±8,52
Incubación sin heparina							
0 M	-0,17	-0,66	1,86*	7,32*	-11,85	1,52*	16,42**
1 pM	-0,44**	-0,86*	2,20*	6,82*	-3,36	0,74*	13,85*
100 pM	-0,44**	-0,62	1,92*	5,66*	-7,15	1,06*	12,95*
10 nM	-0,26**	-0,52	2,24*	7,96*	-12,86	1,18*	16,82**
1 µM	-0,42**	-0,54	2,48*	9,98*	-15,33	0,76*	16,23**
e.e.m.	± 0,17	± 0,37	± 0,66	± 2,19	± 6,95	± 0,64	± 4,99
Incubación con heparina							
0 M	-0,26	-0,70*	1,80*	5,40*	-3,87	1,94*	24,37**
1 pM	-0,61*	-0,70*	2,41*	7,52*	-4,65	1,57*	26,81**
100 pM	-0,60*	-0,64*	2,18*	5,08*	0,44	2,15*	24,84**
10 nM	-0,44	-0,70*	1,98*	5,28*	-1,83	2,14*	20,69**
1 µM	-0,52*	-0,76*	1,60*	4,04	8,58	1,80*	23,45**
e.e.m.	± 0,26	± 0,28	± 0,63	± 1,83	± 6,82	± 0,95	± 6,50

MELATONIN EFFECTS ON CAPACITATION OF RED DEER SPERMATOZOA

ABSTRACT: Melatonin plays an important role in male reproduction, including sperm quality (Li y Zhou, 2015). In this study, we investigate the hypothesis that in vitro treatment with melatonin affects red deer sperm quality and capacitation. Cryopreserved samples of epididymal sperm from five deer were incubated for 4 h at 39 °C and 5% CO_2 in TALP-Hepes with (capacitant) and without heparin (non-capacitant) in the medium, with melatonin at 0 M, 1 pM, 100 pM, 10 nM and 1 µM. Flow cytometry showed that melatonin produced significant decreases in superoxide ion and reactive oxygen species levels, especially 1 pM and 1 µM. Incubating without heparin yielded a lower proportion of intracellular calcium (%$[Ca^{2+}]_i$, 40,66%±7,74 vs. 50,32%±3,6; P<0,05), reacted acrosomes (P<0,001) and capacitated spermatozoa (P<0,01). Melatonin (mainly 1 pM and 1 µM) affected the levels of $[Ca^{2+}]_i$ with and without ionophore treatment, but not %$[Ca^{2+}]_i$. Melatonin at 1 pM and 1 µM could reduce capacitation. This results suggest that melatonin affects deer sperm physiology not only as a direct antioxidant, but also by interacting with membrane receptors at picomolar concentrations.

Keywords: red deer, sperm, melatonin, capacitation.