

Sara Miguel Jiménez

Estudio de la posible acción
antioxidante, antiapoptótica y
quimiotáctica de la melatonina
sobre espermatozoides ovinos

Director/es

Pérez Pe, Rosaura María
Casao Gascón, Adriana

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

ESTUDIO DE LA POSIBLE ACCIÓN
ANTIOXIDANTE, ANTIAPOPTÓTICA Y
QUIMIOTÁCTICA DE LA MELATONINA SOBRE
ESPERMATOZOIDES OVINOS

Autor

Sara Miguel Jiménez

Director/es

Pérez Pe, Rosaura María
Casao Gascón, Adriana

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2023



Universidad
Zaragoza

BIOFITER
BIOLOGÍA, FISIOLÓGIA Y
TECNOLOGÍAS DE LA REPRODUCCIÓN



Instituto Universitario de Investigación
en Ciencias Ambientales
de Aragón
Universidad Zaragoza

Estudio de la posible acción antioxidante, antiapoptótica y quimiotáctica de la melatonina sobre espermatozoides ovinos

TESIS DOCTORAL

Autora

SARA MIGUEL JIMÉNEZ

Directoras

Rosaura Pérez Pe
Adriana Casao Gascón

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
Facultad de Veterinaria

Zaragoza, 2023



Universidad
Zaragoza



Las Doctoras **Rosaura Pérez Pe** y **Adriana Casao Gascón**, Profesoras Titulares del área de Zoología, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

INFORMAN:

Que el trabajo realizado por la Graduada **SARA MIGUEL JIMÉNEZ** con título: "*Estudio de la posible acción antioxidante, antiapoptótica y quimiotáctica de la melatonina sobre espermatozoides ovinos*" ha sido realizado bajo su dirección en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de **Doctor**, por lo que consideran procedente su presentación. Asimismo, hacen constar su **correspondencia con el Proyecto de Tesis**, aprobado por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Los resultados obtenidos quedan recogidos en tres artículos publicados (uno de ellos en prensa) y uno en segunda revisión, todos ellos en revistas SCI, e incluidos en el ejemplar de la Tesis Doctoral presentado.

Y para que conste a los efectos oportunos firman la presente en Zaragoza a 14 de noviembre de 2022.

Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, financiado por los proyectos AGL-2017-83799-R (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad) y A07-17R (Gobierno de Aragón), y una beca predoctoral del Gobierno de Aragón, convocatoria 2016/2020.



CERTIFICATE OF RESEARCH FELLOWSHIP

The undersigned, coordinator at the University of Zaragoza of the doctoral programme in
Biochemistry and Molecular Biology

CERTIFIES that

Mr/Ms. Sara Miguel Jiménez, from the University of
Zaragoza..... has undertaken from 01/05/2019.....(start date) to
31/07/2019.....(end date)

a research visit within the framework of pursuing the doctoral thesis in the
department/institute/centre for(select as appropriate)

In witness whereof, I sign the present in

Zaragoza, on 3 September 2019

<p>Doctoral Programme Coordinator</p> <p>NAVAL IRABERRI JOSE JAVIER - 17857071D</p> <p>Signed: ..Javier.Naval.....</p>	<p>Approval from handler/tutor During the stay</p>  <p>Signed: ..Timo.Strünker.....</p>
---	---

In accordance with the provisions of Regulation (EU) 2016/679 on Personal Data Protection, please be aware that your data will be added to the University of Zaragoza students' file, whose purpose is academic, research and administrative management, including the thesis.

Your right to access, rectify and cancel data may be exercised in writing to the UZ Administrator adding a copy of your identity document. In case of disagreement with his answer you can contact dpd@unizar.es or clanning@aezd.es
All the information about it can be consulted in: protecciondatos.unizar.es

Además de los artículos incluidos en el capítulo de Resultados, se han publicado otros artículos en los que he participado durante el periodo predoctoral:

➤ **Testicular ultrasound analysis as a predictive tool of ram sperm quality.**

Autores: M. Carvajal-Serna, S. Miguel-Jiménez, R. Pérez-Pe, A. Casao.

Revista: Biology. 2022, 11(2), 261, EISSN 2079-7737

<https://doi.org/10.3390/biology11020261>

➤ **Underlying molecular mechanism in the modulation of the ram sperm acrosome reaction by progesterone and 17 β -estradiol.**

Autores: S. Gimeno-Martos, S. Miguel-Jiménez, A. Casao, J.A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, R. Pérez-Pe.

Revista: Animal Reproduction Science. 2020, 221, 106567, ISSN 1873-2232

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106567>

➤ **In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen.**

Autores: S. Miguel-Jiménez, M.M. Rivera del Alamo, M. Álvarez-Rodríguez, C.O. Hidalgo, A.I. Peña, R. Muiño, J.E. Rodríguez-Gil, T. Mogas.

Revista: Animal Reproduction Science. 2020, 215, 106315, ISSN 0378-4320

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106315>

➤ **OpenCASA: a new open-source and scalable tool for sperm quality analysis.**

Autores: C. Alquézar-Baeta, S. Gimeno-Martos, S. Miguel-Jiménez, P. Santolaria, J. Yániz, I. Palacín, A. Casao, J.A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, R. Pérez-Pe.

Revista: PLoS Computational Biology. 2019, 15(1): e1006691

<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006691>

Los resultados obtenidos en esta tesis, al igual que otros correspondientes a otros proyectos en los que he participado, fueron también presentados en los siguientes congresos:

En modalidad de presentación oral:

- **Effect of melatonin on ram sperm capacitation induced by epidermal growth factor.**
Autores: S. Miguel-Jiménez, M. Carvajal-Serna, V. Peña-Delgado, A. Casao, R. Pérez-Pe.
Evento: 13rd Biennial Conference of the Association for Applied Animal Andrology (AAAA).
Lugar/año: Bolonia (Italia). Junio 2022.
Primer premio de la competición de estudiantes.

- **Efecto quimiotáctico del fluido folicular de la oveja sobre los espermatozoides ovinos.**
Autores: S. Miguel-Jiménez, A. Arribas, A. Casao, R. Pérez-Pe.
Evento: XIX Jornadas AIDA sobre producción animal.
Lugar/año: Formato online. Junio 2021.
Primer premio mejor vídeo científico, categoría no doctor.

- **Estudio comparativo de la activación del canal de calcio CatSper en espermatozoides de diferentes especies.**
Autores: S. Miguel-Jiménez, C. Schiffer, T. Strünker, R. Pérez-Pe.
Evento: VI Jornadas del Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA).
Lugar/año: Zaragoza (España). Septiembre 2020.
Segundo premio mejor video científico, categoría no doctor.

- **Acción protectora de la melatonina frente al daño por frío en espermatozoides ovinos.**
Autores: S. Miguel-Jiménez, A. Casao, J.A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, R. Pérez-Pe.
Evento: 43º Congreso Nacional y 19º Internacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC).
Lugar/año: Zaragoza (España). Septiembre 2018.

En modalidad de póster:

- **Estudio de la activación del canal CatSper en espermatozoides ovinos.**
Autores: S. Miguel-Jiménez, M. Bru-Albesa, A. Casao, R. Pérez-Pe.
Evento: VI Jornadas del Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA).
Lugar/año: Zaragoza (España). Octubre 2022.

- **Los espermatozoides ovinos capacitados son quimioatraídos por el fluido folicular de oveja.**
Autores: R. Pérez-Pe, S. Miguel-Jiménez, A. Arribas, C. Martínez-Saz, A. Casao.
Evento: VI Jornadas del Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA).
Lugar/año: Zaragoza (España). Septiembre 2022.

- **Analysis of the chemotactic response of ram spermatozoa to steroid hormones.**
Autores: A. Casao, S. Miguel-Jiménez, V. Portolés-Bayod, R. Pérez-Pe.
Evento: 13rd Biennial Conference of the Association for Applied Animal Andrology (AAAA).
Lugar/año: Bolonia (Italia). Junio 2022.

- **Chemotaxis of capacitated ram spermatozoa to follicular fluid.**
Autores: R. Pérez-Pe, S. Miguel-Jiménez, C. Martínez-Saz, A. Casao.
Evento: 13rd Biennial Conference of the Association for Applied Animal Andrology (AAAA).
Lugar/año: Bolonia (Italia). Junio 2022.

- **Effect of phytemelatonin-rich diets on oxidative damage in ram sperm.**
Autores: S. Miguel-Jiménez, M. Carvajal-Serna, V. Peña-Delgado, A. Casao, R. Pérez-Pe.
Evento: 19th International Congress on Animal Reproduction.
Lugar/año: Bolonia (Italia). Junio 2022.

- **Effect of a phytemelatonin-rich diet on ram testicular paenchyma evaluated by macroscopic and microscopic ultrasonography.**
Autores: M. Carvajal-Serna, S. Miguel-Jiménez, J.A. Abecia, R. Pérez-Pe, Casao, A.
Evento: 19th International Congress on Animal Reproduction.
Lugar/año: Bolonia (Italia). Junio 2022.

- **Evaluation of CatSper channel activation in different sperm species by kinetic ion-sensitive fluorimetry.**
Autores: S. Miguel-Jiménez, C. Schiffer, T. Strünker, R. Pérez-Pe.
Evento: Proceedings of the 12th Biennial Conference of the Association for Applied Animal Andrology (AAAA).
Lugar/año: Septiembre 2020.

- **Effect of melatonin on actin and α -tubulin distribution related to in vitro capacitation in ram sperm.**
Autores: M. Carvajal-Serna, M. Paesa, J. Barale, S. Gimeno-Martos, V. Peña-Delgado, S. Miguel-Jiménez, A. Casao, R. Pérez-Pe.
Evento: Proceedings of the 12th Biennial Conference of the Association for Applied Animal Andrology (AAAA).
Lugar/año: Septiembre 2020.

- **Decapacitating effect of melatonin is not mediated by calcium-calmodulin kinase II in ram spermatozoa.**
Autores: V. Peña-Delgado, S. Miguel Jiménez, M. Carvajal-Serna, J.A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, A. Casao, R. Pérez-Pe.
Evento: Proceedings of the 12th Biennial Conference of the Association for Applied Animal Andrology (AAAA).
Lugar/año: Septiembre 2020.

- **Changes in nitric oxide synthase isoforms localization in the presence of melatonin seem not to be related with changes in nitric oxide levels during ram spermatozoa capacitation.**
Autores: S. Miguel-Jiménez, M. Carvajal-Serna, S. Calvo, A. Casao, J.A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, R.
Evento: 23rd Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR).
Lugar/año: San Petersburgo (Rusia). Septiembre 2019.

- **Comparative study of changes in intracellular calcium levels and localization in capacitated ram spermatozoa in presence of melatonin.**
Autores: S. Miguel-Jiménez, M. Carvajal-Serna, A. Casao, J.A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, R. Pérez-Pe.
Evento: 22nd Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR).
Lugar/año: Córdoba (España). Septiembre 2018.

- **Identification of intracellular nitric oxide synthase isoforms in ram sperm.**
Autores: S. Calvo-García, M. Carvajal-Serna, S. Miguel-Jiménez, A. Casao, J.A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, R. Pérez-Pe.
Evento: 22nd Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR).
Lugar/año: Córdoba (España). Septiembre 2018.

- **Protein array-based strategies for identifying ram sperm capacitation-associated changes in apoptotic signaling molecules.**
Autores: S. Gimeno-Martos, S. Miguel-Jiménez, A. Casao, J.A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, R. Pérez-Pe.
Evento: 22nd Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR).
Lugar/año: Córdoba (España). Septiembre 2018.

- **Melatonin has a protective role against cryocapacitation of ram spermatozoa.**
Autores: S. Miguel-Jiménez, A. Casao, J.A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, R. Pérez-Pe.
Evento: 33rd Scientific Meeting of the Association of Embryo Technologies in Europe (AETE).
Lugar/año: Bath (Inglaterra). Septiembre 2017.

- **Post-thaw changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of dairy bull semen using four different commercial extenders.**
Autores: S. Miguel-Jiménez, T. Mogas, A.I. Peña, C. Tamargo, C.O. Hidalgo, R. Muiño, J.E. Rodríguez-Gil, R.
Evento: 32nd Scientific Meeting of the Association of Embryo Technologies in Europe (AETE).
Lugar/año: Barcelona (España). Septiembre 2016.



**Association for Applied Animal
Andrology**

This is to certify that

Sara Miguel-Jiménez

Received **FIRST PRIZE**

in the Student Competition

13th Biennial Conference, Virtual Meeting

June 24-26, 2022

John P. Kastelic

President

La ASOCIACIÓN INTERPROFESIONAL para el DESARROLLO AGRARIO



aida-itea.org

AIDA

ha concedido el

PREMIO JÓVENES INVESTIGADORES 2021

a

Sara Miguel Jiménez

por su comunicación oral presentada en la
Sección de Reproducción
de las XIX Jornadas sobre Producción Animal de AIDA

**EFFECTO QUIMIOTÁCTICO DEL FLUIDO FOLICULAR DE LA OVEJA SOBRE LOS
ESPERMATOZOIDES OVINOS**

Zaragoza, a 2 de Agosto de 2021



Dra. Clara Mª Marín Alcalá
Presidenta de AIDA





ab4d58f195436b0af713292e91214aa3

Copia auténtica de documento firmado digitalmente. Puede verificar su autenticidad en <http://valide.unizar.es/csv/ab4d58f195436b0af713292e91214aa3>



Instituto Universitario de Investigación
en Ciencias Ambientales
de Aragón
Universidad Zaragoza



El Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón otorga el presente

Diploma

SEGUNDO PREMIO MEJOR VÍDEO CIENTÍFICO

Categoría No Doctor
a

“Estudio comparativo de la activación del canal de calcio cattsper en espermatozoides de diferentes especies”

Miguel-Jiménez, S.; Schiffer, C.; Strünker, T.; Pérez-Pe, R.

presentado en las VI Jornadas del Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón, celebradas en modalidad online los días 17 y 18 de septiembre de 2020

En Zaragoza, a fecha de la firma

Dra. Gloria Cuenca Bescós

Directora del Instituto

Documento firmado electrónicamente y con autenticidad contrastable según el artículo 27.3.c) de la Ley 39/2015

CSV: ab4d58f195436b0af713292e91214aa3

Firmado electrónicamente por

GLORIA CUENCA BESCOS

Organismo: Universidad de Zaragoza

Cargo o Rol

Directora IUCA

Página: 1 / 1

Fecha

27/09/2020 12:22:00



Otra etapa de mi vida llega a su fin, y en estas líneas me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de una manera u otra me han acompañado y ayudado en la realización de este trabajo.

En primer lugar, a mis directoras, Rosaura y Adriana. Gracias por confiar en mí, incluso antes de adentrarme en la aventura predoctoral, y darme la oportunidad de trabajar con vosotras. **Rosaura**, siempre haciéndome ver el lado bueno de las cosas y animándome a seguir incluso cuando ni yo misma confiaba en mi trabajo. Sin tu optimismo y sin todo el conocimiento que has compartido conmigo, nunca habría llegado hasta aquí. GRACIAS por ser la mejor guía. **Adriana**, no tengo palabras para agradecerte la disposición que has tenido SIEMPRE para ayudarme. Daba igual si el citómetro me estaba boicoteando el experimento, que los western no quisieran salir bonitos, o que, a pesar de las mil veces que me lo has explicado, no me aclarase con la estadística. Tú siempre has estado allí con un “por supuesto, ahora mismo voy” y una sonrisa. Muchas gracias a las dos por escucharme siempre y acompañarme en el camino y, sobretodo, por la confianza depositada en mí. No me olvido de los cientos de cafés en los que no solo compartimos ciencia, sino recetas, restaurantes y un sinfín de “reviews” gastronómicas.

Pepín, no estaría escribiendo estas líneas si no llega a ser por ti. Mi profesor de biología en primero de carrera, transmitías tanto entusiasmo por la ciencia, la investigación, el comportamiento animal... que por eso acabé pidiendo prácticas en este grupo, ¡y qué gran descubrimiento! Siempre has tenido la puerta del despacho abierta para mí, aunque a veces me “raptaras” para estudiar cómo podríamos mejorar nuestro (permíteme apropiármelo un poquito) proyecto de cámara de quimiotaxis. Gracias por la cercanía, por los consejos y por alegrarnos las mañanas con tus desayunos, aunque fuéramos un poco brujas. **Tere**, no tuve la suerte de conocerte antes de llegar al departamento, pero desde el principio te preocupaste por mí y por mi trabajo. Siempre has recibido mis consultas con una sonrisa, y me has aportado tu inmenso conocimiento y tus inteligentes sugerencias. Nos habéis hecho mucha falta este último año en el laboratorio, pero ahora os toca a vosotros disfrutar de vuestra nueva etapa.

Por suerte, en el laboratorio me han acompañado otras personas. Sin ellas, todo habría sido mucho más aburrido y costoso. **Silvia**, lo mismo nos poníamos a cantar “La oreja de van Gogh”, que nos echábamos una mano con cualquier experimento, hay tiempo para todo. Cuántas conversaciones profundas y no tanto, hemos compartido. Sé que siempre nos podremos tomar una cervecita y recordar. **Meli**, mi gran compañera, esta tesis también es tuya. Qué trabajadora eres, siempre has sacado un huequito para echarme una mano en todo. Gracias, gracias y más gracias. **Vicky**, vienes pisando fuerte. Cuánto entusiasmo por la

ciencia, cuántas ganas de trabajar y de ayudar, eres un sol. Gracias por hacerme más amenos estos últimos años.

Gracias a **Puri**, por darme los buenos días con energía cada mañana y no rechistar aunque le pisara lo fregado. A **Sofía**, por atraparme en su oficina a charlar de la vida y contagiarme su alegría. Gracias a las “chicas de mitocondrias”, por dejarme compartir mesa con ellas al medio día en nuestro ratito de desconexión. A Cris, Tania, Luis, Javi, por poder confiar en su reserva de reactivos y compartir sus trucos para conseguir el western ideal.

No me olvido del resto de personas que han ido dejando su granito de arena a su paso por el laboratorio. “Mis alumnos”, de los que yo también he aprendido, Ashley, Virginia, Adrián, Celia, Marcos... A los que vinieron de lejos, compartiendo su cultura y su trabajo, Lamia, Luisa, Juliano...

Me gustaría también agradecer al **Dr. Timo Strünker** y a todo su equipo la oportunidad que me dio de poder trabajar con ellos. La experiencia profesional y personal fue muy satisfactoria, y el trato recibido fue excepcional. Mi paso por Alemania me permitió conocer personas maravillosas. **Cris**, mi italiana-cubana, siempre te llevaré en el corazón. Fuiste el apoyo que necesitaba cuando estaba sola, siempre tan alegre. **Daniela**, el destino fue sabio y quiso que nos conociéramos en el cuarto de la lavandería, a pesar de vivir en el mismo pasillo y trabajar en el mismo edificio. No podía haber tenido mejor vecina y compañera de aventuras.

Por supuesto, a las **Bullis** y a las **Señoras**, pues ellas han sido mi vía de escape y desconexión cuándo la ciencia me daba la espalda, pero también han brindado conmigo cuando había motivos (o no) para celebrar.

El agradecimiento más especial es para mi familia. A **mis padres**, por el gran esfuerzo que han hecho siempre para que yo llegara hasta donde quisiera, hasta donde he llegado hoy. Esta tesis tiene un buen pedazo de ellos. A **mi hermano**, por compartir inquietudes, experiencias y conocimiento, de biólogo a biotec. A mis primos Luci y Juako, los otros científicos de la familia, siempre animándome y preocupándose de mis avances. Mis primas María y Laura, siempre tan atentas a todo lo que les contaba.

Mil millones de gracias, **Dani**. Desde su lejanía con la investigación, ha sido el testigo de las idas y venidas emocionales de esta profesión. Siempre has estado celebrando mis éxitos con orgullo, y levantándome en los peores momentos. Soportarme no ha sido fácil, te quiero.

Gracias de corazón a todos por hacer que el camino haya sido más fácil.

The background features a light beige color with faint, golden-yellow floral line art. The art includes various flower shapes and leafy branches, some of which are more prominent and detailed than others. A central rectangular box with a thin brown border contains the main text.

**QUIÉRETE, ÁMATE Y ENAMÓRATE DE TI
TODOS LOS DÍAS.
SE TÚ Y NO DEJES DE SERLO NUNCA.
ESCUCHA, APRENDE Y EVOLUCIONA,
SOLO ASÍ CONSEGUIRÁS
LO QUE TE PROPONGAS.**

**TODOS LO QUE DESEES DESDE EL CORAZÓN
PUEDE HACERSE REALIDAD.
PIDE, ESPERA, SIENTE Y CONFÍA,
Y ESO TAN MARAVILLOSO LLEGARÁ**

**DISFRUTA DE TODOS LOS MOMENTOS,
SITUACIONES Y EXPERIENCIAS
AGRADECE CADA MINUTO
VÍVELO MUCHO E INTENSAMENTE
Y NO OLVIDES SER FELIZ;**

AQUÍ y AHORA.

A mis padres

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE

página

1	RESUMEN.....	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1	El espermatozoide ovino.....	11
2.2	Tránsito del espermatozoide ovino por el tracto reproductor femenino.....	14
2.2.1.	Mecanismos de orientación espermática: quimiotaxis.....	16
2.2.2.	Capacitación espermática.....	18
2.2.2.1.	Regulación de la capacitación por cascadas de señalización celular.....	22
2.2.2.1.1.	Vía de señalización ACs/AMPC/PKA.....	22
2.2.2.1.2.	Señalización por EGF/EGFR y MAPKs.....	23
2.2.3.	Reacción acrosómica y unión a la zona pelúcida.....	27
2.3	Estrés oxidativo.....	29
2.4	La apoptosis en espermatozoides.....	33
2.5	Melatonina y reproducción ovina.....	38
2.5.1	Estacionalidad reproductiva en la especie ovina.....	38
2.5.2	La melatonina.....	39
2.5.2.1	Síntesis y degradación de la melatonina en mamíferos.....	40
2.5.2.2	Mecanismo de acción de la melatonina.....	42
2.5.3	Acción de la melatonina en el espermatozoide ovino.....	44
3	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	47
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
4.1	Reactivos.....	53
4.2	Obtención y procesamiento de las muestras espermáticas.....	53
4.2.1	Obtención de las muestras seminales.....	53

4.2.2.	Selección espermática y eliminación del plasma seminal por el método de swim-up/dextrano	53
4.3	Inducción <i>in vitro</i> de la capacitación espermática	55
4.4	Evaluación de las muestras espermáticas.....	57
4.4.1	Cálculo de la concentración espermática y del porcentaje de recuperación	57
4.4.2	Evaluación de la motilidad espermática	58
4.4.3	Determinación del estado de capacitación mediante tinción con clorotetraciclina (CTC).....	59
4.4.4	Análisis mediante citometría de flujo	60
4.4.4.1	Evaluación de la integridad de la membrana plasmática	60
4.4.4.2	Evaluación de los niveles intracelulares de óxido nítrico	61
4.4.4.3	Evaluación de los niveles intracelulares de superóxidos.....	62
4.4.4.4	Evaluación de los niveles de calcio intracelular	62
4.4.4.5	Evaluación de la activación de caspasas	63
4.4.4.6	Evaluación de la fragmentación del ADN.....	64
4.5	Detección y cuantificación de proteínas por <i>Western blot</i>	64
4.5.1	Extracción de las proteínas de los espermatozoides de morueco.....	64
4.5.2	SDS-PAGE y western blot	65
4.6	Identificación y localización de proteínas mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	68
4.7	Evaluación de la orientación espermática por quimiotaxis	69
4.8	Análisis estadísticos.....	71
5	RESULTADOS	73
5.1.	ARTÍCULO-MANUSCRITO 1.....	75
5.2.	ARTÍCULO 2	101
5.3.	ARTÍCULO 3	117

5.4.	ARTÍCULO 4	135
6	DISCUSIÓN GENERAL.....	169
6.1.	Efecto quimiotáctico de la melatonina sobre la orientación espermática en la especie ovina.....	171
6.2.	Estudio de los mecanismos moleculares de respuesta de los espermatozoides ovinos a la melatonina en los procesos de capacitación y apoptosis	175
6.2.1.	Identificación y localización de la NADPH oxidasa 5 (NOX5) en el espermatozoide ovino.....	175
6.2.2.	Implicación de la NOX5 y del anión superóxido en la capacitación espermática ovina.....	177
6.2.3.	Detección y localización de la óxido nítrico sintasa (NOS) en el espermatozoide ovino.....	178
6.2.4.	Implicación del óxido nítrico en la capacitación espermática ovina	180
6.2.5.	Efecto de la melatonina sobre los niveles de óxido nítrico y superóxidos durante la capacitación <i>in vitro</i> en el espermatozoide ovino.....	182
6.2.6.	Implicación del óxido nítrico y la melatonina sobre la apoptosis durante la capacitación <i>in vitro</i> inducida por EGF	185
7	CONCLUSIONES	189
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	193
9	LISTA DE ABREVIATURAS.....	237

1 RESUMEN

La especie ovina tiene una estacionalidad reproductiva muy marcada que está regida por la secreción de melatonina. Dado que esta estacionalidad resulta limitante para la producción ovina, un sector fundamental por su importancia económica, social y medioambiental, un conocimiento más profundo de la acción de la melatonina sobre la reproducción ovina permitiría mejorar su eficiencia reproductiva.

La melatonina se sintetiza en la glándula pineal y ejerce sus principales efectos sobre la reproducción a través de la regulación del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. No obstante, también existe producción de melatonina extrapineal en varios órganos y tejidos, entre ellos los del tracto reproductor femenino y masculino. Se encuentra en el fluido folicular y es secretada por las células del *cumulus* que rodean al ovocito. Además, esta hormona está presente en el plasma seminal del morueco a una concentración variable a lo largo del año, en función de la estación reproductiva. La melatonina tiene acción antioxidante y además puede ejercer efectos directos sobre los espermatozoides a través de su unión a receptores específicos en la membrana plasmática (MT₁ y MT₂). Entre sus efectos se han descrito una acción antiapoptótica y un papel regulador sobre la capacitación espermática *in vitro*. Para algunas células somáticas, también se ha referido un efecto quimiotáctico de la melatonina. En base a estos antecedentes, en esta tesis se planteó como hipótesis que **la melatonina es capaz de actuar como quimioatrayente y modular la orientación espermática en la especie ovina, y que además ejerce un efecto antioxidante y antiapoptótico durante el proceso de capacitación espermática.**

La quimiotaxis como mecanismo de orientación espermática en mamíferos se ha reconocido ampliamente en los últimos años, excluyendo la idea de que es un mecanismo propio de especies acuáticas con fertilización externa. Un aspecto a tener en cuenta es que, según estudios previos, solo los espermatozoides capacitados e hiperactivados son capaces de responder a los estímulos quimiotácticos. En algunas especies, como el humano, el toro, el ratón o el cerdo, se ha demostrado la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides al fluido folicular; sin embargo, no está claro qué sustancias de este fluido son las responsables de ejercer dicha quimioatracción. Las hormonas esteroideas, como la progesterona o el estradiol, parecen ser esenciales en la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides, además de otras sustancias no hormonales. Otra hormona presente en el fluido folicular y en el tracto reproductor de la hembra es la melatonina, y dado que se ha visto que tiene un efecto

quimiotáctico sobre algunas células somáticas, podría ser una hormona candidata a modular los procesos de orientación espermática hacia el ovocito. Para comprobarlo, el primer objetivo de este trabajo fue **analizar el efecto quimiotáctico *in vitro* de la melatonina sobre la orientación de los espermatozoides ovinos**, como una aproximación a lo que ocurriría *in vivo* en el tracto genital femenino de esta especie. En primer lugar, se evaluó el efecto de la melatonina mediante un método de selección espermática, el *swim-up*/dextrano, añadiéndola en la capa superior del medio de recogida a dos concentraciones distintas, 100 pM y 1 μ M. El porcentaje de recuperación de células en la capa superior del medio de *swim-up* fue mayor en presencia de melatonina a ambas concentraciones, pero solamente para espermatozoides obtenidos durante la época no reproductiva. Además, los espermatozoides seleccionados con melatonina 100 pM estaban más capacitados y presentaban un mayor marcaje para el receptor MT₂ en el acrosoma en comparación con los recuperados en el *swim-up* control. El mayor porcentaje de recuperación obtenido en presencia de melatonina podría deberse al estímulo del movimiento espermático en direcciones aleatorias (quimioquinesis), o a un movimiento dirigido (quimiotaxis) hacia la melatonina. Para tratar de dilucidar esta cuestión, se llevó a cabo otro abordaje experimental utilizando cámaras de quimiotaxis comerciales y un *software* de acceso libre, el OpenCASA, que analiza las trayectorias individuales de los espermatozoides hacia el quimioatrayente y calcula un índice de quimiotaxis (índice SL). De nuevo, se observaron diferencias significativas únicamente durante la época no reproductiva, probablemente debido a que la exposición de los espermatozoides a las altas concentraciones de melatonina en el plasma seminal durante la época reproductiva enmascara los efectos *in vitro* de esta hormona. En este caso, solo los espermatozoides capacitados en presencia de altos niveles de AMPc respondieron al estímulo quimiotáctico de la melatonina a concentración 1 μ M. **Estos resultados (artículo-manuscrito 1) apuntarían a una acción quimiotáctica de la melatonina *in vitro* sobre los espermatozoides ovinos**, abriendo la posibilidad de incluir esta hormona en el método de *swim-up* para mejorar la tasa de recuperación espermática.

El **segundo objetivo general** de esta tesis doctoral fue **profundizar en los mecanismos moleculares de respuesta de los espermatozoides ovinos a la melatonina durante los procesos de capacitación y apoptosis**, poniendo especial atención a su papel antioxidante. Hay que tener en cuenta que la capacitación en la especie ovina puede ser estimulada *in vitro*

por la adición de compuestos que incrementan el AMPc (vía clásica AMPc/PKA) o por la presencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (vía de las MAP quinasas). Para que la capacitación espermática tenga lugar, es necesario que haya ciertos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), pero sin que se produzcan en exceso, ya que resultaría perjudicial. La producción de ROS en los espermatozoides es posible gracias a la implicación de varias enzimas. Por ello, dentro de este segundo objetivo general, se planteó como primer **objetivo específico estudiar la generación del anión superóxido y del óxido nítrico en los espermatozoides ovinos y su implicación en la capacitación espermática**. Los resultados obtenidos demostraron, por primera vez, la existencia de las enzimas NADPH oxidasa 5 (NOX5, productora de superóxidos) y óxido nítrico sintasa (NOS, productora de óxido nítrico) en el espermatozoide ovino, describiendo su localización, así como su implicación en la capacitación espermática ovina (artículos 2 y 3).

En espermatozoides ovinos se identificaron seis inmutipos de NOX5 mediante inmunofluorescencia indirecta, cuyos porcentajes variaron durante la capacitación *in vitro*, observándose, al mismo tiempo, un aumento en los niveles intracelulares de superóxidos. Éstos últimos también aumentaron tras la adición de ionóforo de calcio, ya que la NOX5 es sensible a este ion, y disminuyeron en presencia de un inhibidor de NOX5 (GKT136901), junto con el porcentaje de espermatozoides capacitados y con el acrosoma reaccionado. Estos resultados demostrarían que **la NOX5 es una importante fuente de ROS en el espermatozoide ovino y estaría implicada en el proceso de capacitación** (artículo 2).

Por su parte, se detectaron las tres isoformas de NOS (eNOS, nNOS e iNOS) en los espermatozoides ovinos. Las formas constitutivas, eNOS y nNOS, se detectaron por inmunofluorescencia y *western blot*, mientras que la inducible, iNOS, sólo mediante inmunofluorescencia. Para cada isoforma se describieron dos inmutipos, cuyos porcentajes cambiaron durante la capacitación *in vitro* con agentes elevadores del AMPc (artículo 3). También los niveles de óxido nítrico fueron mayores en los espermatozoides incubados en condiciones capacitantes, tanto con agentes elevadores del AMPc (artículo 3) como con EGF (artículo 4). Estos resultados, junto con los obtenidos tras la adición de un precursor del óxido nítrico, la L-arginina, y un inhibidor de la NOS, el L-NAME, sugieren la **implicación de la NOS y el óxido nítrico en la capacitación espermática ovina**.

El segundo **objetivo específico** dentro del segundo objetivo general fue **analizar el efecto de la melatonina sobre los niveles de óxido nítrico y superóxidos durante la capacitación *in vitro* en los espermatozoides ovinos**. Así, la incubación de los espermatozoides con melatonina 1 μ M limitó la producción de superóxidos y evitó los cambios en la distribución de NOX5 asociados a la capacitación *in vitro* por alto AMPc, lo que demostraría que **la melatonina ejercería su acción antioxidante en los espermatozoides ovinos, al menos en parte, mediante la modulación de la NOX5 durante la capacitación** (artículo 2). Por otro lado, la presencia de **melatonina modificó la distribución de la NOS durante la capacitación con elevadores del AMPc en los espermatozoides de morueco, pero no tuvo efectos significativos sobre los niveles de óxido nítrico** (artículo 3). Tampoco tuvo efecto significativo sobre niveles de óxido nítrico cuando la capacitación *in vitro* se llevó a cabo con EGF, pero a concentración 1 μ M fue capaz de inhibir el incremento de espermatozoides con el acrosoma reaccionado provocado por la L-arg (artículo 4).

Con respecto a la capacitación estimulada por la presencia del EGF, ésta implica la unión a su receptor (EGFR) y la activación de la ruta las MAP quinasas (MAPKs, del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*). Esta ruta comparte mecanismos moleculares con la apoptosis en los espermatozoides ovinos, a través de la activación de la MAPK JNK (quinasa c-Jun N-terminal) y la p38.

A su vez, la capacidad antiapoptótica de la melatonina está relacionada, según estudios previos, con su efecto antioxidante a través la ruta las MAPKs. Esta ruta es una de las vías de actuación del óxido nítrico, que está implicado en la capacitación espermática ovina, como se ha demostrado en el primer objetivo específico. Por tanto, se planteó como **tercer objetivo específico**, dentro del segundo objetivo general, **estudiar la implicación del óxido nítrico y la melatonina sobre la apoptosis durante la capacitación *in vitro* inducida por el EGF**.

Los resultados obtenidos evidenciaron **cambios relacionados con el proceso de apoptosis tras la inducción de la capacitación *in vitro* con EGF**, ya que se detectó un aumento de los marcadores de apoptosis (activación de caspasas y fragmentación del ADN) por citometría de flujo, y un aumento de la forma activa de la MAPK JNK mediante *western blot* (artículo 4). Sin embargo, la inducción de la producción de óxido nítrico con L-arginina, aunque produjo un aumento en el porcentaje de espermatozoides reaccionados, no tuvo ningún efecto sobre los marcadores de apoptosis, lo que sugiere que el metabolismo del **óxido nítrico**

no regula los procesos apoptóticos durante la capacitación espermática ovina inducida por el EGF. Por su parte, la melatonina mostró un efecto bimodal similar al que ejercía en otras condiciones capacitantes, previniendo la capacitación a concentración micromolar, y potenciando la reacción acrosómica a concentración picomolar. No obstante, no se observaron efectos significativos de la melatonina en relación a los marcadores de apoptosis aumentados por la capacitación, aunque que **fue capaz de limitar la activación de la JNK por fosforilación** (artículo 4).

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral proporcionan nuevos datos sobre los mecanismos moleculares involucrados en la capacitación espermática en la especie ovina, tanto por la vía clásica AMPc/PKA como por la vía del EGF, así como la implicación de la melatonina en este proceso y en la orientación espermática.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El espermatozoide ovino

Los espermatozoides se producen en los testículos mediante un proceso denominado **espermatogénesis**. En concreto se generan en los túbulos seminíferos, que contienen dos tipos de células: las células germinales, que darán lugar a los espermatozoides, y las células de Sertoli, que proporcionan el soporte estructural y metabólico a las células germinales durante la espermatogénesis.

El proceso de formación de los espermatozoides en la especie ovina tiene una duración aproximada de 47-49 días (Ortavant, 1956; Senger, 2003) y consta de tres etapas. La primera fase es la de proliferación, en la que las espermatogonias ($2n$), se dividen mitóticamente dando lugar a los espermatocitos primarios ($2n$) que quedan unidos entre sí por puentes citoplasmáticos para facilitar las interacciones bioquímicas y una maduración sincrónica de las células de la línea germinal. En la segunda fase se produce la meiosis de los espermatocitos primarios, dando lugar a los espermatocitos secundarios (n) tras la primera división meiótica, y a las espermatidas (n) tras la segunda división. Por último, en la fase de diferenciación o espermiogénesis, las espermatidas se diferencian a espermatozoides (**Figura 1**).

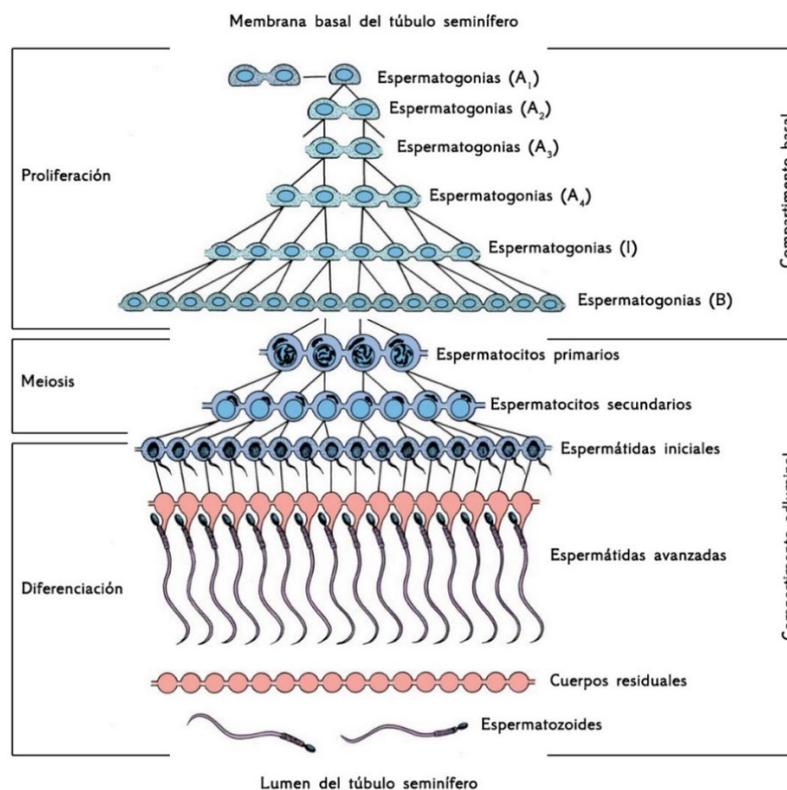


Figura 1. Esquema representativo del proceso de espermatogénesis. Modificado de Senger (2003) y Ross and Pawlina (2014).

La **espermioogénesis** incluye los siguientes procesos (**Figura 2**):

- Condensación del núcleo: el núcleo de las espermátidas se compacta y adquiere una forma ovalada y piriforme. El ADN también se compacta por la sustitución de histonas por protaminas, que son proteínas ricas en cisteínas que formarán puentes disulfuro y estabilizarán el núcleo hasta el momento de la fecundación (Eddy, 2006).
- Formación del acrosoma: el acrosoma es un capuchón que se desarrolla a partir del aparato del Golgi y ocupa los 2/3 anteriores de la cabeza (Senger, 2003). Contiene enzimas hidrolíticas que, tras la reacción acrosómica, permitirán al espermatozoide atravesar la zona pelúcida y fecundar al ovocito (Flesch and Gadella, 2000; Gerton, 2002; Toshimori, 2003; Eddy, 2006).
- Reducción del citoplasma: la mayor parte del citoplasma del espermatozoide se elimina mediante su desplazamiento hacia la pieza terminal del flagelo, originando la llamada gota citoplasmática (Senger, 2003). Este residuo debe ser eliminado posteriormente en el proceso de maduración espermática.
- Desarrollo del sistema de movimiento flagelar: el centrosoma del espermatozoide se mueve hacia la parte opuesta donde se ha formado el acrosoma. A partir del centriolo proximal se forma el cuello del flagelo, que supone la forma de anclaje del flagelo a la cabeza del espermatozoide, mientras que a partir del centriolo distal del centrosoma se desarrolla el axonema del flagelo. Éste consta de un conjunto de 9 dobletes de microtúbulos organizados en un cilindro alrededor de otro par de microtúbulos centrales. Alrededor del axonema se forman las denominadas fibras densas externas, que se extenderán a lo largo de la pieza principal del flagelo, y que son las encargadas de los movimientos de curvatura del mismo (Lindemann, 1996).
- Formación de la hélice mitocondrial: las mitocondrias migran y se colocan en la parte proximal del flagelo, rodeando de forma helicoidal al axonema y las fibras densas externas (Lehti and Sironen, 2017), y dando lugar a la pieza intermedia del flagelo. Estas mitocondrias son las encargadas de aportar energía en forma de ATP (adenosín trifosfato) para activar el movimiento flagelar (Turner, 2003; Eddy, 2006).

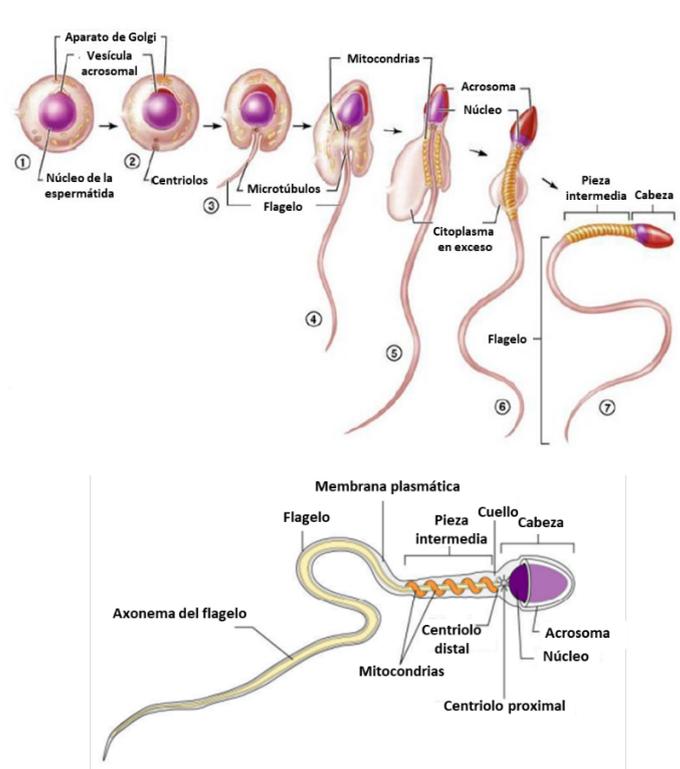


Figura 2. Esquema representativo del proceso de espermiogénesis (arriba) y partes del espermatozoide (abajo). Modificado de *Essentials of human anatomy & physiology* (Marieb, 2006).

Cuando los espermatozoides completan la espermiogénesis todavía no son funcionales. Para adquirir la capacidad fecundante deben sufrir una maduración post-testicular, parte en el epidídimo, y parte en el tracto reproductor de la hembra mediante un proceso denominado capacitación. Los espermatozoides inmaduros abandonan los túbulos seminíferos por los conductos eferentes, gracias a contracciones del tejido muscular, hasta llegar al **epidídimo**. Es ahí donde los espermatozoides completan su maduración durante unos 14 días. Durante este tiempo, los espermatozoides van incorporando proteínas secretadas por el epidídimo y van perdiendo o reorganizando las que tenían. Las proteínas secretadas por la cabeza y cuerpo epididimarios confieren al espermatozoide la capacidad de moverse, unirse a la zona pelúcida del ovocito, y son imprescindibles para la fusión de membranas durante la fecundación (revisado por Björkgren y Sipilä (2019)). Ya en la cola del epidídimo, los espermatozoides se almacenan y las proteínas secretadas por este reservorio se encargan de mantener la capacidad fecundante y la supervivencia de los espermatozoides (Cooper, 1998). Además, durante el tránsito epididimario, los espermatozoides pierden la gota citoplasmática y continúa la compactación de la cromatina. Una vez que los espermatozoides son eyaculados

y se mezclan con el plasma seminal, incorporan otros componentes que actuarán como agentes discapacitantes, soporte metabólico y protección frente al daño oxidativo (Desnoyers and Manjunath, 1992; Poiani, 2006; Juyena and Stelletta, 2012; Druart *et al.*, 2013).

2.2 Tránsito del espermatozoide ovino por el tracto reproductor femenino

Tras la cópula o inseminación artificial, los espermatozoides son depositados en el interior del tracto reproductor femenino (TRF), donde estarán expuestos a ambientes muy distintos, entrarán en contacto con gran variedad de fluidos y sufrirán modificaciones en su estado fisiológico (**Figura 3**).

En la especie ovina, los espermatozoides se depositan a la entrada del cérvix, cuya estructura anillada y con numerosos pliegues supone una barrera física para estas células. Además, el cérvix produce un fluido denominado mucus, que también dificultará el avance de los espermatozoides. Asimismo, en el TRF se da una respuesta inmunológica para la eliminación de espermatozoides, bien por fagocitosis, o por un proceso llamado NETosis. A través de este último mecanismo, los neutrófilos del TRF liberan por extrusión una red de ADN, atrapando a los espermatozoides en las llamadas NETS (del acrónimo en inglés *Neutrophil Extracellular TrapsK*) (Alghamdi *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2020). De esta manera, se produce una primera selección espermática y solo aquellos espermatozoides con mejor motilidad y condiciones fisiológicas conseguirán atravesar el cérvix y/o quedar depositados en sus criptas formando reservorios (Rath *et al.*, 2008), donde quedan protegidos del flujo retrógrado del mucus y de sus agentes de defensa. Por otro lado, los espermatozoides también cuentan con mecanismos de defensa frente al sistema inmune del TRF, como la presencia de glicoproteínas β -defensinas en su superficie (Hall *et al.*, 2017).

Los espermatozoides continúan su avance por el TRF en oleadas gracias a su propia motilidad y a las contracciones musculares del útero. Allí establecen otros reservorios espermáticos para evadir al sistema inmune, al unirse a las células epiteliales del útero a través de las proteínas BSP de su superficie (del inglés, *Binder Sperm Proteins*), que además impiden la capacitación espermática prematura (Pini *et al.*, 2018).

Los espermatozoides atraviesan el útero hasta llegar a la unión útero-tubárica y, posteriormente, al oviducto, donde tendrá lugar la fecundación. En el oviducto, a nivel del istmo, también existen pequeños reservorios donde los espermatozoides permanecen

retenidos, mediante uniones al epitelio ciliado oviductal. Este fenómeno fue observado por primera vez en hámster y conejo (Yanagimachi and Chang, 1963) y, más tarde, en las especies ovina (Hunter and Nichol, 1983), bovina (Hunter and Wilmut, 1984) y murina (Suarez, 1987). Para que la fecundación se produzca con éxito, los espermatozoides deben culminar su maduración y adquirir la capacidad fecundante mediante un proceso denominado **capacitación espermática**, que se explicará con más detalle en un apartado posterior. Los espermatozoides se van capacitando en oleadas conforme se van liberando de los reservorios del istmo y entran en contacto con diferentes moléculas presentes en el fluido oviductal (Hunter, 2012). Estos reservorios juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la capacidad fecundante de los espermatozoides, ya que el periodo de tiempo entre el estro (cuando tiene lugar la cópula o la inseminación artificial) y la ovulación de la hembra es variable. Además, controlan la cantidad de espermatozoides que llegan a la ampolla, donde se produce la fecundación, contribuyendo así a la prevención de la polispermia (revisado por Rickard *et al.*, (2019)).

Pero además, para que la fecundación sea exitosa, los espermatozoides deben localizar y alcanzar al ovocito. Para ello, se produce un cambio en el patrón de movimiento y los espermatozoides pasan de tener un movimiento de avance rectilíneo, que les permite atravesar el TRF, a un movimiento más oscilatorio y menos progresivo. Este fenómeno se denomina **hiperactivación flagelar** y permite, por un lado, que los espermatozoides se liberen de los reservorios del istmo, y por otro, que sean capaces de atravesar la capa de células del *cumulus* y la zona pelúcida que rodean al ovocito (Ho and Suarez, 2001). La hiperactivación se caracteriza por una mayor amplitud en la batida del flagelo, que se vuelve más flexible y oscila de manera asimétrica, y un aumento del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide, describiendo así un patrón de movimiento en forma de ocho y un avance que permite la búsqueda del ovocito y la penetración de sus envolturas (Yanagimachi, 1994b).

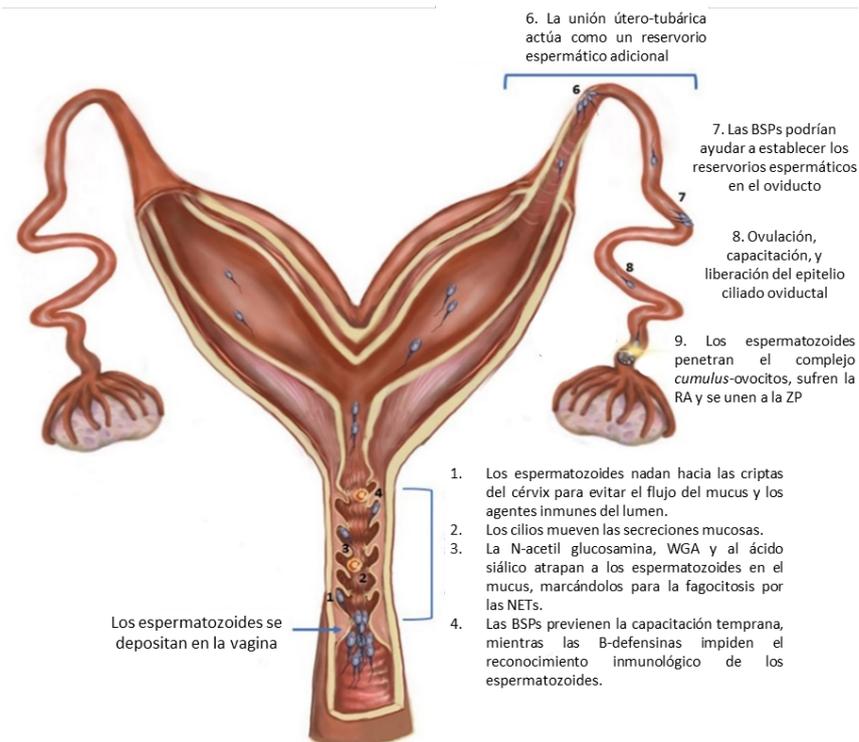


Figura 3. Trayecto de los espermatozoides ovinos por el tracto reproductor femenino. Imagen modificada de Rickard et al. (2019).

2.2.1. Mecanismos de orientación espermática: quimiotaxis

Se han postulado diferentes mecanismos de orientación espermática, aunque el movimiento guiado hacia el ovocito podría deberse una combinación de varios de éstos.

Uno de los mecanismos propuestos es la orientación por **termotaxis**, que provoca que los espermatozoides se orienten en función de un gradiente de temperatura (Bahat *et al.*, 2003). Otro mecanismo es la **reotaxis**, por la que los espermatozoides se orientan en contra de un flujo de fluido (Miki and Clapham, 2013). Y por último, la **quimiotaxis** (Eisenbach, 1999b), por la que los espermatozoides se orientan en respuesta a un gradiente de concentración de una sustancia quimioatrayente, como podrían ser sustancias secretadas por las células del *cumulus* que rodean al ovocito o sustancias presentes en el fluido folicular.

La **quimiotaxis** se postula como el proceso más probable para que se produzca la orientación espermática hacia el ovocito (Eisenbach, 1999a). Este mecanismo se describió por primera vez a mediados de los años 60 en animales marinos con fecundación externa, como los corales y los erizos de mar, ya que vierten sus espermatozoides al agua y éstos deben nadar en dirección a las sustancias secretadas por el ovocito (revisado por Kaupp (2012)). Sin

embargo, en los mamíferos no estaba tan claro este proceso, ya que se creía que la cantidad de espermatozoides que llegan a las inmediaciones del ovocito era suficiente para localizarlo accidentalmente sin necesidad de ningún otro estímulo.

No obstante, como se ha explicado anteriormente, debido a los procesos de selección espermática en el TRF, sólo un pequeño porcentaje de los espermatozoides eyaculados alcanzan el oviducto (Williams *et al.*, 1993). Esto sugeriría que los espermatozoides de mamíferos también pueden precisar de quimiotaxis para localizar al ovocito. Sin embargo, este proceso es muy difícil de estudiar por el bajo número de células que responden a estos estímulos (Cohen-Dayag *et al.*, 1995), ya que según algunos autores, **sólo los espermatozoides capacitados y con motilidad hiperactivada pueden responder a los estímulos quimiotácticos** (Cohen-Dayag *et al.*, 1995; Eisenbach, 1999a; Fabro *et al.*, 2002). A pesar de las dificultades, algunos estudios han sido capaces de demostrar este mecanismo en determinadas especies de mamíferos (revisado en Giojalas *et al.* (2015)).

Como se ha comentado, la quimiotaxis es un fenómeno por el cual un organismo o célula dirige sus movimientos en función de un gradiente de concentración de una determinada sustancia química presente en su entorno. En el caso de los espermatozoides, algunos autores sugieren que el fluido folicular, que contiene secreciones del ovocito y de las células que lo rodean, podría contener las sustancias quimioatrayentes para los espermatozoides, como se ha demostrado *in vitro* en espermatozoides humanos (Villanueva-Díaz *et al.*, 1990; Ralt *et al.*, 1991), murinos (Oliveira *et al.*, 1999; Bhagwat *et al.*, 2021), equinos (Navarro *et al.*, 2007), porcinos (Serrano *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2021) y bovinos (Gil *et al.*, 2008). No obstante, la composición bioquímica de este fluido varía a lo largo del ciclo estral (Singh *et al.*, 1999). Entre las sustancias constituyentes del fluido folicular que podrían jugar un papel en la quimiotaxis espermática se encontrarían, entre otras, determinadas hormonas, como las esteroideas y factores de tipo odorante. La progesterona es uno de los componentes del fluido folicular que más se ha estudiado para determinar su acción quimioatrayente, demostrándose su acción en espermatozoides de humano (Gatica *et al.*, 2013; Uñates *et al.*, 2014), ratón (Guidobaldi *et al.*, 2017), cerdo (Vieira *et al.*, 2021) y conejo (Teves *et al.*, 2006; Guidobaldi *et al.*, 2008). Otra hormona esteroidea, el estradiol, aunque no se ha demostrado su acción quimioatrayente por sí misma, está relacionada con la hiperactivación y la reacción acrosómica (Vigil *et al.*, 2008; Baldi *et al.*, 2009; Gimeno-Martos *et al.*, 2017). El estradiol, junto

con el AMPc y el GMPc, podrían ser esenciales para la respuesta quimiotáctica del espermatozoide, ya que están involucrados en el aumento de los niveles de calcio intracelular (Kaupp *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2003; Orihuela *et al.*, 2003; Gakamsky *et al.*, 2009), que es responsable del movimiento flagelar y de la motilidad espermática (Bohmer *et al.*, 2005). Se ha visto también un efecto quimiotáctico sobre los espermatozoides por parte de otras sustancias como factores odorantes (revisado por Ali *et al.* (2021)), el péptido natriurético atrial (Bian *et al.*, 2012), el óxido nítrico (Machado-Oliveira *et al.*, 2008), la heparina, la adrenalina, la calcitonina, o la acetilcolina (revisado por Eisenbach (1999a)). La melatonina es otra hormona que está presente en el TRF (Brzezinski *et al.*, 1987; Shi *et al.*, 2009; El-Raey *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2019). Se ha descrito que ejerce acción quimiotáctica sobre leucocitos (Pena *et al.*, 2007) y células de la retina (Shirakawa and Ogino, 1987), pero hasta la fecha no se ha demostrado esta acción en espermatozoides. No obstante, como se explicará más adelante, dado el importante papel que tiene la melatonina en la regulación de la fisiología del espermatozoide ovino, se postula como una posible hormona implicada en el movimiento guiado de los espermatozoides hacia el ovocito.

2.2.2. Capacitación espermática

En el tramo final del útero y en el oviducto, el ambiente y los fluidos oviductales estimulan el proceso de capacitación espermática (Bailey, 2010). Este proceso se describió por primera vez en los años 50, cuando Chang y Austin demostraron, en dos trabajos independientes, que los espermatozoides adquieren su capacidad fecundante tras residir durante un tiempo en el tracto reproductor femenino (Austin, 1951; Chang, 1951). Desde entonces, numerosos estudios han ahondado en el estudio de la capacitación espermática, pero todavía no se conocen totalmente los mecanismos moleculares implicados.

Así, la **capacitación** se define como el **conjunto de cambios moleculares y fisiológicos** que deben sufrir los espermatozoides **para adquirir la capacidad fecundante**. Entre los cambios que se producen durante la capacitación espermática, se da un aumento de la fluidez y la permeabilidad de membrana, gracias a la **salida de colesterol** de la misma (Davis *et al.*, 1979; Cross, 1998). Esto provoca una reorganización de la membrana plasmática en la región apical (Flesch and Gadella, 2000), que afecta a la funcionalidad de los microdominios de membrana, denominados balsas lipídicas (comúnmente denominadas en inglés *lipid rafts*). Se ha demostrado que la salida de colesterol de los *rafts* provoca su ruptura y activa eventos de

señalización que implican a las tirosín-quinatas, proteínas G y otras moléculas (Simons and Toomre, 2000), entre las que destaca la vía del cAMP-PKA (Boerke *et al.*, 2008). La salida de colesterol de la membrana se produce gracias a la presencia de sustancias aceptoras de colesterol presentes en el TRF, como la albúmina y las lipoproteínas de alta densidad (HDL), cuya presencia promueve la capacitación espermática (Langlais *et al.*, 1988; Osheroff *et al.*, 1999; Shadan *et al.*, 2004).

El **aumento en la permeabilidad de la membrana** plasmática durante la capacitación facilita la entrada de iones en la célula (Leahy and Gadella, 2015). En el epidídimo y en el plasma seminal, la concentración de ion potasio (K^+) es muy alta y la de bicarbonato (HCO_3^-) es muy baja, pero en el oviducto ocurre justo lo contrario (Vishwakarma, 1962; Brooks, 1983). Como consecuencia de los cambios en la concentración extracelular de iones, se produce la entrada de éstos en la célula. La variación en la concentración intracelular modifica el potencial de membrana del espermatozoide, regulando así la actividad de canales y transportadores de membrana (Munoz-Garay *et al.*, 2001; Demarco *et al.*, 2003).

La **entrada de HCO_3^-** en el espermatozoide es un factor determinante para la inducción de la capacitación (Visconti *et al.*, 2002). Éste activa a la adenilato ciclasa soluble (ACs), que transforma el adenosin 3'-5'-trifosfato (ATP) en AMP cíclico (AMPc). Así comienza una cascada de señalización celular, que implica la activación de la proteína quinasa A (PKA), y culminará con la fosforilación de proteínas implicadas en la capacitación espermática (Visconti *et al.*, 1999b; Harrison, 2004).

Otro ion imprescindible para la capacitación espermática es el **calcio (Ca^{2+})**, que actúa como segundo mensajero en la transducción de señales. La concentración intracelular de calcio puede aumentar en el espermatozoide por dos vías: por la entrada de calcio extracelular a través de canales, como los canales CatSper (del inglés *Cation Channels of Sperm*) específicos de espermatozoides (Carlson *et al.*, 2003); o por liberación desde los reservorios intracelulares, como el acrosoma, la envoltura nuclear redundante (RNE, *Redundant Nuclear Envelope*), y la pieza intermedia (Costello *et al.*, 2009). Uno de los mecanismos sugeridos por los que el calcio está implicado en la capacitación espermática, es mediante la regulación directa de los niveles de AMPc (Zaccolo and Pozzan, 2003) a través de la activación de la ACs (Garbers *et al.*, 1982). Además, la acción del calcio puede estar modulada por unión a otras moléculas, como la proteína calmodulina (Si and Olds-Clarke, 2000), que mantendría los

niveles de calcio elevados a través de la inhibición de una fosfodiesterasa y una ATPasa dependientes de calcio (Chaudhry and Casillas, 1988), aumentando así los niveles de AMPc. Por último, hay evidencias de la implicación del Ca^{2+} en la hiperactivación flagelar, así como en la orientación espermática por quimiotaxis (revisado por Rahman *et al.* (2014). Todos estos eventos que conducen a la capacitación espermática se recogen en la **Figura 4**.

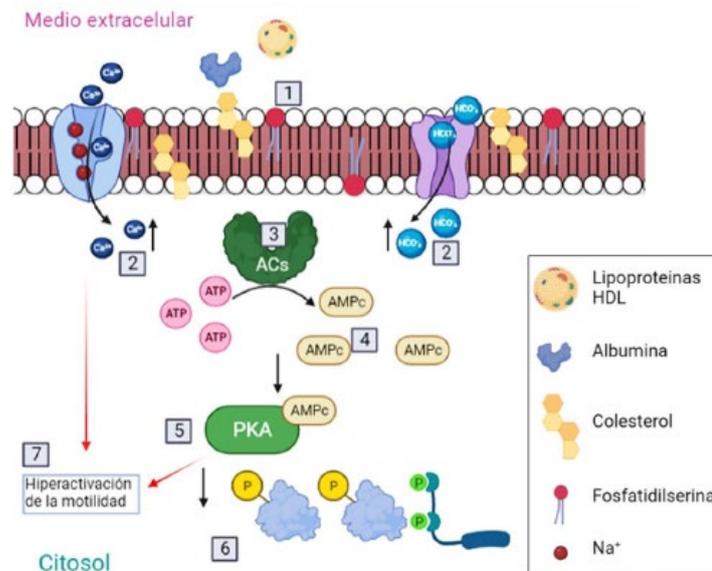


Figura 4. Eventos de la capacitación espermática 1) Secuestro de colesterol por el ambiente uterino; 2) incremento en la concentración de calcio y bicarbonato intracelular; 3) activación de la adenilato ciclasa soluble (ACs); 4) incremento en la producción de AMPc; 5) activación de la proteína quinasa A (PKA); 6) fosforilación de proteínas en residuos de tirosina; 7) el incremento de calcio y bicarbonato, junto con la activación de la PKA son rutas que inducen la hiperactivación de la motilidad. Imagen realizada en Biorender.com, basado en Gadella y Luna (2014).

Para que la capacitación se produzca, también debe haber un equilibrio en los niveles de **especies reactivas de oxígeno (ROS)**, entre las que se incluyen el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno o el óxido nítrico. Es necesario que haya unos niveles fisiológicos de ROS en el espermatozoide, ya que regulan la capacitación, entre otros procesos (de Lamirande and Gagnon, 1995; de Lamirande and Lamothe, 2009), pero si se producen en exceso pueden ser perjudiciales para la funcionalidad del espermatozoide (revisado en Dutta *et al.* (2019), como se explicará más adelante.

La **capacitación espermática también puede inducirse *in vitro***. Para ello, además de mantener las condiciones de temperatura y humedad semejantes a las del TRF, hay que añadir una serie de compuestos que inicien las vías de señalización descritas anteriormente. En la

especie ovina, el contenido de colesterol en la membrana del espermatozoide es muy bajo, en comparación con otras especies como el humano y el toro, por lo que la salida de colesterol podría no ser un factor determinante en el momento de promover la capacitación, y por ello resulta más difícil inducirla *in vitro* (Davis, 1981; Colas *et al.*, 2008). Como sustancia aceptora de colesterol en los medios de capacitación se suele usar albúmina sérica bovina (BSA), en lugar de las HDLs que se encontrarían en los fluidos oviductales *in vivo*. También se utilizan metil- β -ciclodextrinas (M- β -CD), que tienen una alta afinidad por los esteroides, y se ha visto que ayudan a promover *in vitro* la fosforilación de tirosinas asociada a la capacitación en ratón, toro (Visconti *et al.*, 1999a), caballo (Pommer *et al.*, 2003) y humano (Osheroff *et al.*, 1999). Sin embargo, en la especie ovina se ha visto que la inducción de la capacitación *in vitro* puede ser relativamente independiente de la presencia de BSA y/o β -ciclodextrinas, aunque ambos compuestos demostraron ser eficaces como aceptores de colesterol de la membrana (Colas *et al.*, 2008).

Dada la importancia del bicarbonato en la regulación molecular de la capacitación, también es necesario incluirlo en los medios de capacitación *in vitro*, como han demostrado numerosos estudios en diferentes especies, como la murina (Lee and Storey, 1986), bovina (Breininger *et al.*, 2010), porcina (Gadella and Harrison, 2000), humana (Battistone *et al.*, 2013) y ovina (Grasa *et al.*, 2006). Por otro lado, la influencia del calcio extracelular en la capacitación espermática ha sido ampliamente demostrada, ya que está involucrado en la regulación de la transducción de señales en el espermatozoide. No obstante, mientras algunos autores apoyan la necesidad de añadir calcio al medio de capacitación *in vitro* (Visconti *et al.*, 1995a; Petrunkina *et al.*, 2001; Tardif *et al.*, 2003), otros han descrito el efecto negativo del calcio sobre la modulación de la fosforilación de tirosinas, y proponen que su papel *in vivo* sería la de mantener al espermatozoide descapacitado hasta el momento de la fecundación (Luconi *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 2004). Nuestro grupo de investigación demostró que para capacitar los espermatozoides ovinos *in vitro* hay que añadir calcio y bicarbonato al medio extracelular (Pérez-Pé *et al.*, 2002; Grasa *et al.*, 2006), pero además, que es necesario mantener elevados los niveles intracelulares de AMPc (Grasa *et al.*, 2006). Para ello, se emplean análogos permeables del AMPc, como el dibutilil-AMP (db-cAMP), e inhibidores de las fosfodiesterasas (PDEs, enzimas que degradan al AMPc) como la cafeína y la teofilina, para mantener los altos niveles de AMPc. Finalmente, la adición de un inhibidor de fosfatasa de

amplio espectro, el ácido okadaico, permite mantener el nivel de fosforilación de las proteínas necesaria para culminar el proceso de capacitación.

2.2.2.1. Regulación de la capacitación por cascadas de señalización celular

En los últimos años, numerosos estudios se han centrado en dilucidar las rutas moleculares de transducción de señal que se activan durante la capacitación espermática. Dada la capacidad limitada de respuesta genómica del espermatozoide y su incapacidad para transcribir el ADN, es lógico pensar que los mecanismos de regulación de esta célula son particulares y diferentes de los de las células somáticas, destacando el papel de quinasas y fosfatasas.

2.2.2.1.1. Vía de señalización ACs/AMPC/PKA

La ruta clásica de activación de la capacitación espermática es la **vía de señalización ACs/AMPC/PKA** (Visconti *et al.*, 1995b; Colas *et al.*, 2008; Buffone *et al.*, 2014). El AMPC es un segundo mensajero central y ubicuo en muchos tipos celulares. En los espermatozoides, como en las células somáticas, el aumento de la concentración intracelular de AMPC depende de la activación de la adenilato ciclasa (AC), que en espermatozoides se presenta mayoritariamente como **adenilato ciclasa soluble (ACs)** (Braun and Dods, 1975; Hess *et al.*, 2005). La activación de esta ACs, principalmente por el mencionado aumento en la concentración de iones calcio y bicarbonato durante la capacitación espermática (revisado por Salicioni *et al.* (2007)), transforma el adenosín 3'-5' trifosfato (ATP) en adenosín monofosfato cíclico (**AMPC**). Sin embargo, el papel del calcio en la activación de la ACs no parece estar tan claro, ya que en espermatozoides porcinos se puede inducir la capacitación completa en un medio sin calcio (Harrison and Gadella, 2005), por lo que este ion podría no ser esencial para activar la vía AMPC/PKA en algunas especies. No obstante, tanto en el ratón (Litvin *et al.*, 2003) como en la especie ovina (Pérez-Pé *et al.*, 2002; Grasa *et al.*, 2006), se requiere la presencia tanto de calcio como de bicarbonato para inducir la capacitación *in vitro*. Es importante señalar que ni el nivel de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, ni los niveles de AMPC detectados en el espermatozoide ovino, alcanzan los valores descritos por Visconti en espermatozoides capacitados de otras especies (Visconti *et al.*, 1995a). Esto podría deberse a los altos niveles de **fosfodiesterasas (PDEs)** que estarían degradando al AMPC. Es más, hay evidencias de que la degradación de AMPC en el espermatozoide ovino es hasta 100 veces mayor que su síntesis

por la AC (Tash, 1976), de ahí la necesidad de incluir inhibidores de las PDEs en el medio de capacitación *in vitro* (Grasa *et al.*, 2006; Colas *et al.*, 2008).

El AMPc generado durante la capacitación estimula la activación de la **protein quinasa A (PKA)** (Lefievre *et al.*, 2002), la cual fosforila proteínas en residuos de serina/treonina (Gronborg *et al.*, 2002; O'Flaherty *et al.*, 2004a) y en residuos de tirosina (Visconti and Kopf, 1998; Gadella and Harrison, 2002).

2.2.2.1.2. Señalización por EGF/EGFR y MAPKs

Nuestro grupo de investigación evidenció, por primera vez, una ruta alternativa a la clásica para inducir la capacitación *in vitro* en espermatozoides ovinos (Luna *et al.*, 2012). La activación de esta ruta está estimulada por la unión del **factor de crecimiento epidérmico** (EGF, del inglés *Epidermal Growth Factor*) a su receptor en la membrana plasmática (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*), e implica la participación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*).

Las **MAPKs** son una familia de enzimas altamente conservadas evolutivamente en eucariotas, y pertenecen a una familia de serín/treonín quinasas que participan en el control de la respuesta celular a diferentes estímulos de estrés físico y químico, como mitógenos, estrés térmico y osmótico, y citoquinas proinflamatorias. Están involucradas en numerosas funciones celulares, como la proliferación y el crecimiento celular, la supervivencia, la diferenciación, la migración y en la apoptosis (Seger and Krebs, 1995; Pearson *et al.*, 2001; Cowan and Storey, 2003; Yoon and Seger, 2006).

Las MAPKs se organizan en módulos, según el estímulo que las activa, y cada uno de ellos está compuesto por tres quinasas que se activan secuencialmente por fosforilación hasta llegar a la última, que actuará directamente sobre sus dianas intracelulares (Widmann *et al.*, 1999; Kyriakis and Avruch, 2012). En mamíferos, se han descrito cuatro cascadas de MAPKs (Kyriakis and Avruch, 2012): quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs, *Extracellular Regulated Kinases*; ERK1/2); quinasas del extremo N-terminal del factor de transcripción c-Jun (JNKs, *Jun N-terminal Kinases*), también conocidas como quinasas activadas por estrés (SAPKs, *Stress Activated Protein Kinases*); quinasas del grupo de p38; y quinasas del grupo ERK5, también conocida como *Big MAPK* (BMK). La familia **ERK1/2** se ha relacionado principalmente con la proliferación y diferenciación celular, mientras que los módulos **JNK** y **p38** parecen

regular preferentemente las respuestas de inflamación y apoptosis (revisado por Zhang y Liu (2002)). Sin embargo, lo que comparten estos tres módulos es su modo de activación, ya que todas las MAPKs requieren ser doblemente fosforiladas en residuos de treonina y tirosina para ejercer sus funciones (Raman *et al.*, 2007). Entre los mecanismos de activación de las MAPKs se incluyen los receptores con actividad tirosín quinasa (RTKs, del inglés *Receptor Tyrosine Kinase*) y los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, del inglés *G protein coupled-receptors*). De esta manera, los estímulos que activan a estos receptores promueven la cascada de fosforilaciones mediada por las MAPKs de manera secuencial, transmitiendo así la señal extracelular a sus dianas intracelulares: enzimas específicas del citoplasma, componentes del citoesqueleto y factores de transcripción nucleares.

Los distintos módulos no son del todo independientes, pues una misma quinasa puede activar distintas vías, y algunos factores de transcripción pueden ser activados por distintas cascadas de MAPKs (Garrington and Johnson, 1999; Schaeffer and Weber, 1999). Por lo tanto, hay que entender que las rutas de transducción de señales no siempre se comportan de manera lineal (**Figura 5**).

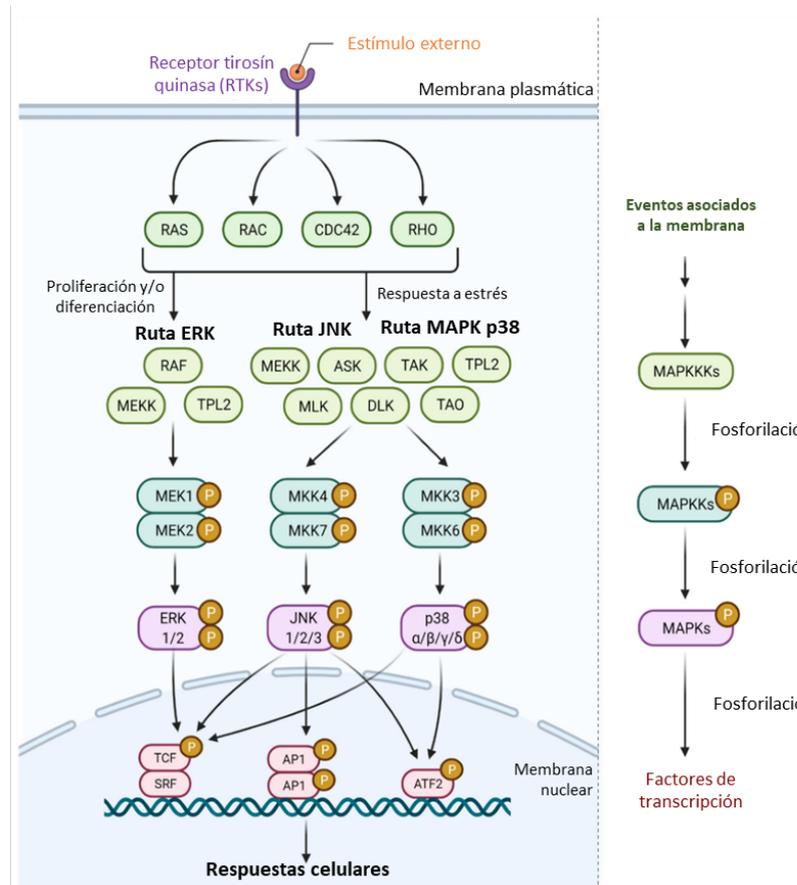


Figura 5. Esquema de las cascadas de activación de los principales grupos de MAPKs: módulo ERK1/2, módulo JNK y módulo p38. La activación de las MAPKs incluye la fosforilación y activación secuencial de distintas proteínas por acción de diferentes quinasas específicas: las MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK) y las MAP quinasa quinasa (MKK). Los estímulos extracelulares, tras unirse a su receptor, desencadenan la activación del primer miembro de la cascada, las MAPKKK, y finalmente se activan las MAPKs como ERK1/2, JNK y p38, que tendrán efectos sobre los factores de transcripción. Imagen modificada de Pua et al. (2022).

La implicación de la cascada de proteínas de MAPKs en la funcionalidad espermática se ha evidenciado en numerosos estudios (revisado por Almog y Naor (2010)). La mayoría de los módulos de MAPKs (ERK, JNK y p38) están presentes en tejidos del tracto reproductor masculino, jugando un papel esencial en la espermatogénesis (Sette *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1999; Crepieux *et al.*, 2001; Wong and Cheng, 2005). Asimismo, se ha demostrado el papel modulador de las MAPKs en la motilidad espermática, concretamente en la hiperactivación flagelar, y en la reacción acrosómica (Almog *et al.*, 2008).

Además, se ha confirmado la implicación de la ruta de las MAPKs en la capacitación de espermatozoides humanos (Luconi *et al.*, 1998; de Lamirande and Gagnon, 2002), murinos (Nixon *et al.*, 2010), porcinos (Awda and Buhr, 2010) y ovinos (Luna *et al.*, 2012).

Como se ha mencionado anteriormente, en la especie ovina, es el **factor de crecimiento epidérmico (EGF)** el que **promueve la capacitación espermática a través de la ruta de las MAPKs** (Luna *et al.*, 2012). En espermatozoides humanos se ha observado también este efecto capacitante (Furuya *et al.*, 1993), mientras que en ratón el EGF estimula la reacción acrosómica (Furuya *et al.*, 1994). Asimismo, se ha descrito la implicación del EGF en la capacitación y reacción acrosómica en espermatozoides bovinos (Etkovitz *et al.*, 2009; Daniel *et al.*, 2010; Breitbart and Etkovitz, 2011). Los mecanismos de señalización del EGF para estimular la reacción acrosómica implicarían la activación de la fosfolipasa C (PLC) por la actividad tirosín quinasa asociada al EGFR, que a su vez generaría segundos mensajeros (diacilglicerol, DAG, e inositol trifosfato, IP3), y éstos activarían a la proteína quinasa C (PKC) y la liberación del calcio de reservorios intracelulares (Lax *et al.*, 1994).

Tras la unión del EGF a su receptor, éste dimeriza y sufre autofosforilación cruzada gracias a su actividad tirosín quinasa, activando así numerosas rutas de señalización (Singh and Harris, 2005) (**Figura 6**). El receptor activo de EGF se ha localizado en espermatozoides porcinos (Oliva-Hernandez and Perez-Gutierrez, 2008), humanos (Damjanov *et al.*, 1993) y ovinos (Luna *et al.*, 2012). En la especie que se estudia en esta tesis doctoral, la ovina, se ha descrito una activación del receptor EGFR durante la capacitación espermática inducida por EGF, desencadenando una cascada de señalización intracelular que culmina con la activación de las MAPKs ERK1/2, JNK y p38. A su vez, la implicación de JNK y p38 en procesos apoptóticos en el espermatozoide ovino pone de manifiesto que la capacitación y la apoptosis comparten mecanismos moleculares y vías de señalización, como se explicará más adelante.

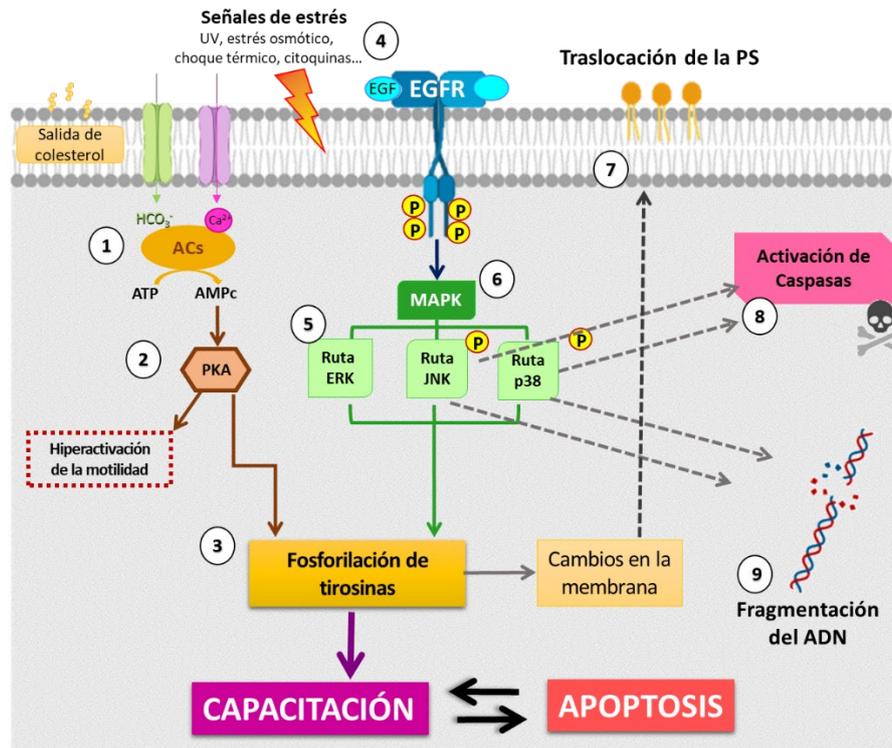


Figura 6. Esquema representativo de las vías de señalización implicadas en la regulación de la capacitación y la apoptosis en el espermatozoide ovino. La vía clásica de capacitación, que incluye la activación de la ACs y el aumento de AMPc, activa a la PKA, que finalmente dará lugar a la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina (1-3). La MAPK ERK1/2 está involucrada en la capacitación espermática en ovino a través de su activación por la vía de las MAPKs desencadenada por la unión del EGF a su receptor (4-5). Tanto la unión EGF/EGF-R como la presencia de señales de estrés, activan paralelamente las cascadas de señalización de los módulos de MAPK JNK y p38 (4-6). La activación de estas MAPKs a su vez estimulan procesos relacionados con la apoptosis, como la inversión de la fosfatidilserina, la activación de caspasas, o la fragmentación del ADN (7-9).

2.2.3. Reacción acrosómica y unión a la zona pelúcida

Para que se produzca la fecundación, el espermatozoide capacitado debe atravesar la **zona pelúcida (ZP)** del ovocito. La ZP es una capa de polisacáridos que rodea a la membrana plasmática del ovocito, y contiene glicoproteínas especie-específicas con un papel fundamental en el reconocimiento espermatozoide-ovocito (revisado por Balbach *et al.* (2020)).

La **reacción acrosómica (RA)** es un proceso de exocitosis que permite al espermatozoide penetrar en la ZP del ovocito, por lo que es fundamental para fecundarlo con éxito. Consiste en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana externa del acrosoma, formándose así poros entre ellas por los que se libera el contenido

acrosomal, que consta mayoritariamente de enzimas proteolíticas que digirán la ZP para permitir el avance a su través (Mack *et al.*, 1983; Kim *et al.*, 2011).

Hasta hace unos años, se creía que la reacción acrosómica únicamente tenía lugar tras la unión del espermatozoide a la ZP (revisado por Hirohashi y Yanagimachi (2018)), pero estudios recientes han demostrado que, al menos en algunas especies, este proceso podría iniciarse antes de esta unión, en zonas del istmo y la ampolla (Inoue *et al.*, 2011; La Spina *et al.*, 2016). Otros estudios sostienen que la RA podría ser promovida por las células del *cumulus* (Jin *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2014). Por último, cabe añadir que es posible que la RA también se produzca de forma espontánea, como un proceso asociado a la senescencia espermática y provocando una baja tasa de fecundación (Cummins *et al.*, 1991; Wiser *et al.*, 2014).

El proceso de reacción acrosómica se describió en mamíferos por primera vez en 1958 (Austin and Bishop), y más tarde se descubrió que, al menos de forma fisiológica, sólo los espermatozoides capacitados son capaces de experimentar la reacción acrosómica (Saling and Storey, 1979), lo que resulta lógico, pues han tenido que alcanzar al ovocito, y para ello es fundamental la hiperactivación flagelar resultante de la capacitación (Stauss *et al.*, 1995). Así, los eventos asociados a la capacitación descritos anteriormente, como el aumento del calcio intracelular, la producción de ROS, el aumento del AMPc y la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, también intervienen en la inducción de la reacción acrosómica (Yanagimachi, 1994a; Aitken *et al.*, 1995; Doherty *et al.*, 1995; Leclerc and Kopf, 1995).

La RA también se desencadena por la unión de determinados ligandos a la membrana del espermatozoide (revisado por Vigil *et al.* (2011)). Entre los ligandos fisiológicos que modulan la RA se encuentran las glicoproteínas constitutivas de la ZP del ovocito, la progesterona, el EGF y otros compuestos presentes en los fluidos del TRF (Osman *et al.*, 1989; Lax *et al.*, 1994; Harper *et al.*, 2006; Florman *et al.*, 2008). La unión de los ligandos a sus receptores en el espermatozoide da lugar a la activación de los mismos (**Figura 7**) y, como consecuencia, se abren canales de calcio presentes en la membrana plasmática y en la membrana acrosomal externa, provocando un aumento de calcio en el citoplasma (revisado por Breitbart (2002)). La activación de los receptores puede dar lugar, por un lado, a la activación de la vía AC/AMPc/PKA y, por otro, a la de la PLC. Ambas rutas de señalización molecular desencadenan finalmente la liberación de calcio desde el interior del acrosoma al

citosol del espermatozoide (revisado por Simons y Fauci (2018)). El **papel del calcio es crucial en el transcurso de la reacción acrosómica** (Breitbart and Spungin, 1997).

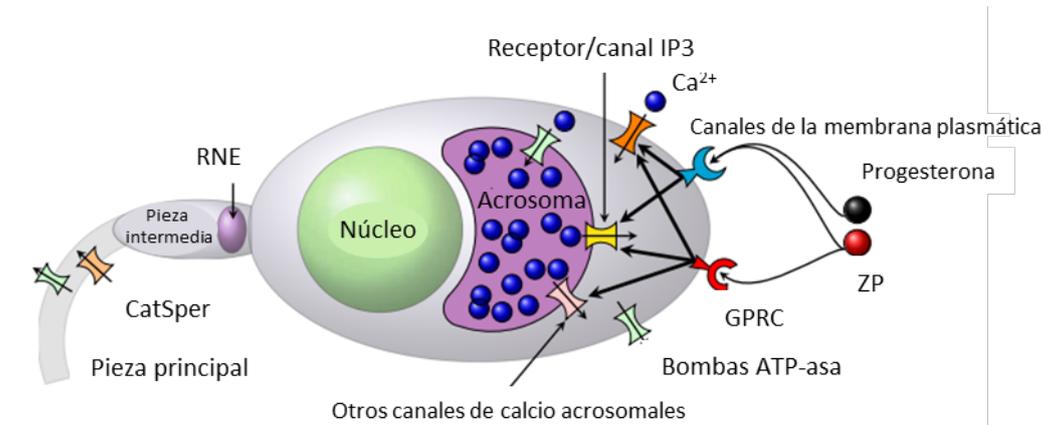


Figura 7. Diagrama representativo de los mecanismos moleculares de la RA en los espermatozoides de mamíferos. Imagen modificada de Simons y Fauci (2018).

2.3 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo consiste en el **desequilibrio en los niveles de sustancias oxidantes y antioxidantes**, debido a un exceso en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o al fallo en la acción de los sistemas antioxidantes de la célula (Sikka *et al.*, 1995).

La **célula espermática es capaz de generar ROS de manera fisiológica** (Tosic and Walton, 1946) y su papel es esencial para la regulación de procesos como la capacitación, la hiperactivación, la reacción acrosómica y la fusión de membranas durante la fecundación (de Lamirande and Gagnon, 1995; de Lamirande and O'Flaherty, 2008; O'Flaherty, 2015). Sin embargo, el **exceso de ROS tiene un efecto perjudicial para los espermatozoides (Figura 8)** y puede causar daños a nivel de membrana plasmática por la peroxidación lipídica que sufren sus ácidos grasos, producir la fragmentación y alteraciones en el ADN del espermatozoide, y además se ha relacionado con el proceso de apoptosis, causando infertilidad (revisado por Dutta (2019)). Estos daños son mayores en espermatozoides epididimarios que en los del eyaculado, ya que éstos últimos están protegidos por los agentes de defensa antioxidante aportados por las glándulas accesorias al plasma seminal (Balercia *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003). El **papel antioxidante del plasma seminal** se debe, por un lado, a la presencia de enzimas capaces de eliminar las ROS, como la catalasa (Zini *et al.*, 2002; Juyena and Stelletta, 2012), la superóxido dismutasa (también presente en los espermatozoides eyaculados)

(Eghbali *et al.*, 2008; Juyena and Stelletta, 2012), la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa (Marti *et al.*, 2008a; Juyena and Stelletta, 2012; Brigelius-Flohe and Maiorino, 2013), y por otro, a diversas moléculas antioxidantes no enzimáticas, como la melatonina (Luboshitzky *et al.*, 2002; Awad *et al.*, 2006; Casao *et al.*, 2010a), el glutatión y las vitaminas C y E (revisado en Juyena y Stelletta (2012)), que pueden proteger al espermatozoide del estrés oxidativo reaccionando directamente con las ROS (Kefer *et al.*, 2009).

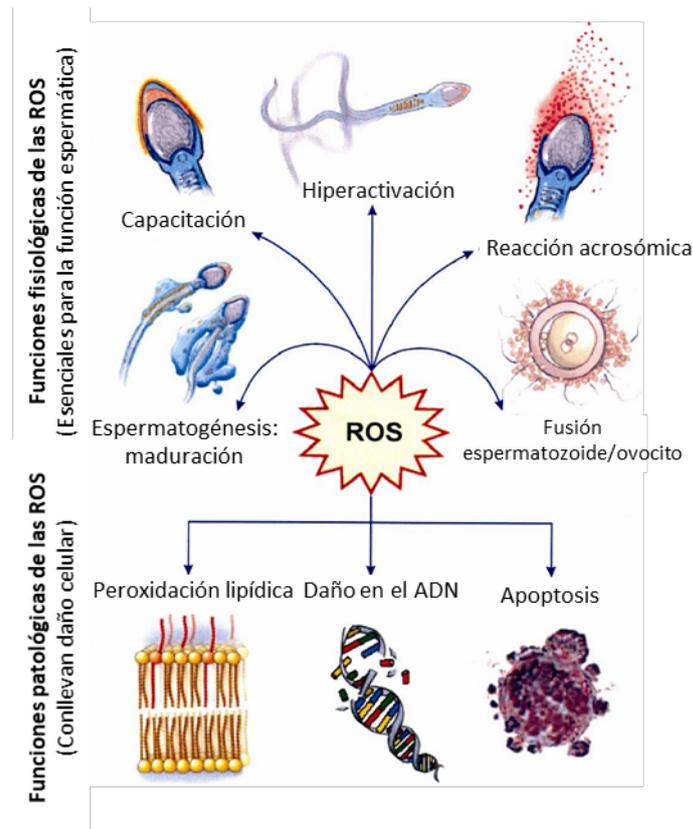


Figura 8. Efectos fisiológicos y dañinos de ROS en la funcionalidad espermática. Imagen modificada de Kothari *et al.* (2010).

Las ROS, gracias a su naturaleza reactiva, son capaces de combinarse rápidamente con otras moléculas causando una oxidación que provocará cambios estructurales y funcionales en la célula. Entre las ROS destacan el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($OH\cdot$) y el óxido nítrico ($NO\cdot$), aunque este último a veces se considera un subtipo de ROS o se engloba dentro de las especies reactivas de nitrógeno (RNS, del inglés *Reactive Nitrogen Species*).

En los espermatozoides de mamíferos, se considera que la fuente principal de generación de ROS es a través de la enzima **NADPH oxidasa (NOX)**, que produce anión

superóxido (Bedard and Krause, 2007). La isoforma predominante en espermatozoides de mamífero es la NOX5, que se ha detectado en la especie humana (Musset *et al.*, 2012; Ghani *et al.*, 2013), equina (Sabeur and Ball, 2007) y canina (Setyawan *et al.*, 2016). La particularidad de esta isoforma es que su activación es totalmente dependiente de calcio (Banfi *et al.*, 2004). El anión superóxido dismuta, espontáneamente o a través de enzimas, en H₂O₂ (Halliwell and Gutteridge, 1989). Esta molécula es muy soluble en agua y puede atravesar la membrana plasmática, por lo que tiene gran capacidad de oxidación y puede actuar lejos del punto de origen. Se ha demostrado que la presencia de H₂O₂ en el medio afecta negativamente a la motilidad espermática en morueco (Peris *et al.*, 2007), búfalo (Garg *et al.*, 2009), toro (Bilodeau *et al.*, 2001) y humano (Chaki and Misro, 2002), además de alterar la actividad mitocondrial de los espermatozoides de ciervo (Martinez-Pastor *et al.*, 2009). Por otro lado, esta molécula también aumenta la peroxidación lipídica en espermatozoides de búfalo y toro (Bilodeau *et al.*, 2001; Garg *et al.*, 2009), y afecta al ADN espermático en moruecos (Peris *et al.*, 2007). Además, el H₂O₂ puede generar **radicales hidroxilo (OH·)** (Gibson *et al.*, 1958), que es una de las sustancias químicas más reactivas que se conocen, y que reacciona muy cerca de su lugar de generación con la mayoría de las biomoléculas, como azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, nucleótidos y ácidos orgánicos (Cheeseman and Slater, 1993).

Sin embargo, la activación de la **NOX5 también está implicada en los procesos fisiológicos del espermatozoide**, como la motilidad, la viabilidad y la capacitación (Ghanbari *et al.*, 2018). El superóxido generado por esta enzima, así como los peróxidos derivados, activan a la ACs y, por consiguiente, la vía ACs/AMPC/PKA que provocará finalmente la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina asociada a la capacitación espermática, como se ha descrito en humano y rata (Zhang and Zheng, 1996; O'Flaherty, 2015; Moreno-Irusta *et al.*, 2020).

Por otro lado, el **óxido nítrico (NO·)** se genera a partir de la L-arginina por la enzima **óxido nítrico sintasa** (NOS, del inglés *nitric oxide synthase*). Esta enzima se ha identificado en espermatozoides de humano (O'Bryan *et al.*, 1998; Revelli *et al.*, 1999; Francavilla *et al.*, 2000), toro (Meiser and Schulz, 2003), ratón (Herrero *et al.*, 1996) y cerdo (Aquila *et al.*, 2011). Este radical libre también está involucrado en numerosos procesos fisiológicos del espermatozoide, actuando como una molécula señalizadora (Herrero *et al.*, 2003) (**Figura 9**). Puede actuar a través de la ruta de señalización del guanisín monofosfato cíclico (GMPc)

(Murad, 1994), que modula canales de membrana y regula la capacitación espermática (Revelli *et al.*, 2001; Miraglia *et al.*, 2011). Pero además, el óxido nítrico es capaz de actuar sobre la vía del AMPc (Roy and Atreja, 2008; Staicu *et al.*, 2021), probablemente nitrosilando a la adenilato ciclasa (McVey *et al.*, 1999), y activar la ruta de las MAPK ERK1/2 (Herrero *et al.*, 2000), que está involucrada en la fosforilación de tirosinas asociada a la capacitación espermática (revisado por Staicu y Matás (2017)). Así, el óxido nítrico está implicado en la regulación de la motilidad (Donnelly *et al.*, 1997), la viabilidad (Buzadzic *et al.*, 2015), la hiperactivación (Lewis *et al.*, 1996; Yeoman *et al.*, 1998), la capacitación (Zini *et al.*, 1995; de Lamirande and Lamothe, 2009), la reacción acrosómica (Revelli *et al.*, 2001; Herrero *et al.*, 2003), la quimiotaxis (Miraglia *et al.*, 2007) y la unión a la ZP (Sengoku *et al.*, 1998) en espermatozoides. Además, se le ha atribuido un efecto antiapoptótico en espermatozoides (Roessner *et al.*, 2010). Sin embargo, a concentraciones elevadas, el óxido nítrico afecta negativamente a la funcionalidad espermática (Weinberg *et al.*, 1995; Nobunaga *et al.*, 1996; Ratnasooriya and Dharmasiri, 2001; Hassanpour *et al.*, 2007).

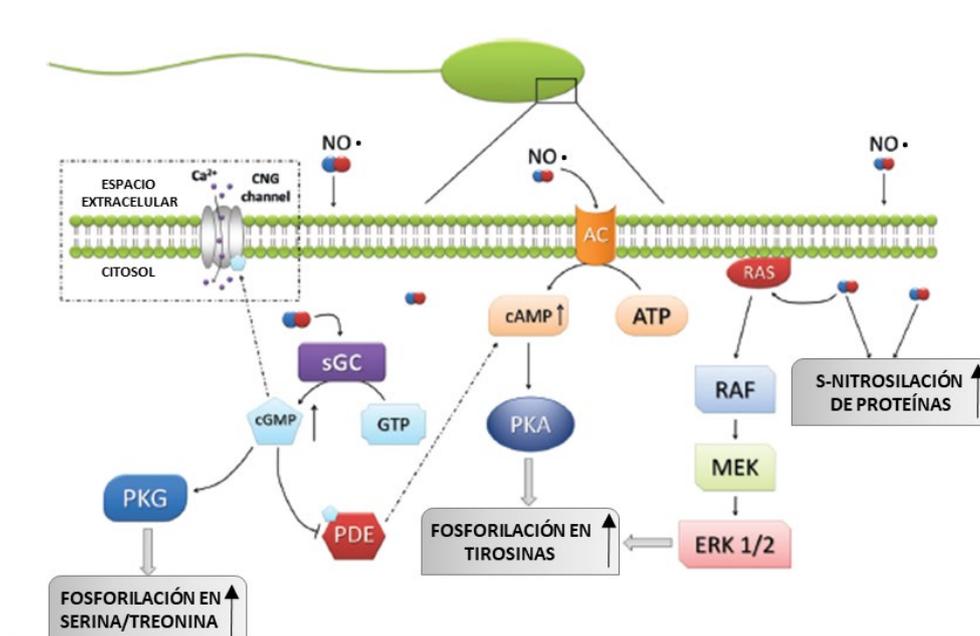


Figura 9. Esquema representativo de las principales rutas de actuación del óxido nítrico en el espermatozoide. Imagen modificada de Staicu y Matás (2017).

2.4 La apoptosis en espermatozoides

La apoptosis o muerte celular programada es un conjunto de procesos morfológicos y bioquímicos que dan lugar a la **autodestrucción celular** (Lockshin and Williams, 1964). La muerte celular por apoptosis se produce de manera controlada, y se trata de un proceso de regulación y control de las poblaciones celulares en tejidos bajo condiciones tanto fisiológicas, para mantener equilibrio homeostático durante el desarrollo y envejecimiento de los tejidos, como patológicas. Así se controla el número de células y el tamaño del tejido, pero además se eliminan células infectadas, dañadas o estresadas (O'Brien and Kirby, 2008). Por tanto, las alteraciones en la regulación del proceso apoptótico están relacionadas con algunas patologías.

Cuando una célula muere por apoptosis se producen una serie de cambios morfológicos, como la disminución del tamaño celular, la formación de burbujas en la membrana plasmática, y la formación de cuerpos apoptóticos, pero sin perder la integridad celular. Estos procesos están regulados intrínsecamente por la propia célula, gracias a la implicación de algunos genes en la apoptosis, que se identificaron hace más de 30 años en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Ellis and Horvitz, 1991) y posteriormente en mamíferos. *In vivo*, los macrófagos y células epiteliales adyacentes reconocen estos cuerpos apoptóticos y los fagocitan. De esta manera se evita la respuesta inflamatoria por parte del organismo, ya que no se libera el contenido citoplasmático de las células apoptóticas, al contrario de lo que ocurre en la muerte por necrosis, que implica la lisis total de la célula a través un proceso pasivo y no autorregulado (Vermes and Haanen, 1994).

Este fenómeno ha sido estudiado en profundidad en células somáticas, pero no tanto en espermatozoides. Se produce apoptosis durante la espermatogénesis, como proceso homeostático y para eliminar células germinativas defectuosas (Rodríguez *et al.*, 1997), pero también se observan células apoptóticas en el eyaculado. Algunos autores lo atribuyen a la presencia de los restos de espermatozoides inmaduros (Paasch *et al.*, 2004) y otros a un fenómeno de “apoptosis testicular abortiva”, según la cual algunos espermatozoides con daño en el ADN comienzan el mecanismo de apoptosis en el testículo, pero luego escapan del proceso y llegan al eyaculado (Sakkas *et al.*, 2004). Otros autores lo asocian a causas patológicas, sobre todo cuando aparece un alto porcentaje de espermatozoides apoptóticos en el eyaculado (Oehninger *et al.*, 2003). Por otra parte, según numerosos trabajos, los

espermatozoides maduros, una vez eyaculados, son capaces de iniciar y completar el proceso de apoptosis (Anzar *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2004; Marti *et al.*, 2008b). Es lógico pensar que los espermatozoides en el tracto reproductor femenino, tras la finalización de su tiempo de vida inherente, o al no alcanzar el ovocito y no llevar a cabo la función para la que han sido generados, se eliminen por un proceso apoptótico, ya que de esta manera su destrucción no produciría ningún efecto perjudicial en el tracto reproductor femenino ni en el resto de espermatozoides ni células circundantes (Eisenbach, 2003). Además, la apoptosis en los espermatozoides también se activaría como un mecanismo de eliminación de las células anormales, o en respuesta al estrés ambiental; por ejemplo, se han observado características semejantes a las descritas en el fenómeno de apoptosis en espermatozoides sometidos a la acción del frío (Martin *et al.*, 2004). Cualquiera que sea la causa, la presencia de espermatozoides con características apoptóticas en las dosis seminales podría ser uno de los indicadores de baja fertilidad, como se ha visto en la especie humana (Said *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2009), en toro (Anzar *et al.*, 2002), en morueco (Mendoza *et al.*, 2021) y en cerdo (Trzcińska *et al.*, 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, los espermatozoides experimentan un proceso de maduración en el tracto reproductor femenino, denominado capacitación espermática (Austin, 1951; Chang, 1951; Austin, 1952; Chang, 1955). Este proceso es dependiente de los niveles de ROS, ya que el anión superóxido y el óxido nítrico generados se combinan y producen peroxinitrito, que suprime la actividad tirosín fosfatasa y, simultáneamente se activa la ACs. Como consecuencia, se intensifica la generación de AMPc y la fosforilación de tirosinas que conducen a la capacitación espermática, pero también se oxida el colesterol de la membrana plasmática y se facilita su salida, aumentando la fluidez de la misma y permitiendo la fusión de membranas durante la fecundación. Si el espermatozoide no fecunda al ovocito, se mantiene la generación de estas ROS y ponen al límite las defensas antioxidantes de los espermatozoides, provocando una situación de estrés oxidativo. La producción desmesurada de ROS produce, por un lado, altos niveles de peroxidación lipídica en la membrana plasmática, que pierde su integridad y, por otro, daño en el ADN, lo que está relacionado con el proceso de apoptosis (revisado por Aitken (2011), Aitken y Baker (2013) y Asadi *et al.* (2021)) **(Figura 10)**.

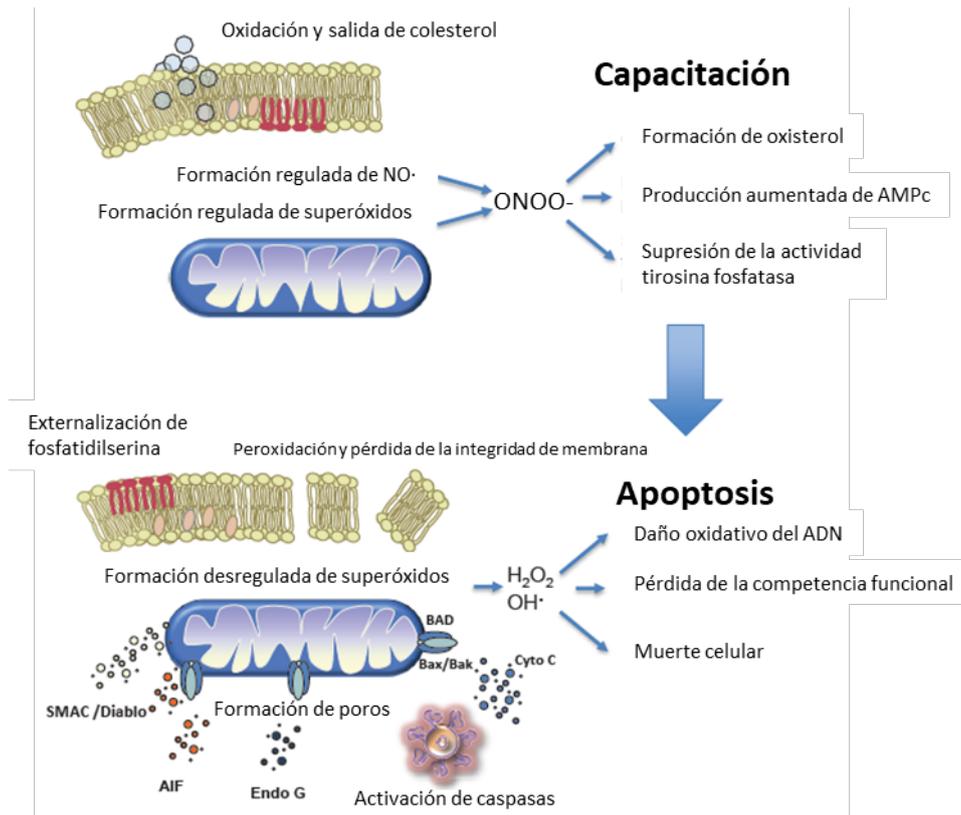


Figura 10. Esquema representativo de los procesos que acontecen durante la capacitación y la apoptosis en espermatozoides de mamífero. Imagen modificada de Aitken y Baker (2013).

En los espermatozoides no son apreciables los cambios morfológicos descritos para las células somáticas durante la apoptosis, como el cambio en el tamaño celular o del núcleo, pero sí son evidentes otras alteraciones bioquímicas. Entre estas se encuentran la translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática (Barroso *et al.*, 2000; Duru *et al.*, 2001; Koppers *et al.*, 2011), la activación de caspasas (Weng *et al.*, 2002; Paasch *et al.*, 2003; Paasch *et al.*, 2004; Said *et al.*, 2004), y la fragmentación del ADN (Gorczyca *et al.*, 1993; Sakkas *et al.*, 1999; Barroso *et al.*, 2000; Sakkas *et al.*, 2004).

En la especie ovina, nuestro grupo de investigación fue el primero en demostrar que los espermatozoides eyaculados presentan estos marcadores de apoptosis (Marti *et al.*, 2006; Marti *et al.*, 2008b), además de una disminución del potencial de membrana mitocondrial interna, debido a la despolarización de las mitocondrias durante la apoptosis (Mendoza *et al.*, 2013). Asimismo, se ha demostrado que estos marcadores apoptóticos aumentan tras la inducción de la capacitación y la reacción acrosómica *in vitro* (Peris *et al.*, 2007; Marti *et al.*, 2008b; Pérez-Pé *et al.*, 2010).

La **translocación de fosfatidilserina** (PS, *phosphatidylserine*) desde la parte interna a la externa de la membrana plasmática del espermatozoide (Martin *et al.*, 1995) está relacionada con una modulación de la respuesta inmune (Devitt and Marshall, 2011), ya que sirve de marcaje para que los fagocitos del tracto reproductor femenino o masculino reconozcan a los espermatozoides apoptóticos y los eliminen por fagocitosis, evitando así una respuesta inflamatoria que dañaría los tejidos (Fadok *et al.*, 1992; Savill *et al.*, 2002; Schlegel and Williamson, 2007; Zhou, 2007). La base bioquímica de la externalización de la PS no está del todo clara, y se han propuesto dos hipótesis. La primera implica la participación de una enzima (denominada escramblasa) que se activaría durante el proceso de apoptosis y sería capaz de translocar la PS a través de la membrana plasmática (Zhou *et al.*, 1997). Otro modelo sugiere que la PS se externalizaría como consecuencia del tráfico de lisosomas en la membrana del espermatozoide (Mirnikjoo *et al.*, 2009). Pero esto podría deberse no solo al proceso apoptótico, sino a las reorganizaciones de membrana asociadas a otros procesos, como la capacitación, por lo que la translocación de PS, por sí sola, no se consideraría un marcador de apoptosis (Martin *et al.*, 2005). El hecho de que la inversión de la PS se incremente tras la inducción de la capacitación espermática (Gadella and Harrison, 2002; de Vries *et al.*, 2003; Luna *et al.*, 2017) sugiere que es un evento asociado a la capacitación, pero para otros autores se debe al daño celular característico de la apoptosis (Muratori *et al.*, 2004; Kurz *et al.*, 2005). Por otro lado, en algunas células apoptóticas no se aprecia un aumento importante de este marcador (Gadella and Harrison, 2002). No obstante, la exposición de la PS en los espermatozoides capacitados podría ser una señal para su eliminación por fagocitosis una vez ya no son funcionales porque no han fecundado al ovocito (Eisenbach, 2003).

Los cambios morfológicos y bioquímicos característicos del proceso de apoptosis son mediados principalmente por la proteólisis de sustratos específicos gracias a la **activación de caspasas**. Las caspasas son proteasas que fragmentan sustratos tras cortar en sitios específicos, en concreto, después de los residuos de un ácido aspártico (de ahí su acrónimo en inglés: *cysteinyl aspartate-specific proteases*) (Alnemri *et al.*, 1996). Son proteasas altamente selectivas y están implicadas en distintos procesos celulares (revisado por Unsain *et al.* (2015)), siendo consideradas las enzimas clave en el proceso de apoptosis (Tripathi *et al.*, 2009; Shaha *et al.*, 2010). Existen **caspasas iniciadoras** (-2, -8, -9, y -10) que participan al comienzo del proceso de apoptosis, y cuya función es activar a las **caspasas ejecutoras** (-3, -6

y -7) (revisado por Grunewald *et al.* (2009). Éstas últimas, y especialmente la caspasa-3, son enzimas muy activas que proteolizan sustratos implicados en la estructura de la célula (como la actina), en cascadas de señalización (como proteín quinasas y citoquinas), en el control del ciclo celular y la reparación del ADN (como la poli-ADP-polirribosa o PARP), y en la motilidad espermática (revisado en Said *et al.* (2004) y Grunewald *et al.* (2009)). Por último, la activación de las MAPKs p38 y MEK/ERK, implicadas en la capacitación en la especie ovina, activan directamente la ruta de las caspasas (Pentikainen *et al.*, 1999; Ono and Han, 2000; Luna *et al.*, 2017).

Otra de las consecuencias características del proceso de apoptosis es la **fragmentación del ADN** (Arends *et al.*, 1990; Gorczyca *et al.*, 1993; Aitken and Koppers, 2011). En este proceso se produce una ruptura ordenada del ADN en determinados puntos, produciéndose una fragmentación de la cromatina entre nucleosomas cada 180-200 pares de bases. Se cree que están implicadas endonucleasas específicas de la apoptosis, ya que esta fragmentación del ADN es diferente a la que se produce en la necrosis, que se da de manera inespecífica (Collins *et al.*, 1997; Zhang and Xu, 2000). Por esta razón, la detección del ADN fragmentado ha sido usada ampliamente para detectar células apoptóticas (Matassov *et al.*, 2004). Dado que la misión esencial del espermatozoide es transmitir su material genético al ovocito, la alteración del ADN limitaría la fecundación exitosa y el desarrollo embrionario, por lo que es un factor a tener en cuenta a la hora de estudiar la infertilidad masculina (Oleszczuk *et al.*, 2013; Cho and Agarwal, 2018).

Como se ha mencionado anteriormente, es lógico que los procesos de capacitación y apoptosis compartan rutas moleculares en el espermatozoide, como demostraron los resultados de nuestro grupo (Luna *et al.*, 2017), ya que todos los espermatozoides que no cumplan con su misión de fecundar al ovocito deben ser eliminados sin producir respuesta inflamatoria en el TRF. Además, se ha demostrado que determinados componentes del plasma seminal, como proteínas (Mendoza *et al.*, 2013) y hormonas como la melatonina (Casao *et al.*, 2010b), son capaces de ejercer un efecto modulador tanto sobre la apoptosis como sobre la capacitación en espermatozoides ovinos. Por tanto, el conocimiento de estos procesos y de cómo ciertos compuestos pueden modularlos, resultaría de gran utilidad para la mejora de los protocolos de dilución y conservación de las dosis seminales, así como los de fecundación *in vitro*.

2.5 Melatonina y reproducción ovina

2.5.1 Estacionalidad reproductiva en la especie ovina

En la especie ovina la reproducción tiene un carácter estacional muy marcado, influenciado por la duración del fotoperiodo, con un periodo no reproductivo en primavera y verano, y un periodo de actividad reproductiva en otoño e invierno. Esta **estacionalidad reproductiva** es un factor limitante en la producción ovina, un sector fundamental por su importancia económica, social y medioambiental.

Las ovejas entran en celo durante el otoño (época de días cortos) para así concentrar los partos en primavera, asegurando una mayor disponibilidad de alimento a sus crías (revisado por Chemineau *et al.* (2008)). Por el contrario, durante la primavera y el verano (días largos) las hembras entran en anoestro, caracterizado por la baja o nula actividad reproductiva (Rosa and Bryant, 2003). Los machos también experimentan estas variaciones en la actividad reproductiva de manera estacional, aunque los efectos del fotoperiodo son menos pronunciados que en las hembras, ya que son capaces de producir espermatozoides a lo largo de todo el año (Rosa and Bryant, 2003; Chemineau *et al.*, 2008). Durante la época no reproductiva, en el morueco se observan cambios en el comportamiento sexual (Kafi *et al.*, 2004; Aller *et al.*, 2012) y una disminución del tamaño testicular (Avdi *et al.*, 2004), así como una menor producción de espermatozoides y una peor calidad espermática (Langford *et al.*, 1987; Karagiannidis *et al.*, 2000; D'Alessandro and Martemucci, 2003). Además, la composición del plasma seminal varía en función de la época reproductiva (Cardozo *et al.*, 2006; Marti *et al.*, 2007; Casao *et al.*, 2010a), lo que afectaría directamente a la funcionalidad espermática.

La estacionalidad reproductiva en el ovino está regulada por la secreción de **melatonina**. Esta hormona se sintetiza durante la noche en la glándula pineal, que traduce los estímulos luminosos percibidos por la retina en una señal endocrina, a través del tracto retino-hipotalámico (Reiter, 1991). La información lumínica es proporcional a la duración del ciclo día/noche; por tanto, el ritmo de producción de melatonina se modifica a lo largo del año, siendo su secreción más larga en los días cortos de otoño e invierno. La melatonina secretada durante la noche por la glándula pineal regula la secreción pulsátil de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo (Bittman *et al.*, 1983). Ésta, a su vez, regula la

secreción de las hormonas folículoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) (D'Occhio *et al.*, 1984; Clarke and Cummins, 1985), responsables de la actividad ovárica en la hembra y de la testicular en el macho (Malpaux *et al.*, 1997; Misztal *et al.*, 2002). De este modo, los cambios anuales en la secreción de melatonina nocturna permiten la sincronización de la estacionalidad reproductiva en la especie ovina con el ritmo circanual, ajustando la actividad gonadal con las condiciones ambientales a través del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Gerlach and Aurich, 2000), y permitiendo además la sincronización reproductiva entre individuos. De hecho, el uso de implantes subcutáneos de melatonina durante la época no reproductiva es una práctica habitual en ganadería ovina, ya que mejora el comportamiento reproductivo (Abecia *et al.*, 2007; Palacin *et al.*, 2008; Pool *et al.*, 2020a), los parámetros testiculares (Rosa *et al.*, 2012; El-Shalofy *et al.*, 2021), la espermatogénesis, la calidad seminal (Kaya *et al.*, 2000), y la fertilidad (Palacin *et al.*, 2008).

2.5.2 La melatonina

La melatonina (**Figura 11**) es una hormona lipofílica que está presente en todos los taxones, incluidos los procariontes, lo que indica que se ha mantenido en los seres vivos a lo largo de la evolución (revisado por Zhao *et al.* (2019)). Además, esta molécula está ampliamente distribuida en el organismo de los mamíferos, desde el sistema nervioso y la sangre a los tejidos periféricos, y está involucrada en gran variedad de funciones biológicas (Reiter *et al.*, 2013). Se cree que la función inicial de la melatonina fue la **defensa antioxidante** frente a radicales libres en los organismos unicelulares primitivos, posiblemente como parte del proceso de adaptación al uso de oxígeno atmosférico (Tan *et al.*, 2007). Esta función se mantiene en los organismos actuales, junto a otras adquiridas durante la evolución, como la regulación los ritmos circadianos y circanuales, la estacionalidad reproductiva en algunos mamíferos, la acción antiinflamatoria y estimuladora del sistema inmunológico en animales y la tolerancia al estrés en plantas y hongos (revisado por Tan *et al.* (2010) y Zhao *et al.* (2019)).

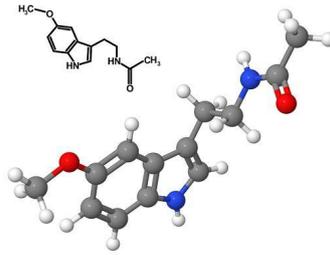


Figura 11. Estructura química de la melatonina.

2.5.2.1 Síntesis y degradación de la melatonina en mamíferos

En los mamíferos, la melatonina se sintetiza en la glándula pineal a partir del aminoácido triptófano (**Figura 12**). Mediante un proceso de hidroxilación y descarboxilación, este aminoácido se convierte en serotonina que, durante el **periodo de oscuridad**, es transformada por la enzima arilalquilamina N-acetil transferasa (ANNAT) en N-acetilserotonina. Este compuesto a su vez es metilado por la enzima N-acetilserotonina O-metiltransferasa (ASMT) dando lugar a la melatonina (Boutin *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2016).

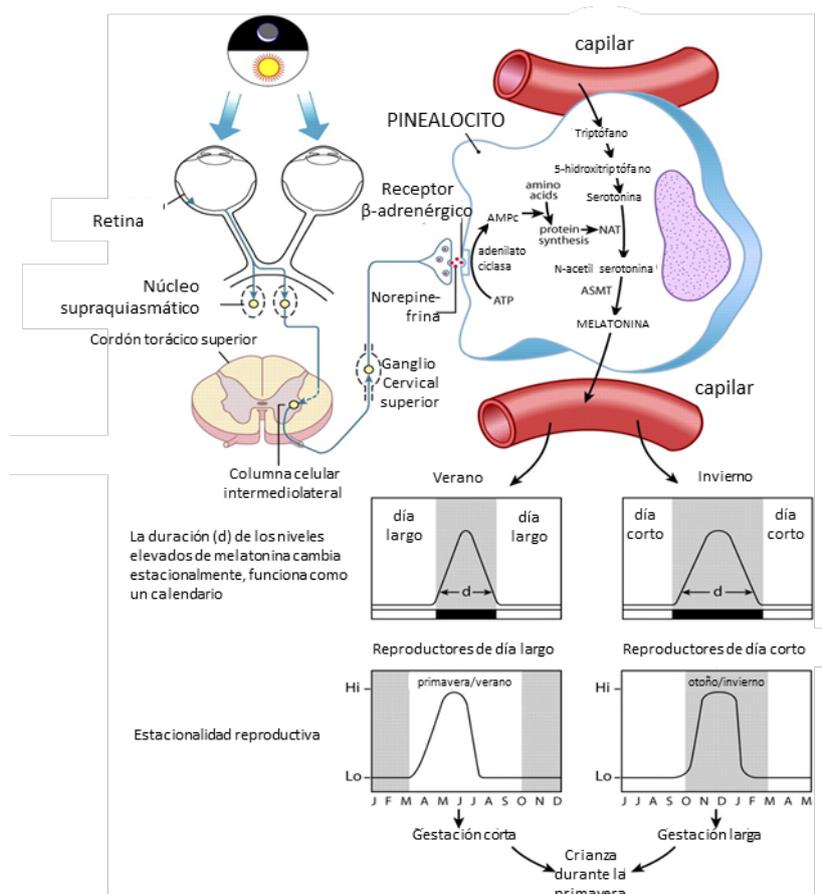


Figura 12. Representación de la biosíntesis de melatonina en mamíferos y la regulación en función del fotoperíodo. Imagen modificada de Reiter *et al.* (2009).

Solo un pequeño porcentaje de la melatonina secretada por la glándula pineal permanece sin degradarse, ya que el resto se degrada por un proceso parcialmente inducido por la luz, que implica al citocromo P450 (Boutin *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2005). Otras vías de degradación de la melatonina implican diferentes enzimas: la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), la mieloperoxidasa (MPO) y la eosinofil peroxidasa (EPO), que degradan la melatonina hasta 1-N₂-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) (Tan *et al.*, 2007). Además, la melatonina se puede metabolizar mediante la interacción con productos oxidativos (ROS y RNS), pero incluso el metabolito derivado de la degradación de la melatonina, el AFMK, tiene capacidad antioxidante y puede interaccionar con ROS y NOS y neutralizarlos (Tan *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2015), obteniéndose como resultado N₁-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) (Galano *et al.*, 2013).

Hasta los años setenta se consideraba que la melatonina se sintetizaba exclusivamente en la glándula pineal, pero gracias al desarrollo de anticuerpos altamente específicos y a la mejora de las técnicas de biología molecular, se descubrió la presencia de esta hormona y de sus enzimas de síntesis en otros tejidos, órganos y células. Entre las fuentes de **melatonina extrapineal** se encuentran la retina (Cardinali and Rosner, 1971), el tracto gastrointestinal (Buzadzic *et al.*, 2015), el sistema inmune (Carrillo-Vico *et al.*, 2006), el bazo, el hígado y el corazón (Sanchez-Hidalgo *et al.*, 2009), el timo (Naranjo *et al.*, 2007), los ovarios (Brzezinski *et al.*, 1987), la placenta (Lanoix *et al.*, 2008) y los testículos (Tijmes *et al.*, 1996; Gonzalez-Arto *et al.*, 2016a). Asimismo, se han medido los niveles de melatonina en numerosos fluidos biológicos: líquido cerebroespinal (Young *et al.*, 1984), saliva (McIntyre *et al.*, 1987), bilis (Tan *et al.*, 1999), orina (Claustrat *et al.*, 2005), fluido folicular (Brzezinski *et al.*, 1987), líquido amniótico (Mitchell *et al.*, 1978), leche (Illnerova *et al.*, 1993) y plasma seminal (Luboshitzky *et al.*, 2002; Casao *et al.*, 2010a).

Al contrario de lo que ocurre en la glándula pineal, la síntesis de melatonina extrapineal no sufre variaciones a lo largo del día y la noche, por lo que existirían otros mecanismos de regulación además de la vía retino-hipotalámico-pineal. Además, la melatonina sintetizada en los tejidos extrapineales no se secreta al torrente sanguíneo, sino que permanece en los tejidos, incluso alcanzando concentraciones superiores a las del plasma sanguíneo (Venegas *et al.*, 2012). Se cree que la función de esta melatonina sería la de proteger esos tejidos del

daño oxidativo cuando no se está produciendo melatonina en la glándula pineal (Galano *et al.*, 2013; Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014).

2.5.2.2 Mecanismo de acción de la melatonina

La melatonina ejerce sus funciones en los mamíferos por diferentes vías. Por un lado, gracias a su naturaleza anfipática, es capaz de atravesar membranas celulares y ejercer sus efectos de manera directa. Por otro lado, existen receptores específicos para la melatonina tanto en la membrana plasmática como en la nuclear, por lo que también puede actuar en las células por unión a éstos.

La melatonina, tras **atravesar la membrana plasmática**, interacciona con determinadas moléculas y compuestos del citosol. Entre otras, la melatonina se une a proteínas de unión a Ca^{2+} , como la calreticulina o la calmodulina (CaM), regulando así la actividad de numerosas enzimas celulares (Macias *et al.*, 2003; Benítez-King, 2006). Además, la melatonina puede actuar directamente sobre los radicales libres cuando se encuentra cercana al sitio de producción de ROS (Zhao *et al.*, 2019).

Se cree que el mecanismo de acción de la melatonina a través de su **unión a receptores específicos** de membrana surgió durante la evolución por la necesidad de modular numerosas funciones biológicas en organismos pluricelulares (Tan *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2019). En mamíferos se han descrito dos receptores para melatonina, **MT₁ y MT₂**, que están acoplados a proteínas G (*G-protein-coupled receptors* o GPCRs) (Reppert *et al.*, 1995; Reppert *et al.*, 1996; Reppert, 1997). Además, se ha descrito un tercer receptor de la melatonina denominado MT₃, inicialmente identificado en aves y anfibios (Ebisawa *et al.*, 1994), pero que en los mamíferos habría perdido la capacidad de unión directa a la melatonina, y que regularía su actividad al formar heterodímeros con el receptor MT₁ (Levoye *et al.*, 2006; Gautier *et al.*, 2018). Los receptores MT₁ y MT₂ presentan alta homología en su secuencia de aminoácidos, y tienden a formar homodímeros y, más frecuentemente, heterodímeros MT₁/MT₂ (Ayoub *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2016), manteniendo los sitios de unión a la melatonina estables (Jockers *et al.*, 2008; Dubocovich *et al.*, 2010).

Estos receptores se han descrito en células del sistema nervioso central (Liu *et al.*, 1997; Dubocovich and Markowska, 2005) y en tejidos periféricos, como vasos sanguíneos, médula ósea, páncreas, riñón y corteza adrenal (Dubocovich and Markowska, 2005), además de en el

ovario, células de la granulosa (Soares *et al.*, 2003), el tracto reproductor masculino (Frungeri *et al.*, 2005; Gonzalez-Arto *et al.*, 2017) y en los espermatozoides (Casao *et al.*, 2012; Gonzalez-Arto *et al.*, 2016c; Carvajal-Serna *et al.*, 2020b).

Las acciones que ejerce la melatonina a través de sus receptores incluyen la modulación de los ritmos circadianos (MT₁/MT₂) (Masson-Pevet *et al.*, 1996; Dubocovich *et al.*, 1998; Slominski *et al.*, 2012), de la vasoconstricción (MT₁) y vasodilatación (MT₂) (Doolen *et al.*, 1998), de la respuesta inflamatoria (MT₂), mejora de la inmunidad humoral y celular (MT₂) (Srinivasan *et al.*, 2008) y la inducción de la diferenciación celular (MT₁) (Bordt *et al.*, 2001).

La activación de los receptores de melatonina MT₁ y MT₂ desencadena numerosas vías de transducción de señal (**Figura 13**), como la regulación de la producción de AMPc (Hazlerigg *et al.*, 1991) y de la actividad de algunas enzimas, como la PKA (Breitbart *et al.*, 1992; Witt-Enderby *et al.*, 1998; Jockers *et al.*, 2008), así como la fosforilación de las MAP quinasas MEK1/2 y ERK1/2 (Witt-Enderby *et al.*, 2000). Además, la unión de melatonina a sus receptores produce la activación de la enzima LPC (Masana and Dubocovich, 2001) que, a través de la conversión del fosfatidil inositol (PIP₂) en diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃), desencadena la salida de calcio de los reservorios intracelulares, activando a su vez a la PKC (Benítez-King *et al.*, 2001). Por otro lado, ambos receptores están implicados en la activación de la MAPK JNK (Chan *et al.*, 2002; Yuksel Egrilmez *et al.*, 2022). Finalmente, la unión de melatonina al receptor MT₂ también inhibe la producción de GMPc (Petit *et al.*, 1999).

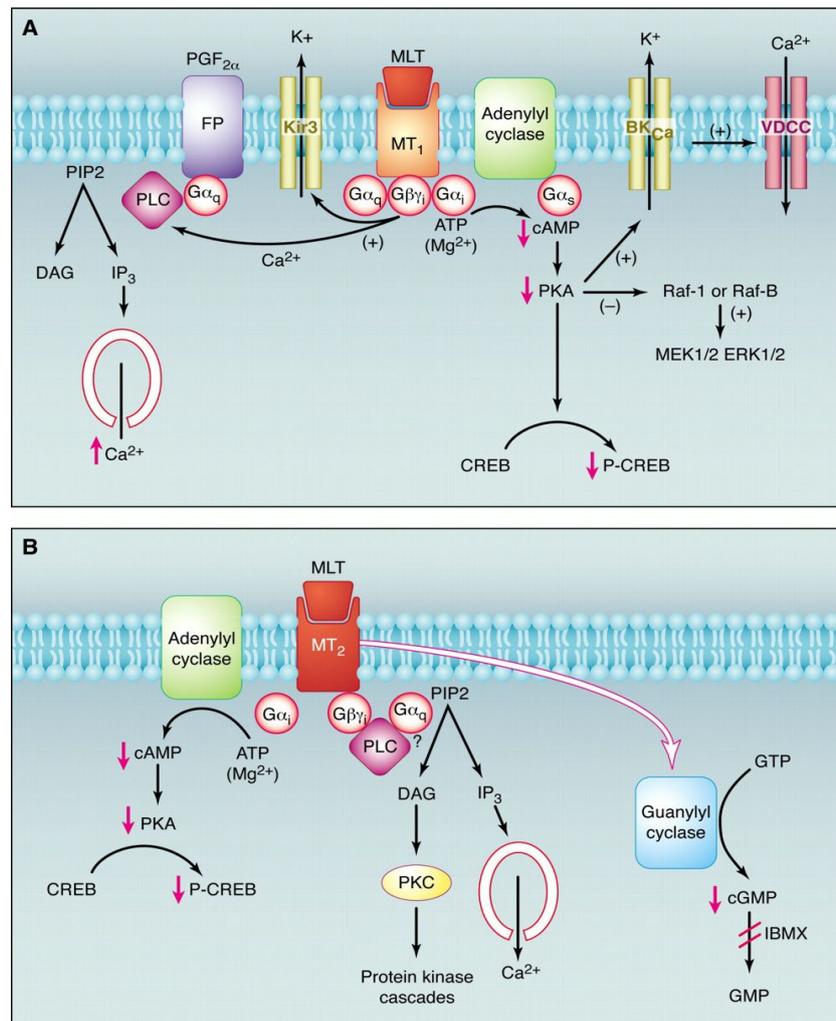


Figura 13. Representación de las principales vías de transducción de señal reguladas por los receptores MT1 (A) y MT2 (B) tras su unión a melatonina. Imagen de Masana y Dubocovich (2001).

Todas estas vías de señalización celular activadas por la melatonina están implicadas en procesos fisiológicos de los espermatozoides, en concreto, en los procesos de capacitación y reacción acrosómica (Almog *et al.*, 2008; Rotfeld *et al.*, 2014; Jaldety and Breitbart, 2015). Esto sugiere que la melatonina podría desempeñar un papel crucial en la regulación de la funcionalidad espermática.

2.5.3 Acción de la melatonina en el espermatozoide ovino

Como se ha mencionado anteriormente, la melatonina pineal modula la actividad sexual de las especies reproductoras de días cortos, como la especie ovina, a través del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Misztal *et al.*, 2002; Reiter *et al.*, 2009). Por otra parte, la síntesis de melatonina en el testículo (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016a; Martínez-Marcos *et al.*,

2019) y la presencia de receptores de melatonina en el aparato reproductor del morueco (Gonzalez-Arto *et al.*, 2017) sugieren que hay un efecto directo local de esta hormona en el tracto reproductor masculino. Pero además, la presencia de esta hormona en el plasma seminal y en el tracto reproductor femenino, junto con la existencia de receptores para la misma en los espermatozoides, apuntan a una **acción directa de la melatonina sobre los espermatozoides**.

El **plasma seminal del morueco contiene concentraciones elevadas de melatonina**, aunque los niveles son variables a lo largo del año, siendo más elevados en la época reproductiva que en la no reproductiva, (Casao *et al.*, 2010a). El origen de esta melatonina puede ser tanto testicular como pineal (Carvajal-Serna *et al.*, 2020a).

La **acción directa de la melatonina sobre espermatozoides se ha demostrado en** diversas especies (Jang *et al.*, 2010; Ortiz *et al.*, 2011; Almabhouh *et al.*, 2017; Appiah *et al.*, 2019; Ofosu *et al.*, 2021), incluyendo a la especie ovina (Casao *et al.*, 2010b; Fang *et al.*, 2019; Bhalothia *et al.*, 2022).

Por su parte, el tratamiento *in vitro* de los espermatozoides de morueco con melatonina tiene un efecto dual sobre la capacitación, promoviéndola a concentraciones bajas (100 pM) y previniéndola a concentraciones altas (1 μ M) (Casao *et al.*, 2010b). Sin embargo, cuando se añade melatonina en un medio con agentes elevadores del AMPc, que dispara la capacitación espermática ovina, la melatonina a alta concentración (1 μ M) sí que es capaz de prevenir la capacitación reduciendo los niveles de ROS y la producción de cAMP (Gimeno-Martos *et al.*, 2019), pero a baja concentración (100 pM) no es capaz de promoverla. Esto puede ser debido a que la inducción de la capacitación en presencia de alto AMPc sea tan drástica que la melatonina no es capaz de incrementarla más, enmascarando su efecto. Aun así, sí que se observa un efecto sobre los parámetros cinéticos relacionados con la hiperactivación espermática. Esta diferencia de efecto en función de la concentración, podría estar mediada por el efecto antioxidante que tiene la melatonina. Así, las altas concentraciones de melatonina en el plasma seminal estarían protegiendo a los espermatozoides del daño oxidativo (Reiter *et al.*, 2009) y evitando la capacitación espermática (de Lamirande and Gagnon, 1993; Drevet, 2006; Gimeno-Martos *et al.*, 2019). Una vez los espermatozoides eyaculados llegan al tracto reproductor femenino, la eliminación del plasma seminal y la exposición a niveles más bajos de melatonina presentes en el entorno del ovocito (Brzezinski

et al., 1987; Shi *et al.*, 2009; El-Raey *et al.*, 2011) propiciarían la capacitación espermática (Casao *et al.*, 2010b), requisito imprescindible para poder fecundar al ovocito (de Lamirande and O'Flaherty, 2008). Además, la melatonina estaría protegiendo a los espermatozoides de la muerte por apoptosis como consecuencia de su efecto antioxidante, como demuestran algunos estudios (Casao *et al.*, 2010b; du Plessis *et al.*, 2010; Jang *et al.*, 2010; Balao da Silva *et al.*, 2011; Espino *et al.*, 2011). Las últimas investigaciones llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación han probado también los efectos de la melatonina 1 μ M sobre la estabilización del citoesqueleto durante la capacitación *in vitro* (Carvajal-Serna *et al.*, 2020c). Finalmente, según algunos estudios, la melatonina protegería a los espermatozoides de morueco de los daños asociados a la congelación de manera dosis dependiente, preservando la motilidad, la integridad de ADN y su capacidad fecundante (Succu *et al.*, 2011).

La melatonina podría modular todos estos procesos en el espermatozoide de manera directa, gracias a su capacidad de atravesar la membrana plasmática, o a través de su unión a los receptores específicos MT₁ y MT₂ (revisado por Cebrián-Pérez *et al.* (2014)). Estos se describieron por primera vez en espermatozoides de humano (van Vuuren *et al.*, 1992) y, más tarde, en otros mamíferos como el morueco, el burro, el perro, el caballo, el cerdo, el ciervo y el toro (Casao *et al.*, 2012; Gonzalez-Arto *et al.*, 2016c). Concretamente en la especie ovina, los receptores de melatonina cambian su densidad y distribución durante el proceso de capacitación *in vitro* (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016b) y sus efectos sobre la capacitación espermática parecen estar mediados por su unión al receptor MT₂ (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016b).

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En la especie ovina la reproducción tiene un carácter estacional muy marcado regido por la secreción de melatonina. Por tanto, un conocimiento más profundo de la acción de esta hormona permitiría mejorar la eficiencia reproductiva en esta especie.

Todos los resultados obtenidos hasta la fecha tanto por nuestro grupo como por otros investigadores, desarrollados ampliamente en el apartado anterior de revisión bibliográfica, apuntan a un efecto beneficioso de la melatonina sobre la funcionalidad de los espermatozoides ovinos. La melatonina está presente en el plasma seminal y en el tracto reproductor femenino, y ejerce efectos directos sobre los espermatozoides, en concreto, modulando la capacitación espermática (Casao *et al.*, 2010b; Gimeno-Martos *et al.*, 2019). Además, gracias a su naturaleza antioxidante, la melatonina es capaz de provocar una disminución del daño oxidativo en los espermatozoides (du Plessis *et al.*, 2010; Jang *et al.*, 2010). No obstante, también son necesarios unos ciertos niveles de ROS y óxido nítrico para que se produzca la capacitación espermática, que pueden ser generados por los espermatozoides mediante las enzimas NOX5 y NOS, respectivamente (Francavilla *et al.*, 2000; Meiser and Schulz, 2003; Bedard and Krause, 2007; Aquila *et al.*, 2011; Musset *et al.*, 2012; Ghani *et al.*, 2013).

Por ello, nos planteamos si la melatonina regula la capacitación espermática ovina modificando los niveles de ROS y óxido nítrico, a través de una acción sobre las enzimas que los generan.

Por otro lado, el proceso de capacitación espermática comparte rutas moleculares con la apoptosis, lo que fue demostrado por nuestro grupo de investigación, así como la implicación del EGF y de las MAPKs en ambos procesos (Luna *et al.*, 2012; Luna *et al.*, 2017). Algunos estudios indican que el óxido nítrico también es capaz de actuar sobre la ruta de las MAPKs (Herrero *et al.*, 2000) y que el anión superóxido es capaz de modular la vía ACs/AMPC/PKA (O'Flaherty, 2015). También se ha observado que la melatonina estaría protegiendo a los espermatozoides de la muerte por apoptosis como consecuencia de su efecto antioxidante, como demuestran algunos estudios (Casao *et al.*, 2010b; Balao da Silva *et al.*, 2011; Espino *et al.*, 2011).

Estos hechos hicieron preguntarnos si la melatonina, a través del óxido nítrico, podría regular el proceso de apoptosis desencadenado durante la capacitación espermática ovina.

Otro proceso fundamental para que se lleve a cabo la fecundación es la correcta orientación de los espermatozoides para llegar al ovocito. Se ha postulado que el mecanismo más probable que regiría este proceso en mamíferos es la quimiotaxis. La melatonina es una hormona que se haya presente en el tracto reproductor femenino y que afecta directamente a la funcionalidad espermática en la especie ovina. Además, se ha demostrado su acción quimiotáctica en otros tipos celulares (Shirakawa and Ogino, 1987; Pena *et al.*, 2007).

Así, la melatonina podría postularse como una de las moléculas responsables de la modulación de los procesos de orientación espermática hacia el ovocito.

A la vista de los antecedentes expuestos, **en esta tesis doctoral se planteó como hipótesis que la melatonina tiene un efecto antioxidante y antiapoptótico durante el proceso de capacitación espermática y que, además, es capaz de actuar como quimioatrayente y modular la orientación espermática en la especie ovina.**

Para elucidar esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Analizar el **efecto quimiotáctico *in vitro* de la melatonina** sobre la orientación de los espermatozoides ovinos, como una aproximación a lo que ocurriría *in vivo* en el tracto genital femenino de esta especie.
2. Profundizar en los **mecanismos moleculares de respuesta de los espermatozoides ovinos a la melatonina en los procesos de capacitación y apoptosis**, poniendo especial atención a su papel antioxidante. Para llevarlo a cabo se plantearon los siguientes objetivos específicos:
 - 2.1. Estudiar la generación del anión superóxido y del óxido nítrico y su implicación en la capacitación espermática ovina.
 - 2.2. Analizar el efecto de la melatonina sobre los niveles de óxido nítrico y superóxidos durante la capacitación *in vitro* en el espermatozoide ovino.
 - 2.3. Investigar la implicación del óxido nítrico y la melatonina sobre la apoptosis durante la capacitación *in vitro* inducida por EGF.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos

A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos empleados se compraron a Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU (empresa subsidiaria de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

4.2 Obtención y procesado de las muestras espermáticas

4.2.1 Obtención de las muestras seminales

Las muestras seminales se obtuvieron a partir de nueve moruecos adultos de la raza Rasa Aragonesa de entre 2 y 4 años de edad. Todos los animales pertenecían a la Asociación Nacional de Ganaderos de la raza Rasa Aragonesa (ANGRA) y estuvieron estabulados en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, en condiciones nutricionales uniformes. Tanto el mantenimiento de los sementales como la obtención de las muestras corrieron a cargo del personal del SEA. Toda la experimentación con animales llevada a cabo en esta tesis doctoral fue aprobada por la resolución PI39/17 de la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, siguiendo el Real Decreto 53/2013 para la protección de los animales de experimentación del Gobierno de España, que cumple con la Directiva de la Unión Europea 2010/63 sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Las muestras seminales se obtuvieron tras un periodo de abstinencia de dos o tres días, mediante vagina artificial. En el momento de extracción de la muestra se obtuvieron dos eyaculados consecutivos por morueco; sin embargo, sólo se utilizaron los segundos eyaculados, en base a resultados previos que demostraron que éstos tenían mejores parámetros de calidad seminal (Ollero *et al.*, 1996). Tras la recogida, las muestras se mantuvieron a 37 °C hasta su uso y se trabajó con la mezcla de los segundos eyaculados para evitar diferencias individuales (Ollero *et al.*, 1996).

4.2.2. Selección espermática y eliminación del plasma seminal por el método de swim-up/dextrano

La eliminación del plasma seminal, en la mayoría de los experimentos llevados a cabo en esta tesis doctoral, resulta conveniente debido a que el contacto prolongado del mismo

con los espermatozoides ejerce un efecto perjudicial sobre la funcionalidad espermática (Mortimer, 1994), y además, la presencia de algunos de sus componentes, como la melatonina (Casao *et al.*, 2010a), podría influenciar los resultados obtenidos en los experimentos en los que se añadió *in vitro* este compuesto.

El método de *swim-up*/dextrano permite la obtención de una población espermática libre de plasma seminal. Este método fue desarrollado por García-López *et al.* (1996) en nuestro laboratorio, basándose en la técnica descrita para espermatozoides humanos (Alvarez *et al.*, 1993), pero modificando la composición del medio para espermatozoides ovinos y eliminando los pasos de centrifugación, ya que resulta dañina para los mismos. Esta técnica no es un simple método de lavado, ya que, además de la eliminación del plasma seminal, permite obtener una población celular enriquecida en espermatozoides altamente móviles y viables (García-López *et al.*, 1996).

La composición del medio utilizado para el *swim-up* (MS) fue la siguiente: HEPES 21 mM, NaCl 50 mM, KCl 10 mM, lactato sódico 18,6 mM, sacarosa 200 mM, glucosa 2,8 mM, MgSO₄ 0,4 mM, K₂HPO₄ 0,3 mM y piruvato sódico 0,3 mM. El pH se ajustó a 6,5, y se añadieron 1,5 UI/ml de penicilina y 15 mg/ml de estreptomina para evitar la contaminación del medio. Además, para evitar la capacitación prematura de los espermatozoides, no se añadió CaCl₂ ni NaHCO₃ al MS, como describieron Grasa y col. (2004).

Para llevar a cabo el método de *swim-up*/dextrano, se colocaron 500 µl de semen en el fondo de un tubo redondeado de 15 mm de diámetro, y sobre él se depositaron cuidadosamente 500 µl de MS-dextrano (30 mg de dextrano/ml de MS). Esta capa con alta concentración de dextrano actúa como barrera física, impidiendo el paso de espermatozoides con baja motilidad, y reteniendo aquellos con la membrana plasmática alterada o dañada (no viables). Sobre la capa de MS-dextrano se añadió muy lentamente 1,5 ml de MS-BSA (5 mg de albúmina sérica bovina (BSA)/ml MS), sin mezclar los medios. La inclusión de BSA en esta capa superior evita la aglutinación espermática. El tubo se incubó a 37 °C en posición vertical durante 15 minutos y se retiraron 750 µl de la fase superior, que se designó como primer sobrenadante y seguidamente se añadieron otros 750 µl de MS-BSA. El proceso se repitió otras tres veces consecutivas recogiendo un total de cuatro sobrenadantes. Se desechó el primero por contener restos de plasma seminal, y se trabajó posteriormente con la mezcla de los tres restantes, denominada muestra *swim-up* (**Figura 14**).

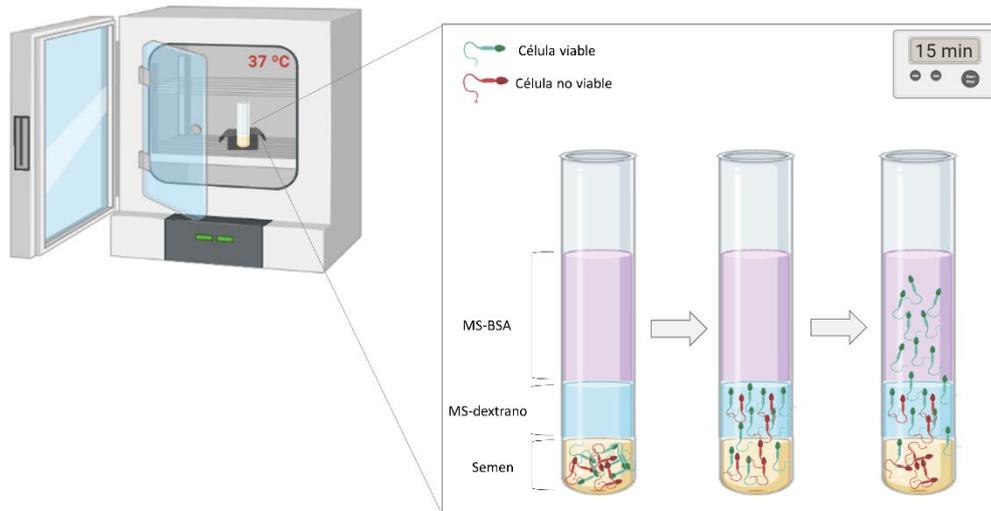


Figura 14. Representación esquemática del proceso de swim-up/dextrano.

Para determinar el posible efecto quimiotáctico de la melatonina *in vitro* durante proceso de selección espermática, en el artículo-manuscrito 1 se realizaron tres *swim-up*/dextrano de forma simultánea, incluyendo melatonina en el MS-BSA a dos concentraciones diferentes, 100 pM y 1 μ M. Las muestras de *swim-up* resultantes se denominaron “sw-Mel 100 pM” y “sw-Mel 1 μ M”, respectivamente. La melatonina se disolvió en DMSO (dimetil sulfóxido) y tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM y KH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7,4). La concentración final de DMSO en el MS-BSA fue de 0,01% (v/v), por lo que además se incluyó DMSO a la misma concentración en la muestra control, denominada en el artículo-manuscrito 1 como “sw-control”. Para estudiar la influencia de la estacionalidad sobre la potencial respuesta quimiotáctica, se llevaron a cabo los mismos experimentos en época reproductiva (septiembre-febrero) y no reproductiva (marzo-julio) para el ganado ovino en esta latitud (N41°39'21.82”).

4.3 Inducción *in vitro* de la capacitación espermática

Para inducir la capacitación espermática, las muestras seleccionadas por *swim-up*/dextrano se diluyeron hasta una concentración de $1,6 \times 10^8$ células/ml en medio TALP (del inglés *Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate*). Este medio está compuesto por NaCl 100 mM, KCl 3,1 mM, NaH₂PO₄ 0,3 mM, lactato sódico 21,6 mM, MgCl₂ 0,4 mM, HEPES 10 mM, piruvato sódico 1 mM, CaCl₂ 3 mM, glucosa 5 mM y BSA 5 mg/ml, con un pH ajustado a 7,3 con NaOH.

Las muestras se incubaron en tubos eppendorf® abiertos durante 3 horas a 39 °C en una estufa con 5% de CO₂ y 100% de humedad, basándose en el protocolo de Parrish *et al.* (1988) y que fue adaptado para espermatozoides ovinos por Colas *et al.* (2008).

Las muestras incubadas en medio TALP se denominaron “*Cap-TALP samples*” (artículo-manuscrito 1), “*control samples*” (artículos 2 y 3), dependiendo del resto de muestras ensayadas y/o de las recomendaciones de los revisores de los artículos.

Los espermatozoides de morueco son particularmente difíciles de capacitar *in vitro*, y es necesario añadir agentes elevadores del AMPc al medio de capacitación. Por ello, el medio TALP fue suplementado con una mezcla de sustancias que disparan la capacitación en espermatozoides ovinos (Grasa *et al.*, 2006; Colas *et al.*, 2008), denominada “*cocktail*”, y consistente en: dibutilil (db)-AMPc 1 mM, cafeína 1 mM, teofilina 1 mM, ácido okadaico 0,2 mM y metil-β-ciclodextrinas 2,5 mM. Las muestras incubadas en este medio (medio *cocktail*), se denominaron “*Cap-CK samples*” (artículo-manuscrito 1) o “*capacitated control (Cap-C)*” (artículos 2 y 3), dependiendo del resto de muestras ensayadas y/o de las recomendaciones de los revisores de los artículos.

El efecto del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la capacitación espermática ovina se analizó añadiendo EGF (Abcam, Cambridge, Reino Unido) a una concentración de 100 nM en el medio TALP (medio TALP-EGF), y las muestras incubadas en este medio se denominaron “*Cap-EGF*” (artículo 4).

Para determinar el efecto de la melatonina durante la capacitación espermática *in vitro* en el morueco, ésta se diluyó como se explica en el apartado **4.2.2.** y se añadió a los medios de capacitación (TALP, *cocktail* o TALP-EGF) a una concentración final de 100 pM o 1 μM. La concentración final de DMSO en las muestras espermáticas con melatonina fue del 0,1% (v/v). Para tener en cuenta el posible efecto tóxico del DMSO sobre los espermatozoides, se añadió la misma concentración (0,1% v/v) a las muestras control capacitadas.

Para investigar la implicación de la NOX5 durante la capacitación espermática *in vitro* (artículo 2), se añadió un inhibidor de esta enzima, 2-(2-clorofenil)-4-metil-5-(piridin-2-il metil)-1H-pirazol-[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona (GKT136901, GKT), al medio *cocktail* a una concentración final de 1 μM (Musset *et al.*, 2012; Altenhofer *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta que la activación de la NOX5 es dependiente de calcio (Banfi *et al.*, 2001), también se añadió

el ionóforo de calcio A23187 a una concentración 1 μM a las muestras espermáticas incubadas en condiciones capacitantes, para evaluar así el efecto de la activación de la NOX5 en los cambios asociados a la capacitación espermática.

Finalmente, para evaluar el papel del óxido nítrico durante la capacitación espermática *in vitro* (artículos 3 y 4), se añadió el inhibidor no selectivo de la NOS, el NG-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), a los medios TALP, *cocktail* y TALP-EGF, a una concentración final de 100 μM y 1 mM. Por otro lado, se adicionó L-arginina (L-arg) como sustrato de la NOS a los medios de capacitación a una concentración de 10 nM, en base a un trabajo previo de Hassanpour *et al.* (2007).

4.4 Evaluación de las muestras espermáticas

4.4.1 Cálculo de la concentración espermática y del porcentaje de recuperación

La concentración de las muestras espermáticas se determinó por duplicado usando una cámara de Neubauer (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania), tras una dilución en agua 1/2000 (v/v) para el semen fresco, y 1/100 (v/v) para las muestras seleccionadas por *swim-up*/dextrano. Para evaluar la concentración espermática, se colocó una gota de 6 μl de la dilución en la cámara de Neubauer. Las células se visualizaron con un microscopio de contraste de fases, y se contaron los espermatozoides en 0,1 mm^3 , para después aplicar la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{espermatozoides}}{\text{ml}} = \frac{n^{\circ} \text{ espermatozoides contados}}{10000} \times \frac{1}{\text{dilución}}$$

Para evaluar el efecto de la melatonina sobre la orientación espermática durante el proceso de selección por *swim-up*/dextrano (artículo-manuscrito 1), el porcentaje de células recuperadas se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ recuperación} = \frac{\text{concentración muestras swim - up} \times 3 \times 0,75 \text{ ml}}{\text{concentración muestra eyaculado} \times 0,5 \text{ ml}} \times 100$$

4.4.2 Evaluación de la motilidad espermática

La motilidad espermática, total y progresiva, se evaluó mediante un sistema automatizado de análisis espermático (sistema CASA, del inglés *Computer-Assisted Sperm Analysis*) con el módulo de motilidad del programa OpenCASA, un software de acceso libre que se desarrolló recientemente en nuestro laboratorio (Alquezar-Baeta *et al.*, 2019). Adicionalmente, se evaluaron los siguientes parámetros cinéticos: velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad promedio (VAP), porcentaje de linearidad (LIN), porcentaje de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB), amplitud media del desplazamiento de cabeza (ALH), frecuencia de batida del flagelo (BCF), ángulo medio de desplazamiento (MAD) y dimensión fractal (FD).

Para ello, se colocó una gota de 2 μl de la muestra espermática diluida a 3×10^7 células/ml en una cámara Makler (Sefi-medical Instruments, Haifa, Israel) precalentada a 37 °C en una platina térmica. Se analizaron cuatro campos por gota, y en cada uno de ellos el movimiento espermático se grabó con una videocámara (Basler acA1920; Basler Vision Components, Ahrensburg, Alemania) acoplada a un microscopio (Nikon Eclipse 50i, Nikon Instruments Int, Tokyo, Japón) equipado con un objetivo 10x de contraste de fases.

Dado que el programa OpenCASA permite al usuario ajustar los parámetros de análisis libremente, los videos se evaluaron según los siguientes ajustes: 60 fotogramas por segundo, 120 fotogramas, resolución de la imagen en píxeles: 800 x 600, tamaño mínimo de célula: 10 μm^2 , tamaño máximo de célula: 100 μm^2 , motilidad progresiva: STR > 80% y VAP > 90%, VCL mínima: 10 $\mu\text{m/s}$, umbral inferior de VCL: 100 $\mu\text{m/s}$, umbral superior de VCL: 200 $\mu\text{m/s}$, longitud mínima de la trayectoria: 30 fotogramas, y desplazamiento máximo entre fotogramas: 20 μm .

4.4.3 Determinación del estado de capacitación mediante tinción con clorotetraciclina (CTC)

La clorotetraciclina (CTC) es un antibiótico fluorescente que se une a cationes, especialmente el calcio (Caswell and Hutchison, 1971). La CTC atraviesa la membrana del espermatozoide y, dentro de la célula espermática, se une al calcio libre de los compartimentos intracelulares y se vuelve más fluorescente (Tsien, 1989). Estos complejos CTC-Ca²⁺ se unen preferentemente a regiones hidrofóbicas, como la membrana celular, y como resultado se distinguen los patrones de fluorescencia característicos de los espermatozoides según su estado fisiológico, lo que permite diferenciarlos entre no capacitados, capacitados y con el acrosoma reaccionado (Gillan *et al.*, 1997)

En esta tesis se utilizó una versión modificada de la tinción con CTC, descrita por Ward y Storey (1984) y validada para espermatozoides de morueco por Grasa y col. (2006). La solución de CTC (750 µM) se preparó diariamente en un medio tamponado que contiene Tris 20 mM, NaCl 130 mM y cisteína 5 µM, a pH 7,8, y filtrado con un filtro de tamaño de poro de 0,22 µm. Para realizar la tinción de los espermatozoides, se añadieron 20 µl de esta solución de CTC a 18 µl de la muestra espermática (3 x 10⁷ células/ml), y se fijaron con 5 µl de paraformaldehído 1,25 % (p/v) en Tris-HCl 0,5 M (pH 7,8). Las muestras se incubaron a 4 °C durante 30 minutos en oscuridad. Para la evaluación de las muestras, se colocaron 10 µl de cada una en un portaobjetos y se le añadieron 2 µl de trietilendiamina (DABCO) 0,22 M diluida en glicerol:PBS (9:1 v/v) para conservar la fluorescencia. Se colocó un cubreobjetos, se selló la muestra con esmalte de uñas y se almacenó a -20 °C hasta su evaluación. Todos estos procesos se realizaron en semioscuridad para evitar la pérdida de fluorescencia.

Las muestras se evaluaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse E-400 (Nikon Corporation, Kanagawa, Japón) con filtro V-2A, bajo iluminación epifluorescente. No se observó fluorescencia en ausencia de CTC en las preparaciones. Se contaron un mínimo de 200 espermatozoides por muestra, y se clasificaron de acuerdo a los patrones identificados por Gillan y col. (1997), como se muestra en la **Figura 15**: no capacitados (NC, con fluorescencia uniforme en la cabeza, con o sin banda brillante en la zona ecuatorial), capacitados (C, con fluorescencia en la parte anterior de la cabeza) y con el acrosoma

reaccionado (AR, sin fluorescencia en la cabeza, con o sin una banda brillante en la zona ecuatorial).

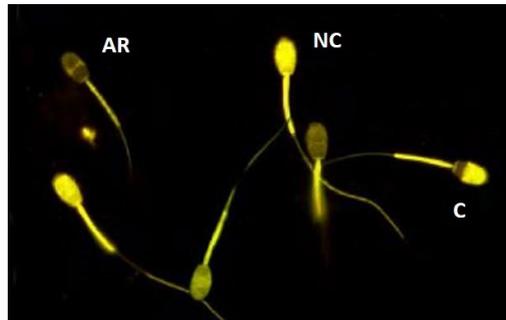


Figura 15. Imagen representativa de la evaluación del estado de capacitación de espermatozoides de morueco mediante clorotetraciclina (CTC). NC: no capacitados (cabeza uniformemente teñida), C: capacitados (fluorescencia en la región acrosomal), AR: acrosoma reaccionado (sin fluorescencia en la cabeza, con o sin banda brillante en la región ecuatorial). Imagen tomada con un filtro V-2A, 1000x aumentos.

4.4.4 Análisis mediante citometría de flujo

Todas las evaluaciones realizadas mediante citometría de flujo se realizaron con un citómetro de flujo Beckman Coulter Cytomics FC 500 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, EE.UU) equipado con dos láseres de excitación (laser de Argón de 488 nm refrigerado por aire, y laser rojo de estado sólido de 633 nm), cinco filtros de absorbancia (FL1-525, FL2-575, FL3-610, FL4-675 and FL5-755; ± 5 nm) y el software de análisis CXP.

Se evaluaron un mínimo de 20.000 células en todos los experimentos. La población de espermatozoides se identificó para su análisis en base a sus características específicas de dispersión frontal (FS, del inglés *Forward Scatter*), cuyo valor es proporcional al tamaño celular, y de dispersión lateral (SS, del inglés *Side Scatter*), proporcional a la complejidad de la célula. Se utilizó un flujo de 200-300 células/s.

4.4.4.1 Evaluación de la integridad de la membrana plasmática

La viabilidad celular, considerada como la integridad de la membrana plasmática, se evaluó mediante una doble tinción fluorescente con diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) y yoduro de propidio (IP) (Harrison and Vickers, 1990).

Esta técnica se basa en la distinta fluorescencia que presentan los espermatozoides tras su incubación con estos dos colorantes, en función de su viabilidad, entendida ésta como

integridad de membrana. Así, los espermatozoides con la membrana plasmática íntegra, considerados viables, adquieren un color verde gracias a que las esterasas de la membrana plasmática hidrolizan el CFDA (inoloro) a carboxifluoresceína, que es verde fluorescente. Además, la membrana plasmática intacta es impermeable al yoduro de propidio. Sin embargo, las células no viables, con la membrana dañada, permiten la entrada del yoduro de propidio, que se une al DNA y confiere a las células un color rojo fluorescente.

Para evaluar la viabilidad espermática, las muestras se diluyeron a una concentración de 5×10^6 células/ml en 300 μ l de medio MS, y se añadieron 3 μ l de CFDA 1 mM (diluido en DMSO), 3 μ l de IP 1,5 mM (diluido en agua) y 5 μ l de formaldehído 0,5 % (v/v en agua). Seguidamente las muestras se incubaron a 37 °C en oscuridad durante 15 minutos. Para el análisis de la viabilidad celular mediante citometría de flujo se utilizó el láser de argón de 488 nm, y la fluorescencia se detectó utilizando los filtros FL1-525 nm (para CFDA) y FL4-675 nm (para IP). Se monitorizaron los siguientes parámetros: FS log, SS log, FL1 log (CFDA) y FL4 log (IP), y se evaluó el porcentaje de espermatozoides viables (CFDA+/IP-).

4.4.4.2 Evaluación de los niveles intracelulares de óxido nítrico

Los niveles intracelulares de óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) se determinaron mediante la tinción con diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE.UU). El DAF-2 es una sonda permeable a las células, que en presencia del $\text{NO}\cdot$ es metabolizado a un compuesto altamente fluorescente, la triazolofluoresceína (DAF2-T) (Lampiao *et al.*, 2006).

Las muestras espermáticas se diluyeron en 300 μ l de medio MS hasta 5×10^6 células/ml, y se tiñeron con DAF-2 10 μ M (diluido en DMSO) y IP 7,5 μ M, durante 15 minutos a 37 °C en oscuridad. Seguidamente se analizaron las muestras por citometría de flujo, utilizando el láser de argón y los filtros FL1-525 nm y FL4-675 nm. Los parámetros monitorizados fueron: FS log, SS log, FL1 log (DAF-2) y FL4 log (IP), y se distinguieron tres subpoblaciones: células viables con alta producción de $\text{NO}\cdot$ (IP-/DAF-2+), células viables con baja producción de $\text{NO}\cdot$ (IP-/DAF-2-) y células no viables con baja producción de $\text{NO}\cdot$ (IP+/DAF-2-). Se evaluó el porcentaje de espermatozoides vivos con altos niveles de $\text{NO}\cdot$ (IP-/DAF-2+).

4.4.4.3 Evaluación de los niveles intracelulares de superóxidos

Para detectar la producción de superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) en los espermatozoides de morueco, se empleó una tinción fluorescente con hidroetidina (DHE) y Yo-Pro-1, en base a la metodología descrita por Guthrie y Welch para espermatozoides de cerdo (2006). La membrana espermática es permeable a la hidroetidina que, en el interior celular, se oxida por el $O_2^{\cdot-}$ dando lugar a un compuesto con fluorescencia roja, el etidio (E). Éste puede detectarse mediante citometría de flujo utilizando el filtro FL4-675 nm. Por otro lado, el Yo-Pro-1 marca aquellas células que poseen la membrana desestabilizada (células no viables) con fluorescencia verde, detectable con el filtro FL1-525 nm del citómetro de flujo.

Así, para analizar los niveles de $O_2^{\cdot-}$ en los espermatozoides, las muestras se diluyeron en 500 μ l de medio MS a una concentración de 5×10^6 células/ml, y se tiñeron con DHE 4 μ M y Yo-Pro-1 40 nM (diluidos en DMSO) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU). Las muestras se incubaron seguidamente durante 40 minutos en oscuridad a 37 °C. Tras evaluar las muestras con el citómetro de flujo, se distinguieron las siguientes poblaciones: células viables con alta producción de $O_2^{\cdot-}$ (Yo-Pro-1-/E+), células viables con baja producción de $O_2^{\cdot-}$ (Yo-Pro-1-/E-), células no viables con alta producción de $O_2^{\cdot-}$ (Yo-Pro-1+/E+) y células no viables con baja producción de $O_2^{\cdot-}$ (Yo-Pro-1+/E-). Se analizó el porcentaje de espermatozoides vivos con altos niveles de superóxidos (Yo-Pro-1-/E+) en las diferentes condiciones experimentales.

4.4.4.4 Evaluación de los niveles de calcio intracelular

Los cambios en los niveles de calcio intracelular se midieron con la sonda Fluo-4-AM en combinación con ioduro de propidio, para evaluar simultáneamente la viabilidad celular. El Fluo-4 es un indicador de calcio de alta afinidad, que se vuelve más fluorescente cuando se une a este ion, de manera que es detectable por citometría de flujo. El éster AM del colorante le permite atravesar la membrana plasmática pasivamente y, una vez dentro de la célula, las esterasas intracelulares lo eliminan y el colorante queda libre en el interior celular (Paredes *et al.*, 2008).

Para determinar los cambios en la concentración intracelular de calcio en los espermatozoides de morueco, se incubaron 5×10^6 células/ml en 500 μ l de medio MS con Fluo-4-AM 2 μ M (diluido en DMSO) y ácido plurónico al 0,02% durante 15 minutos a 37 °C en oscuridad (ambos reactivos de Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y 7,5 μ M de yoduro de propidio. El ácido plurónico ayuda a la dispersión de la sonda, ya que los grupos AM unidos a ésta tienen baja solubilidad en medio acuoso. Tras la incubación, se analizaron las muestras con el citómetro de flujo, utilizando el láser de Argón y los filtros FL1-525 nm y FL4-675 nm. Se monitorizaron los parámetros FS log, SS log, FL1 log (Fluo-4-AM), and FL4 log (IP), y se evaluó el porcentaje de espermatozoides viables con altos niveles de calcio (Fluo-4-AM+/IP-).

4.4.4.5 Evaluación de la activación de caspasas

Durante el proceso de apoptosis, se activan determinadas caspasas, entre ellas las 3 y 7, que son caspasas ejecutoras o efectoras (Scaffidi *et al.*, 1998). La presencia de caspasas activas 3 y 7 se detectó mediante el kit comercial Vybrant™ FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU), que está basado en la metodología FLICA® (*fluorescent inhibitor of caspases*, o inhibidor fluorescente de las caspasas). El compuesto inhibidor de caspasas que emplea este kit se denomina FAM-DEVD-FMK, tiene fluorescencia verde y se une covalente e irreversiblemente por el péptido DEVD a las cisteínas reactivas de las caspasas 3 y 7 activas, inhibiendo la actividad enzimática de éstas. El compuesto que reacciona con las caspasas queda retenido en las células y la señal fluorescente verde es una medida directa de la cantidad de caspasas 3 y 7 activas presentes en la célula en el momento que se añadió el reactivo (Wlodkowic *et al.*, 2011).

Se diluyeron las muestras hasta 6×10^6 células/ml en 300 μ l de PBS y se añadieron 3 μ l del péptido FAM-DEVD-FMK 30x, dejándolas incubar durante 1 hora a 37 °C y 5% de CO₂. Se realizaron dos lavados con 300 μ l del tampón de lavado proporcionado por el kit mediante centrifugación a 600 \times g durante 8 minutos a temperatura ambiente (TA), y el precipitado resultante se resuspendió en 300 μ l de este mismo tampón. Las muestras se analizaron por citometría de flujo utilizando el filtro FL1-525 nm, y se monitorizaron los parámetros FS log, SS log, y FL1 log (FAM-DEVD-FMK). Se distinguieron así dos poblaciones, una correspondiente a los espermatozoides con caspasas 3 y 7 activas, y otra población de espermatozoides no apoptóticos, y se evaluó el porcentaje de espermatozoides con caspasas activas.

4.4.4.6 Evaluación de la fragmentación del ADN

La fragmentación del ADN se considera un signo de apoptosis celular tardía, y en esta tesis se evaluó en espermatozoides de morueco mediante la técnica TUNEL (del inglés, *Terminal Transferase-Mediated dUTP Nick End-Labeling*), utilizando el kit comercial In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Mannheim, Alemania) (Li and Darzynkiewicz, 1995).

Las muestras espermáticas se diluyeron hasta una concentración de 4×10^7 células/ml en PBS, y se fijaron con paraformaldehído 4% a TA durante 1 hora. Seguidamente, se lavaron las células con PBS mediante centrifugación a $600 \times g$ durante 8 minutos y se permeabilizaron con Triton X-100 (0,1% (v/v) en citrato de sodio al 0,1%) durante 2 minutos en hielo. Se lavaron las células dos veces con PBS, y se llevó a cabo la reacción de elongación durante 1 hora a 37 °C en oscuridad, mediante la incubación del precipitado resultante con 50 µl de solución de marcaje proporcionada por el kit, que contiene la enzima TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal) y dUTP unido a fluoresceína para marcar las células positivas. Se incluyó un control negativo que se preparó sin añadir TdT a la solución de marcaje, y un control positivo al que se añadió un tratamiento adicional con 10 IU de DNasa I durante 10 minutos a 15-25 °C antes de la reacción de elongación. La reacción de elongación se detuvo tras lavar las muestras con PBS, mediante centrifugación a $600 \times g$ durante 10 min a TA. Finalmente, se evaluaron las muestras por citometría de flujo, utilizando el filtro FL1-525 nm, y se monitorizaron los parámetros FS log, SS log, and FL1 log (TUNEL). De esta manera se distinguieron dos poblaciones de espermatozoides, una con el ADN fragmentado (TUNEL+) y otra con el ADN intacto (TUNEL-), y se evaluó el porcentaje de células con el ADN dañado (TUNEL-).

4.5 Detección y cuantificación de proteínas por *Western blot*

4.5.1 Extracción de las proteínas de los espermatozoides de morueco

Las proteínas espermáticas de las muestras de *swim-up* y capacitadas *in vitro* en las diferentes condiciones se extrajeron siguiendo el método descrito previamente por Colas *et al.* (2008). Los espermatozoides, en alícuotas de $1,6 \times 10^8$ células/ml, se centrifugaron a $900 \times g$ durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado resultante se resuspendió en 200 µl de tampón de extracción de muestras (ESB, *Extraction Sample Buffer*: Tris-HCl 125 mM pH 6.8 y SDS al 2% (p/v) con inhibidores de proteasas (*Protease inhibitors cocktail*) al 10 % y se incubó durante 5 minutos a 100 °C en un baño de arena. Después se centrifugaron las

muestras a $15.000 \times g$ durante 5 min a 4°C y se recogió el sobrenadante. Finalmente, a las muestras de proteínas recuperadas se les añadió β -mercaptoetanol, glicerol y azul de bromofenol (en glicerol al 10% p/v) a una concentración final del 5%, 1% and 0.002 % (v/v), respectivamente, y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4.5.2 SDS-PAGE y western blot

El protocolo de SDS-PAGE y *western blot* fue prácticamente el mismo para la detección de todas las proteínas, variando solamente la cantidad de proteínas cargadas en los geles y las condiciones de transferencia a las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF).

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) al 10%, siguiendo el método descrito por Laemmli (1970). En función de la proteína objeto de estudio, se cargó un volumen determinado en los geles, que osciló entre 25 y 50 μl (se detalla en la sección “material y métodos” de cada artículo). Las condiciones de electroforesis fueron 130 V durante 1h y 30 minutos a 4°C en todos los casos.

Una vez separadas las proteínas, se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA, USA). Para algunos experimentos (artículo 3), se utilizó un dispositivo de transferencia húmeda (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU) y un tampón compuesto por Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20% v/v, pH 8,3, durante 20 h a 22 V. En otros experimentos (artículos 2 y 4) se utilizó un sistema de transferencia semi-seca que permite realizar este proceso en 10 minutos (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). En ambos casos, tras la transferencia se bloquearon los sitios de unión inespecíficos de las membranas con BSA al 5% (p/v) en PBS (pH 7,4) durante 4 h a TA y, a continuación, se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios diluidos en PBS con Tween-20 al 0,1% (v/v) y BSA al 1% (p/v) durante toda la noche a 4°C . Los anticuerpos primarios, junto con la dilución y el correspondiente control positivo utilizados para los experimentos de *western blot* de esta tesis doctoral se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Anticuerpos primarios, diluciones y controles positivos utilizados para la identificación de proteínas mediante western blot en los distintos experimentos.

Anticuerpo	Marca	Identificación	Dilución	Control positivo
Anti-eNOS	Abcam, Cambridge, Reino Unido	Cat# ab5589, RRID: AB_304967	1/500 (v/v)	Extracto de pulmón de rata (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EE.UU.)
Anti-nNOS	Abcam, Cambridge, Reino Unido	Cat# b76067, RRID: AB_2152469	1/500 (v/v)	Extracto de cerebro de ratón (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EE.UU.)
Anti-iNOS	Abcam, Cambridge, Reino Unido	Cat# ab3523, RRID: AB_303872	1/500 (v/v)	Lisado de macrófagos de ratón activados con IFN/LPS (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU)
Anti-NOX5	Abcam, Cambridge, Reino Unido	Cat# ab191010	1/400 (v/v)	Lisado de células HeLa comercial (Abcam, Cambridge, Reino Unido)
Anti-fosfo-JNK (Thr183/Tyr185, Thr221/Tyr223)	Millipore; Merck Millipore, Darmstadt, Alemania	Cat# 07-175, RRID:AB_310412	1/1000 (v/v)	Lisado de células A431 estimuladas con EGF (Millipore; Merck Millipore, Darmstadt, Alemania)
Anti-fosfo-p38 α (Thr180 / Tyr182)	Millipore; Merck Millipore, Darmstadt, Alemania	Cat# 05-1059, RRID:AB_1977402	1/1000 (v/v)	Lisado de células A431 estimuladas con EGF (Millipore; Merck Millipore, Darmstadt, Alemania)

Para comprobar la especificidad de los anticuerpos frente a las tres isoformas de NOS, se realizó el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las NOS de la especie ovina, obtenidas de la base de datos UniProt (UniProtKB, <https://www.uniprot.org>), con las secuencias de los péptidos utilizados por la casa comercial para generar los anticuerpos anti-NOS (cuando se especificaba) o con la secuencia de las NOS humanas, ya que los anticuerpos se generaron frente a ellas. El programa utilizado fue *Clustal Omega, Multiple Sequence Alignment* (Goujon *et al.*, 2010; Sievers *et al.*, 2011; McWilliam *et al.*, 2013). Se encontró una

alta homología entre secuencias (93.75% para la eNOS, 91.86% para la nNOS y 85.70% para la iNOS), lo que indicaba que los anticuerpos escogidos eran los adecuados para su uso en la especie ovina.

La especificidad del anticuerpo anti-NOX5 en la especie ovina se comprobó mediante el uso de un péptido de bloqueo (ProteoGenix, Schiltigheim, Francia). Así, el anticuerpo anti-NOX5 se incubó con el péptido inmunógeno bloqueante a una concentración de 2,5 µg/ml en PBS con BSA al 1% (p/v) durante 2 h a TA. Este anticuerpo neutralizado se utilizó en paralelo con el anticuerpo sin bloquear, en dos membranas de *western blot* idénticas, y se compararon los resultados obtenidos. Tras utilizar el anticuerpo bloqueado no se detectó ninguna señal en la membrana, lo que indicó que el anticuerpo utilizado tiene alta afinidad por la proteína NOX5 ovina.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron tres veces en PBS con Tween-20 al 0,1% (v/v), durante 15 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario (IRDye 680RD donkey anti-rabbit IgG antibody, LI-COR Biosciences Cat# 926-68073, RRID: AB_10954442) durante 75 minutos a TA, diluido 1/15.000 en PBS con Tween-20 al 0,1% (v/v) y BSA al 1% (p/v).

Además, en todos los ensayos de *western blot* realizados se incluyó un control de carga para poder cuantificar las señales de las proteínas de interés. Para ello, todas las membranas se incubaron simultáneamente con el anticuerpo primario anti-tubulina producido en ratón (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, EE.UU, Cat# sc-8035, RID:AB_628408), junto con el anticuerpo primario frente a la proteína de interés. Al anticuerpo secundario previamente descrito se añadió el anticuerpo secundario anti-mouse (IRDye 800CW donkey anti-mouse IgG antibody, LI-COR Biosciences Cat# 926-32212, RRID: AB_621847) diluido 1/15.000 PBS con Tween-20 al 0,1% (v/v) y BSA al 1% (p/v) para identificar la señal de tubulina.

Una vez finalizada la incubación con los anticuerpos secundarios, y tras lavar las membranas tres veces durante 15 minutos en PBS con Tween-20 al 0,1% (v/v), éstas se escanearon utilizando el sistema Odyssey Clx Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EE.UU). Las imágenes obtenidas se cuantificaron con el software Image Studio v.2.0.38 (Li-COR Biosciences, Lincoln, NE, EE.UU) para determinar la intensidad relativa de las bandas de proteína, normalizadas al control de carga (tubulina).

4.6 Identificación y localización de proteínas mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La localización de las isoformas de la NOS, de la NOX5 y del receptor de melatonina MT₂ se determinó por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Las muestras espermáticas se diluyeron en PBS y se fijaron con formaldehído al 0,5% (v/v) a TA durante 20 minutos. La dilución varió en cada caso para ajustar la concentración celular a: 8×10^6 células/ml para las isoformas de NOS, 2×10^6 células/ml para la NOX5 y 4×10^6 células/ml para el receptor MT₂. Después, las células se centrifugaron a $900 \times g$ durante 6 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 500 μ l de PBS. A continuación, se depositaron 40 μ l de cada suspensión celular en un portaobjetos polilisinado (Superfrost Plus; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU) y se mantuvieron a TA durante 3 h para asegurar la adhesión de las células a la superficie. En el caso de las NOS y la NOX5, las células se permeabilizaron con Triton X-10 al 0,5% (v/v) en PBS durante 15 minutos y después se fijaron de nuevo con paraformaldehído al 1,25% (v/v) en Tris-HCl 0,5 M durante 5 minutos. Seguidamente se lavaron las muestras con PBS y se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con BSA al 5% (p/v) en PBS durante 5 horas en una cámara húmeda. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron de nuevo con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche en una cámara húmeda a 4°C.

Para la identificación de las isoformas de NOS y la enzima NOX5 se utilizaron los mismos anticuerpos primarios que se emplearon para los experimentos de *western blot*, resumidos en la **Tabla 1**, diluidos 1/25 en PBS con BSA al 1% (v/v). Como se indica en el apartado **4.5.2**, la especificidad de los anticuerpos anti-NOS se comprobó mediante un alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos del péptido con el que se había generado cada anticuerpo con la proteína ovina a estudiar. La especificidad del anticuerpo anti NOX5 se testó mediante un péptido de bloqueo, como se explicó anteriormente en el apartado **4.5.2**. El anticuerpo neutralizado con el péptido de bloqueo se utilizó en paralelo con el anticuerpo sin bloquear en dos IFIs simultáneas, para poder comparar los resultados. Cuando se utilizó el anticuerpo neutralizado no se detectó ninguna señal, lo que indica que el anticuerpo utilizado tiene alta afinidad por la NOX5 ovina.

Por último, el receptor de melatonina MT₂ se detectó utilizando el anticuerpo primario anti-MT₂ (Acris Antibodies GmbH, Herford, Alemania, Cat# AP01322PU-N, RRID: AB_1619198), diluido 1/50 en PBS con 1% de BSA (p/v).

Tras la incubación con los anticuerpos primarios, a la mañana siguiente, todas las muestras se lavaron tres veces con PBS, y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 chicken anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific; Cat#A-21441, RRID: AB_2535859) diluido 1/600 (v/v) en PBS con 1% de BSA, durante 90 minutos a TA en una cámara húmeda. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron de nuevo las muestras con PBS, y se añadieron 6 µl de trietilendiamina (DABCO) 0,22 M diluida en glicerol:PBS (9:1 v/v) para potenciar y conservar la fluorescencia. Seguidamente se cubrieron las muestras con un cubreobjetos y se sellaron con esmalte de uñas transparente.

La evaluación de las muestras se realizó con un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon, Tokyo, Japón) con iluminación epifluorescente, utilizando un filtro B2-A y un aumento de 1000x. En todos los casos se evaluaron al menos 150 espermatozoides por muestra.

4.7 Evaluación de la orientación espermática por quimiotaxis

La orientación de los espermatozoides hacia un gradiente químico, en este caso el generado por la melatonina, se evaluó mediante el uso de un dispositivo comercial y de un software específico. Para estudiar la influencia del estado de capacitación sobre esta potencial respuesta quimiotáctica, todos los experimentos se realizaron en muestras seleccionadas por el método de *swim-up*/dextrano sin capacitar (muestras *swim-up*) o capacitadas en ausencia o presencia de agentes elevadores del AMPc (o medio *cocktail*) (muestras Cap-TALP y Cap-CK, respectivamente). Para estudiar la influencia de la estacionalidad sobre la potencial respuesta quimiotáctica, se llevaron a cabo los mismos experimentos en época reproductiva (septiembre-febrero) y no reproductiva (marzo-julio) para el ganado ovino en esta latitud (N41°39'21.82").

Los ensayos de quimiotaxis se realizaron con los dispositivos desechables µ-Slide Chemotaxis (ibidi GmbH, Martinsried, Alemania). Este dispositivo incluye tres cámaras de quimiotaxis independientes, lo que permite realizar tres estudios en paralelo. Cada cámara consta de dos reservorios, situados a ambos lados de un área más estrecha y conectados a ésta, denominada área de observación. Todos los reservorios tienen unos pocillos en los que

encaja una punta de pipeta, para facilitar el llenado. Para la realización de estos ensayos, se rellenaron todos los reservorios con la muestra espermática a estudiar en cada caso, a una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/ml ($65 \mu\text{l}$ en los reservorios laterales y $6 \mu\text{l}$ en el área de observación). A continuación, se añadieron $30 \mu\text{l}$ de la misma muestra espermática con melatonina (100 pM y $1 \mu\text{M}$), o sin ésta (situación control), a uno de los reservorios laterales, evitando así la dilución de la suspensión de espermatozoides cargada en la cámara debido a la aplicación del potencial quimioatrayente (**Figura 16**). Seguidamente, se retiraron otros $30 \mu\text{l}$ del pocillo opuesto del mismo reservorio. Una vez la cámara de quimiotaxis estaba completamente cargada, se incubó a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos para permitir la formación de un gradiente de concentración de hormona en el reservorio. Finalmente, se grabaron los espermatozoides situados en el área de observación a 200 fotogramas por segundo durante 3 segundos, utilizando una cámara de video (acA1920-155uc, Basler, Exton, PA, EE.UU.) acoplada a un microscopio (Nikon Eclipse 50i, Nikon, Tokyo, Japón) equipado con un objetivo de contraste de fases $10\times$.

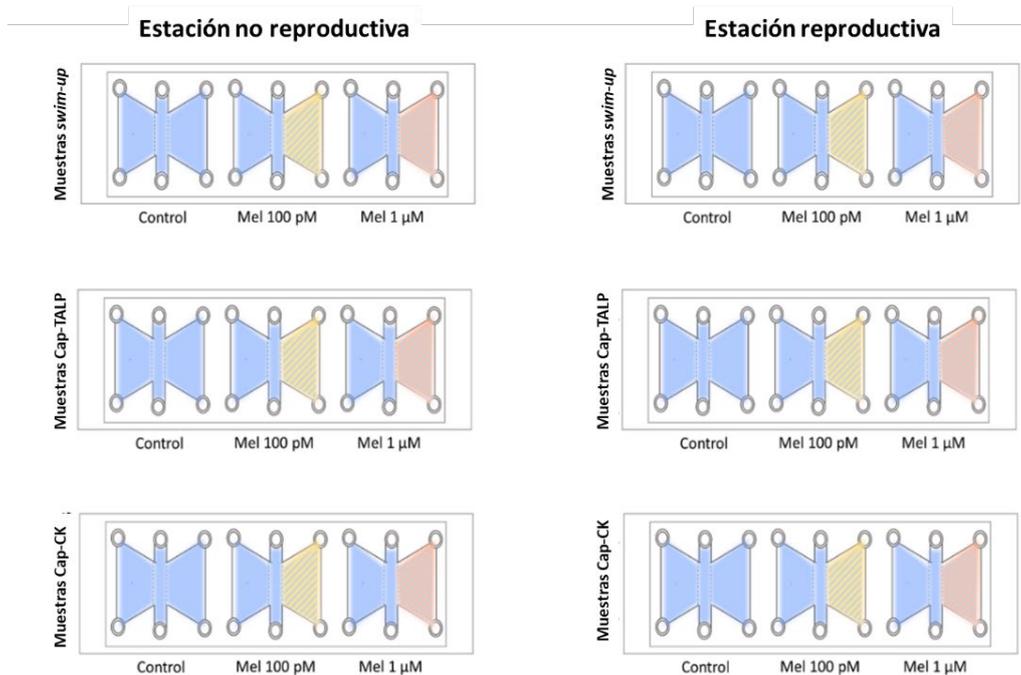


Figure 16. Esquema gráfico del diseño experimental para el análisis de quimiotaxis espermática. En azul se representa la suspensión espermática procedente de las muestras de swim-up, Cap-TALP o Cap-CK, rellenando el área central y los dos reservorios laterales. En amarillo y rosa, rayados en azul, la suspensión de espermatozoides con melatonina 100 pM y $1 \mu\text{M}$, respectivamente, añadidas a uno de los reservorios (la cámara control, sin melatonina). El experimento se repitió 4 veces en cada época (reproductiva y no reproductiva).

La quimiotaxis espermática se analizó mediante el módulo de quimiotaxis incluido en el software libre OpenCASA (Alquezar-Baeta *et al.*, 2019), desarrollado por nuestro grupo de investigación. Este software detecta las coordenadas de la trayectoria de cada espermatozoide individualmente y las normaliza a un mismo punto de referencia. Para el análisis de la respuesta quimiotáctica se debe determinar una región de influencia, que denominamos área quimiotáctica, donde se establece el gradiente de la hormona, en este caso de 180° (**Figura 17**). En base a estos datos, el software calcula el índice SL (del inglés *Straight Line Index*) definido como el porcentaje de espermatozoides cuya trayectoria entra dentro del área quimiotáctica, basándose en su posición inicial y final.

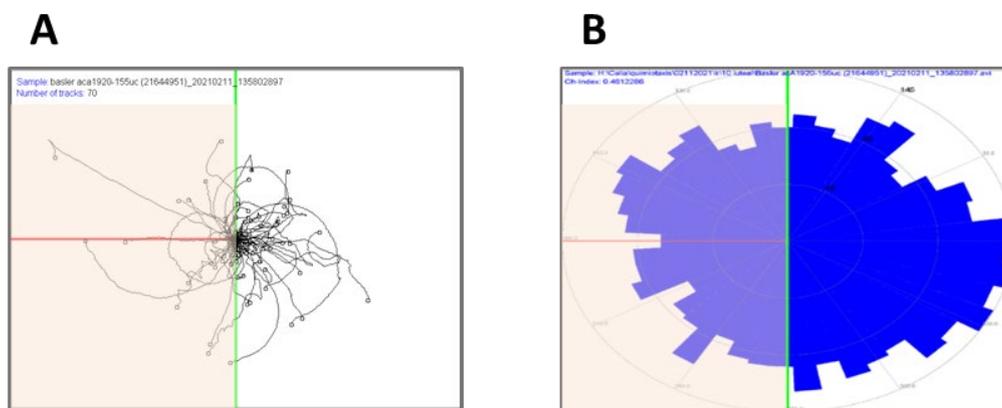


Figura 17. Imagen del análisis quimiotáctico proporcionado por el software OpenCASA. La sección izquierda de cada panel corresponde al área quimiotáctica de 180° (sombreado en rosa). **A.** Representación de las trayectorias de cada espermatozoide de manera individual, normalizadas a un mismo punto de referencia. **B.** Población de espermatozoides quimioatraídos hacia la sustancia quimiotáctica en posición 180°.

4.8 Análisis estadísticos

Los resultados se representan como la media \pm el error estándar de la media (S.E.M) del número de ensayos indicado en cada caso. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism, versión 5.03 o 8.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.). En todos los casos, se considera estadísticamente significativo un P valor menor de 0,05.

En primer lugar, para las variables continuas (datos de cuantificación densitométrica de las bandas proteicas del *western blot* y los parámetros cinéticos de motilidad) se evaluó la distribución de los datos mediante el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov o el de Shapiro Wilk, además de la homocedasticidad mediante el test de Levene. Cuando superaron

el test de normalidad (artículos 2 y 3), las diferencias entre los distintos grupos experimentales se analizaron por ANOVA, seguido de un test post- hoc de Bonferroni o Fisher. Sin embargo, cuando no lo superaron (perfiles proteicos de la fosfo-JNK y fosfo-p38 en el artículo 4), los datos se evaluaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de un test post-hoc de Dunn.

Las diferencias entre el índice de recuperación celular, los parámetros de motilidad, el estado de capacitación, los datos obtenidos por citometría de flujo (viabilidad, niveles de $\text{NO}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$, niveles de calcio intracelular y marcadores apoptóticos), así como la inmunolocalización de las proteínas, y la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides se evaluaron mediante el test de chi-cuadrado al ser variables categóricas.

5 RESULTADOS

5.1. ARTÍCULO-MANUSCRITO 1

In vitro approach points to a chemotactic effect of melatonin on ram spermatozoa

3 **In vitro approach points to a chemotactic effect of melatonin on**
4 **ram spermatozoa**

5 **Sara Miguel-Jiménez; Sonia Borao; Virginia Portolés-Bayod; Adriana Casao;**
6 **Rosaura Pérez-Pe***

7 Grupo BIOFITER-Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular – Instituto
8 Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Facultad de
9 Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Spain

10 *Corresponding author: Rosaura Pérez-Pe, rosaperez@unizar.es

11 **Abstract**

12 Sperm orientation mechanisms, such as chemotaxis, are essential for the sperm to reach the
13 oocyte and fertilize it. Melatonin is secreted by the cumulus cells and is also present in the
14 follicular fluid in mammals. The presence of membrane receptors for melatonin in ram
15 spermatozoa, and its proven involvement in the sperm functionality, may suggest a possible
16 role in the guided movement towards the oocyte. Hence, the objective of the present work
17 is to study the *in vitro* potential chemotactic action of melatonin on ram spermatozoa,
18 analysing the influence of the season (breeding and non-breeding) and the sperm
19 capacitation state. The first experimental approach consisted in the inclusion of melatonin
20 in the upper layer of a swim-up selection method. During the non-breeding season, the
21 presence of melatonin at 100 pM and 1 µM concentrations significantly increased the cell
22 recovery rate, and induced changes in the sperm location of the MT₂ melatonin receptor,
23 compared with the standard swim-up. Moreover, the selected sperm population with 100
24 pM melatonin presented a higher percentage of capacitated spermatozoa. The greater
25 recovery rate obtained with melatonin could be due to the stimulation of sperm movement
26 in random directions, i.e., a chemokinetic effect, or due to a guided movement (chemotaxis)
27 towards the gradient of the melatonin. To clarify this issue, together with the study of the
28 influence of the sperm capacitation status, we performed a second experimental approach
29 which consisted in the use of chemotaxis chambers and an open-source software (Open-

30 CASA) that analyses the sperm trajectories towards the hormone gradient and calculates a
31 chemotaxis index (SL index). There was a significant difference between the SL index in
32 the presence of 1 μM melatonin and the control without hormone. This effect was only
33 observed in capacitated spermatozoa with cAMP-elevating agents (Cap-CK samples)
34 obtained during the non-breeding season. These results would point to an *in vitro*
35 chemotactic effect of melatonin on ram spermatozoa, opening up the possibility of
36 including this hormone in the swim-up procedure to enhance the sperm recovery rate.

37 **Keywords: ram spermatozoa, chemotaxis, melatonin, capacitation**

38 **1 Background**

39 Sperm orientation towards the oocyte is an essential process for fertilization to take place.
40 Chemotaxis is one of the postulated mechanisms of sperm guidance and refers to the cell
41 movement to a gradient of a chemical factor, called the chemoattractant. This process was
42 first discovered in the mid-1960s in sea animals with external fertilization, such as sea
43 urchins and corals, whose spermatozoa are released into the seawater and swim towards a
44 chemoattractant secreted by the egg [1, 2]. However, chemotaxis in mammals has been
45 under debate over the years because it was thought that the number of ejaculated
46 spermatozoa was high enough to reach the oocyte accidentally without an attractive
47 stimulus from the egg. However, only a few of the millions of ejaculated sperm reach the
48 oviduct [3], and only capacitated and hyperactivated spermatozoa can penetrate the
49 cumulus cells surrounding the oocyte [4, 5]. Past studies strongly suggested that
50 chemotaxis must be involved in the sperm guidance towards the oocyte (reviewed by [1]),
51 and, although extremely difficult to study, chemotaxis in mammalian sperm has finally
52 been proved [6, 7].

53 Chemotaxis requires the sperm to detect the chemotactic signals, and numerous molecules
54 have been proposed sperm attractors. For example, many authors have pointed to the
55 follicular fluid, as it contains secretions from the oocyte and its surrounding cells;
56 moreover, the follicular fluid's *in vitro* chemotactic effect has been demonstrated in human,
57 mouse, stallion and boar [8-12] spermatozoa. Nevertheless, the composition of the
58 follicular fluid changes between species and follicular phases, and the identity of the
59 chemoattractants in this fluid remains unknown. One of the most studied chemoattractant
60 agents has been progesterone, as this hormone is released from the cumulus cells of the
61 preovulatory follicle near the time of ovulation. Some authors have reported its

62 chemoattractant role in human, mouse, pig and rabbit spermatozoa [13-16]. Another
63 hormone, the estradiol, together with cAMP and cGMP, seems to be essential for the
64 chemotaxis process in sperm, increasing the intracellular calcium levels [17-20]
65 responsible for the changes in the flagellar beat and the swimming behaviour of
66 spermatozoa [18, 21]. Other substances, such as atrial natriuretic peptide [22], heparin,
67 adrenalin, calcitonin acetylcholine and nitric oxide have also shown chemotactic effects in
68 spermatozoa (reviewed in [23, 24]). Melatonin is present in the female reproductive fluids
69 [25-28], and spermatozoa express melatonin receptors MT₁ and MT₂ [29]; thus, this
70 hormone could be hypothesized as a chemoattractant for sperm orientation. The role of
71 melatonin in chemotaxis has already been described in leukocytes [30] and retinal epithelial
72 cells [31], but, to date, no studies have been made in spermatozoa.

73 In ovine, the presence of MT₁ and MT₂ on sperm plasma membrane has also been
74 evidenced [32] and the direct effects of melatonin on ram spermatozoa has been reported,
75 especially in modulating capacitation. This effect depends on the melatonin concentration,
76 promoting capacitation at 100 pM and diminishing it at 1 μM, and seems to be mediated
77 by its binding to MT₂ [33, 34]. In the present study, we intended to study the putative
78 chemoattractant capacity of melatonin at these two concentrations in ram spermatozoa. For
79 this purpose, two different approaches were proposed: 1) evaluating the cell recovery rate
80 in a dextran/swim-up selection method in the presence of melatonin, also analysing the
81 quality of the recovered spermatozoa; and 2) the recording of the sperm trajectories towards
82 a melatonin gradient on a commercial device, and their analysis with an open software
83 (Open-CASA) [35].

84 **2 Methods**

85 Unless otherwise stated, all reagents were purchased from Merck KGaA (Darmstadt,
86 Germany).

87 **2.1 Sperm collection**

88 The experiments were carried out with fresh semen obtained from eight mature Rasa
89 Aragonesa rams (2 to 4 years old), using an artificial vagina. All the rams belonged to the
90 National Association of Rasa Aragonesa Sheep Breeders (Asociación Nacional de
91 Criadores de Ganado Ovino Selecto de Raza Rasa Aragonesa, ANGRA) and were housed
92 under uniform nutritional conditions at the Experimental Farm of the University of

93 Zaragoza (Spain). All experimental procedures were performed in compliance with the
94 requirements of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of
95 animals used for scientific purposes under Project License PI19/17 approved by the Ethics
96 Committee for Animal Experiments of the University of Zaragoza (approval date: 24 May
97 2017).

98 Two successive ejaculates were collected every 2 days, and the second ejaculates from four
99 ramps per day were pooled and used for each assay to avoid individual differences [36].
100 The mean time between semen collection and the start of the experiments in the laboratory
101 was no longer than 15 minutes. In order to determine the effect of seasonality on the results,
102 seminal samples were obtained during the breeding season (October to February) and non-
103 breeding season (April to June). Samples were kept at 37 °C until their use.

104 **2.2 Experiment 1**

105 *Sperm selection and experimental design*

106 In order to determine the effect of melatonin on sperm selection, the dextran/swim-up
107 method [37] was used. The medium used in this procedure (swim-up medium, SM) was
108 composed of 50 mM NaCl, 10 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄, 0.3 mM K₂HPO₄, 2.8 mM
109 glucose, 21 mM HEPES, 0.3 mM sodium pyruvate, 18.6 mM sodium lactate, 200 mM
110 sucrose, 1.5 UI/mL penicillin, and 15 µg/mL streptomycin, at pH 6.5.

111 For the swim-up method, 0.5 mL of semen were placed in a round-bottomed 15 mm
112 diameter tube, then carefully overlaid with 0.5 mL of Dx-SM (30 mg dextran/mL SM).
113 Finally, 1.5 mL of BSA-SM (5 mg bovine serum albumin BSA/ mL SM) were added on
114 top. The tubes were kept in a vertical position at 37 °C. After 15 min of incubation, 750 µL
115 were collected from the upper layer and replaced with the same volume of BSA-SM added
116 to the upper layer. The process was repeated three more times. Four supernatants were
117 obtained, but the first was discarded to avoid seminal plasma contamination. The three
118 remaining ones were pooled and named swim-up (sw) samples.

119 The melatonin was included in the BSA-SM at two different concentrations, 100 pM and
120 1 µM [38], and the swim-up recovered samples were named “sw-Mel 100 pM” and “sw-
121 Mel 1 µM”, respectively. Melatonin was diluted in DMSO and PBS (final DMSO
122 concentration 0.01% v/v); thus, 0.01% DMSO was added in the BSA-SM of the control
123 sample and named “sw-control”. Sperm samples were evaluated before (fresh semen) and

124 immediately after the swim-up procedure (sw-control, sw-Mel 100 pM or sw-Mel 1 μM)
 125 by determining the cell recovery rate, motility, viability, phosphatidylserine translocation,
 126 capacitation state and distribution of the melatonin receptor MT₂.

127 *Sperm concentration and cell recovery rate determination*

128 The sperm concentration was calculated in duplicate using a Neubauer's chamber
 129 (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany) and a microscope (Nikon Eclipse 50i, Nikon
 130 Instruments Inc, Tokyo, Japan) equipped with a 10x negative phase contrast lens. The
 131 ejaculated sample was diluted at 1:2000 (v/v) with water, whereas 1:100 (v/v) dilution was
 132 applied to the swim-up samples. The cell recovery rate was defined as:

$$133 \quad \text{cell recovery rate} = \frac{\text{swim - up sample concentration} \times 3 \times 0.75 \text{ mL}}{\text{ejaculated sample concentration} \times 0.5 \text{ mL}} \times 100$$

134 *Sperm motility evaluation*

135 Total and progressive motility and sperm kinematic parameters (curvilinear velocity
 136 (VCL), straight-line velocity (VSL), average path velocity (VAP), percentage of linearity
 137 (LIN), percentage of straightness (STR), wobble coefficient (WOB), mean amplitude of
 138 lateral head displacement (ALH) and beat-cross frequency (BCF)) were evaluated using
 139 the *Motility Module* of OpenCASA, a free and open-source software for sperm analysis
 140 that we have recently developed [35]. Two drops of 2 μL of each sample, diluted to a final
 141 concentration of 3 × 10⁷ cells/mL in a medium composed of 0.25 M sucrose, 0.1 mM
 142 EGTA, 10% (v/v) HEPES buffer and 4 mM phosphate buffer, with a pH of 7.5, were placed
 143 in a pre-warmed Makler counting chamber (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) and
 144 maintained at 37 °C during all the analyses by a heated slide holder. Spermatozoa were
 145 recorded with a video camera (Basler acA1920; Basler Vision Components, Ahrensburg,
 146 Germany) mounted on a microscope (Nikon Eclipse 50i, Nikon Instruments Inc, Tokyo,
 147 Japan) equipped with a 10x negative-phase contrast lens.

148 Recorded videos were evaluated with the following settings: 60 frames per second, 120
 149 frames, 800 × 600 pixels image resolution, 10 μm² minimum cell size, 100 μm² maximum
 150 cell size, STR (straightness coefficient) >80% and VAP (mean velocity) >90%, 10 μm/s
 151 minimum VCL (curvilinear velocity), 100 μm/s VCL lower threshold, 200 μm/s VCL upper
 152 threshold, 30 frames minimum track length and 20 μm maximum displacement between
 153 frames.

154 *Evaluation of sperm membrane integrity*

155 All the analyses were performed on a Beckman Coulter FC 500 (Beckman Coulter Inc.,
156 Brea, CA, USA) with CXP software, equipped with two excitation lasers (air-cooled argon
157 ion laser 488 nm and solid-state laser 633 nm) and 5 absorbance filters (FL1-525, FL2-575,
158 FL3-610, FL4-675 and FL5-755, ± 5 nm each bandpass filter). A minimum of 20,000
159 events was recorded in all the experiments. The sperm population was identified for further
160 analysis by the specific forward (FS) and side scatter (SS) properties; thus, other non-sperm
161 events were excluded. A flow rate stabilized at 200–300 cells/sec was used.

162 Cell viability (membrane integrity) was analysed by using double staining with propidium
163 iodide (PI) and carboxyfluorescein diacetate (CFDA) [39]. Sperm samples were loaded
164 with 3 μ L of 1 mM carboxyfluorescein diacetate (CFDA), 3 μ L of 1.5 mM propidium
165 iodide (PI) and 5 μ L of formaldehyde (0.5% (v/v) in water) to a final concentration of $5 \times$
166 10^6 cells/mL in a 300 μ L volume, and then incubated at 37 °C in darkness for 15 min.
167 Samples were assessed by flow cytometry using the argon laser and filters FL1-525 ± 5 nm
168 (CFDA) and FL4-675 ± 5 nm (PI) to avoid overlapping. The monitored parameters were
169 FS log, SS log, FL1 log (CFDA) and FL4 log (PI), and for the gated sperm cells,
170 percentages of viable spermatozoa (CFDA+/PI-) were evaluated.

171 *Assessment of capacitation status by chlortetracycline (CTC) staining*

172 Capacitation status was evaluated by a chlortetracycline (CTC) fluorescent assay [40],
173 which was previously validated for ram spermatozoa by our group [41]. A CTC solution
174 (750 μ M; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) was prepared daily in a buffer
175 containing 20 mM Tris, 130 mM NaCl and 5 μ M cysteine, with a pH of 7.8, and filtered
176 through a 0.22 μ m filter (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). For each sample, 18 μ L
177 (1.6×10^8 cells/mL) of sperm sample were stained with 20 μ L of CTC solution, fixed with
178 5 μ L of 1.25% (w/v) paraformaldehyde in 0.5 M Tris-HCl (pH 7.8) and incubated at 4 °C
179 in the dark for 30 min. Six microliters of the stained sample were placed onto a glass slide
180 and mixed with 2 μ L of 0.22 M 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) in glycerol:PBS
181 (9:1 v/v). The samples were covered with 24 x 60 mm coverslips, sealed with transparent
182 enamel and stored in the dark at -20 °C until evaluation with a Nikon Eclipse E-400
183 microscope (Nikon Corporation, Kanagawa, Japan) under epifluorescence illumination
184 with a V-2A filter. Spermatozoa were classified in subtypes following three staining
185 patterns [42]: NC (non-capacitated; fluorescence on all the head), C (capacitated;

186 fluorescence in the anterior region of the head) and AR (acrosome-reacted; with
187 fluorescence only at the equatorial segment or without fluorescence on the head). All
188 samples were processed in duplicate, and at least 200 spermatozoa were classified per slide.

189 *Indirect Immunofluorescence*

190 Melatonin receptor (MT₂) localization was revealed by indirect immunofluorescence
191 analyses (IIF), as previously described for ram spermatozoa by Casao et al. (2012) [32].
192 Sperm samples were diluted (4×10^6 cells/mL) in PBS and fixed in 0.5% (v/v)
193 formaldehyde at room temperature for 20 min. Then, cells were centrifuged at 900 X g,
194 and the pellet was resuspended in 500 μ L PBS. Forty microliters of cell suspension were
195 placed onto Superfrost slides (Superfrost Plus; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,
196 USA) and washed three times with PBS. Non-specific binding sites were blocked with 5%
197 (w/v) BSA in PBS for 5 h in a wet chamber. The slides were rewashed in PBS and incubated
198 at 4 °C overnight in a wet chamber with the primary antibody anti-MT₂ (RRID:
199 AB_1619198, from Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany) diluted 1/50 v/v) in PBS
200 with 1% (w/v) BSA. The next morning, the samples were washed three times with PBS
201 and incubated with the secondary antibody (Alexa Fluor 488 chicken anti-rabbit; Thermo
202 Fisher Scientific; Cat#A-21441, RRID: AB_2535859), diluted 1/600 (v/v) in PBS with 1%
203 (w/v) BSA for 90 min at room temperature in a wet chamber. The slides were then washed
204 three times with PBS before the addition of 6 μ L of 0.22 M 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
205 (DABCO) in glycerol:PBS (9:1 v/v) to enhance and preserve cell fluorescence. The slides
206 were covered with a coverslip and sealed with transparent enamel. Cells were visualized
207 with a Nikon Eclipse E400 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) under epifluorescence
208 illumination using a B-2A filter (X 1000). All samples were processed in duplicate, and at
209 least 150 spermatozoa were scored per slide.

210 **2.3 Experiment 2**

211 **2.3.1. *In vitro* capacitation**

212 In order to investigate the effect of the sperm capacitation status on the chemotactic
213 potential response to melatonin, swim-up selected (by standard dextran/swim-up)
214 spermatozoa (1.6×10^8 cells/mL) were incubated for 3 h under capacitating conditions: 39
215 °C in a humidified incubator with 5% CO₂ in air. Incubations were performed in a complete
216 TALP medium [43] containing 100 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0.3 mM
217 NaH₂PO₄, 21.6 mM Na lactate, 3 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM Na

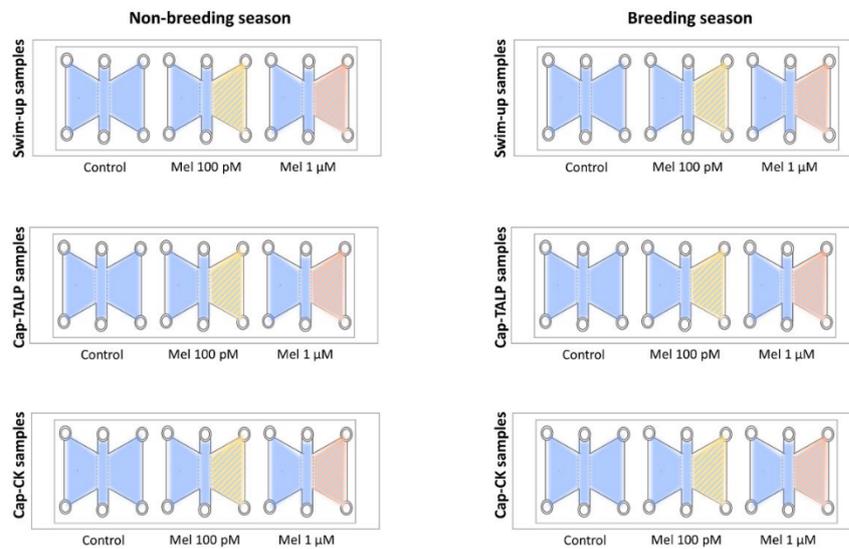
218 pyruvate, 5 mM glucose, and 5 mg/mL bovine serum albumin (BSA), with a pH of 7.2.
219 Ram spermatozoa are difficult to capacitate *in vitro*, and high levels of intracellular cAMP
220 are required. Thus, a specific cocktail of substances, already proven for triggering ram
221 sperm capacitation [41, 44], was added to the TALP medium. This cocktail was composed
222 of 1 mM dibutyryl (db)-cAMP, 1 mM caffeine, 1 mM theophylline, 0.2 mM okadaic acid
223 and 2.5 mM methyl- β -cyclodextrin. The samples incubated in TALP medium without or
224 with cAMP-elevating agents were named Cap-TALP and Cap-CK samples, respectively.

225 Swim-up samples were evaluated just after the procedure, and *in vitro* capacitated samples
226 were assessed after 3 h incubation.

227 **2.3.2. Influence of melatonin on sperm orientation.**

228 As it has been reported that only capacitated spermatozoa can respond to chemotactic
229 stimuli [13, 45-48], all experiments were carried out separately with swim-up selected
230 spermatozoa just after recovery (swim-up samples) or after incubation in capacitating
231 conditions with or without cAMP elevating agents (Cap-CK and Cap-TALP samples,
232 respectively).

233 Chemotaxis assays were performed using the disposable μ -Slide Chemotaxis device (ibidi
234 GmbH, Martinsried, Germany). The μ -Slide Chemotaxis includes three different chambers
235 for three parallel assays (Figure 1). Each chamber consists of two large reservoirs
236 connected by a narrow observation area. These compartments, the large reservoirs and the
237 narrow one, have two wells each where a pipette tip can be placed for filling them. The
238 chambers were filled as follows: first, 6 μ L of sperm sample was injected into the narrow
239 observation area, and immediately afterwards, the large two-sided reservoirs were each
240 filled with 65 μ L of the same sample (2.5×10^6 cells/mL) [6]. Once the chamber was
241 completely filled, 30 μ L of sperm suspension (2.5×10^6 cells/mL) without (control) or with
242 melatonin (100 pM and 1 μ M) was then applied on one of the reservoirs to avoid the
243 diminishing of the cell concentration by the application of the chemoattractant (Figure 1).
244 By the opposite well of the reservoir, 30 μ L were removed. Following loading, the slides
245 were incubated at 37 °C for 5 min to establish a concentration gradient of the hormone.
246 The swimming of the spermatozoa in the observation area was video-recorded at 200
247 frames per second for a total of 3 seconds using a video camera (acA1920-155uc, Basler,
248 Exton, PA) connected to a microscope (Nikon Eclipse 50i, Nikon, Tokyo, Japan) equipped
249 with a 10x negative-phase contrast lens.



250

251 **Figure 1.** Graphic scheme of the experimental design. In blue, the sperm suspension of
 252 swim-up, Cap-TALP or Cap-CK samples, filling the central narrow observation area and
 253 the two lateral reservoirs. In yellow and light red, blue striped, the sperm suspension with
 254 100 pM and 1 μ M melatonin, respectively, added to one of the reservoirs. The experiment
 255 was performed 4 times in each season (non-breeding and breeding).

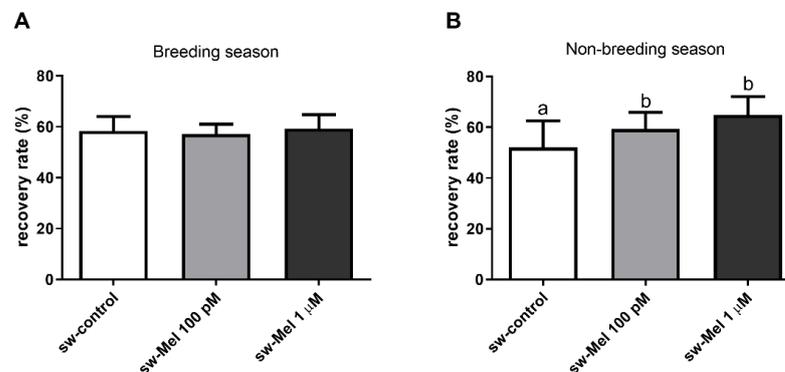
256 Sperm chemotaxis was analysed through the Chemotaxis Module included in the free,
 257 open-source software OpenCASA [35]. This software detects the trajectory coordinates of
 258 each spermatozoon and normalizes them to the same reference point. A region
 259 (chemotactic zone of influence) is selected to determine the hormone gradient region, in
 260 this case, 180°. Based on these data, the software calculates the SL (Straight Line) index,
 261 as the percentage of sperm whose trajectory enters the chemotactic area based on their
 262 initial and final positions.

263 2.4 Statistical analysis

264 Differences between the groups in the cell recovery rate, motility, viability, CTC staining,
 265 MT₂ immunotypes and SL index were analysed by means of the chi-square test.
 266 Differences in the kinematic parameters were analysed by one-way ANOVA after the
 267 evaluation of normality and homoscedasticity by the Kolmogorov-Smirnov test and
 268 Levene test, respectively. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8
 269 (v. 8.0.1; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

270 **3 Results**271 **3.1.Experiment 1**272 **3.1.1. Cell recovery rate**

273 The inclusion of melatonin (100 pM and 1 μ M) in the upper layer of the dextran/swim-up
274 did not result in differences during the breeding season. However, a significant ($p<0.05$)
275 increase was observed in the sperm recovery rate during the non-breeding season (52.05 %
276 \pm 10.47% in sw-control vs 59.33 % \pm 6.57 % in sw-Mel 100 pM and 64.83 % \pm 7.35 % in
277 sw-Mel 1 μ M samples; Figure 2).

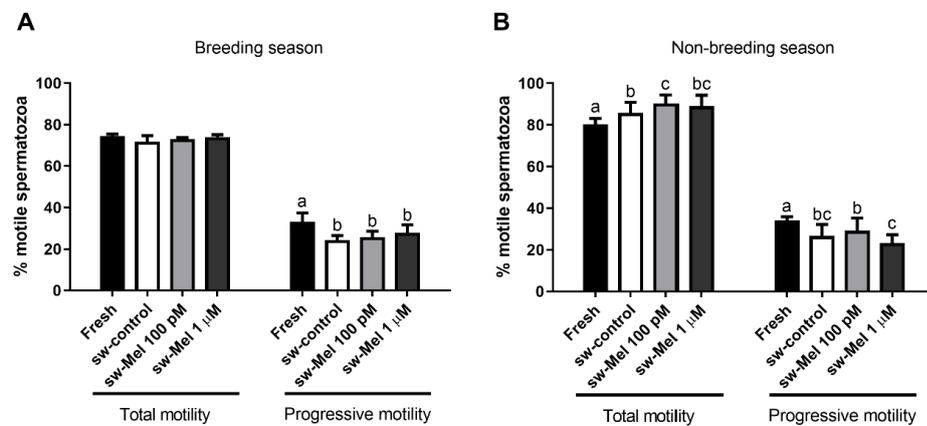


278

279 **Figure 2.** Cell recovery rate after dextran/swim-up procedure without (sw-control) and
280 with 100 pM and 1 μ M melatonin (sw-Mel) in the upper layer during breeding (A) and
281 non-breeding (B) seasons. Data are shown as mean \pm SEM (n = 6). Different letters indicate
282 significant differences ($p<0.05$).

283 **3.1.2. Motility and membrane integrity**

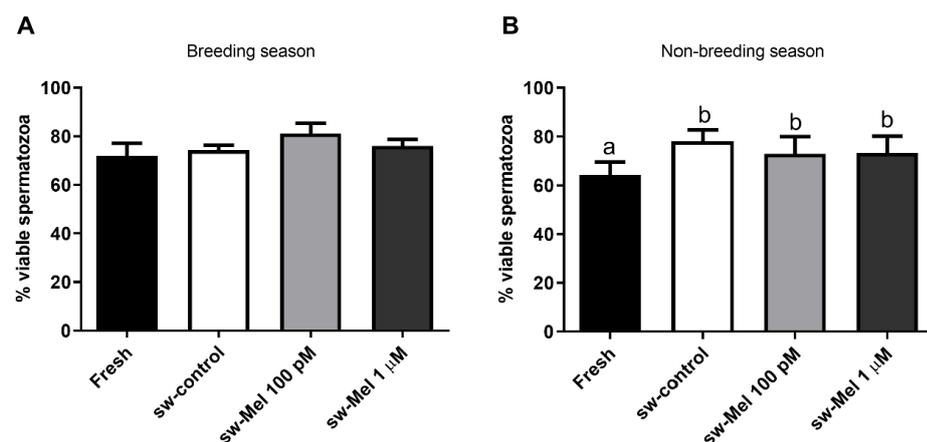
284 Compared with the fresh sample, the dextran/swim-up procedure improved the total
285 motility ($p<0.05$), but only during the non-breeding season (Figure 3). The inclusion of
286 melatonin in the upper layer during this season resulted in a higher percentage of motile
287 sperm compared with the control swim-up, especially with melatonin 100 pM ($p<0.05$)
288 (Figure 3B). Progressive motility decreased after the dextran/swim-up procedure in all
289 experimental samples and both seasons, although this decrease was lower when melatonin
290 100 pM was added during the non-reproductive season (Figure 3B). No significant
291 differences between treatments were found in the sperm kinematic parameters
292 (Supplementary material).



293

294 **Figure 3.** Percentage of total motile and progressive motile spermatozoa before (fresh) and
 295 after the dextran/swim-up procedure, without (sw-control) and with melatonin (sw-Mel
 296 100 pM and sw-Mel 1 μM) during the breeding (A) and non-breeding (B) seasons. Data
 297 are shown as mean ± SEM (n=6). Different letters indicate significant differences (p<0.05).

298 Sperm viability was improved by the dextran/swim-up procedure when performed during
 299 the non-breeding season (p<0.01), in comparison to the fresh sample (Figure 4). However
 300 this method did not improve the viability of samples collected in the breeding season.
 301 Nonetheless, no differences were observed among the three experimental swim-up
 302 procedures, demonstrating that melatonin did not affect sperm viability throughout the
 303 selection process (Figure 4B).



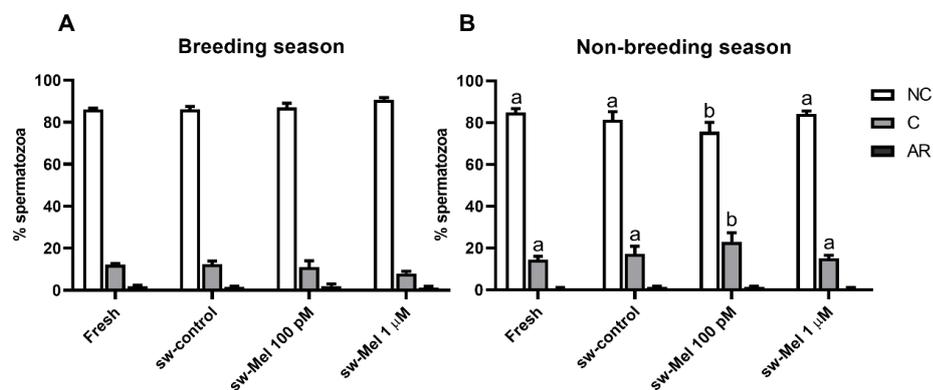
304

305 **Figure 4.** Percentage of live spermatozoa (CFDA+/PI-) before (fresh) and after the
 306 dextran/swim-up procedure, without (sw-control) and with melatonin (sw-Mel 100 pM and

307 sw-Mel 1 μ M) during the breeding (A) and non-breeding (B) seasons. Data are shown as
 308 mean \pm SEM (n=6). Different letters indicate significant differences (p<0.01).

309 3.1.3. Capacitation status

310 The spermatozoa selection by the standard dextran/swim-up procedure (sw-control) did not
 311 modify the capacitation status compared to the fresh ejaculate semen. Also, the addition of
 312 melatonin in the upper layer of the dextran/swim-up procedure during the breeding season
 313 did not alter the capacitation status (Figure 5A). Interestingly, during the non-breeding
 314 season (Figure 5B), the selection of sperm in the presence of melatonin at 100 pM
 315 concentration promoted a significant change in the capacitation state of the recovered cells
 316 (p<0.05). Specifically, an increase in the percentage of capacitated spermatozoa was
 317 detected, along with a concomitant decrease of non-capacitated sperm. However, no
 318 changes in the capacitation state were observed with melatonin 1 μ M. Finally, the sperm
 319 selection with melatonin at any concentration did not affect the percentage of acrosome
 320 reacted spermatozoa.

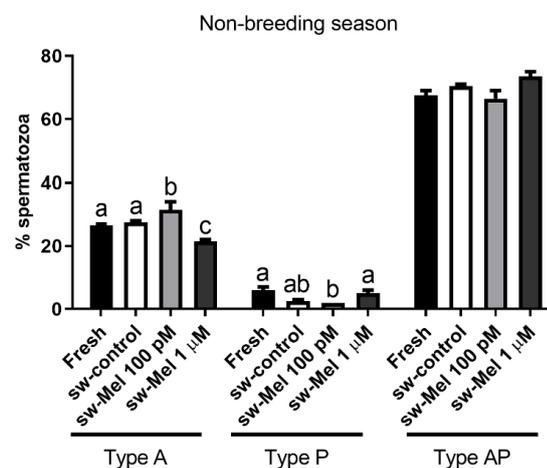


321

322 **Figure 5.** Assessment of capacitation status, evaluated by CTC, in ram spermatozoa before
 323 (fresh) and after dextran/swim-up selection without (sw-control) and with melatonin (sw-
 324 Mel 100 pM and sw-Mel 1 μ M) during the breeding (A) and non-breeding (B) seasons.
 325 Data of non-capacitated (NC), capacitated (C) and acrosome-reacted (AR) spermatozoa in
 326 each sample are shown as mean \pm SEM (n = 6). Different letters within the same sperm
 327 subtype indicate significant differences between experimental groups (p<0.05).

328 **3.1.4. Localization of MT₂ receptor in ram spermatozoa**

329 Since significant differences were observed in sperm capacitation between the different
 330 experimental groups during the non-breeding season, and previous works have evidenced
 331 changes in the localization of the melatonin receptor MT₂ during the capacitation process
 332 [49], we decided to study the distribution of this receptor in both the initial sample as those
 333 selected by swim-up in this season. As shown in Figure 6, three immunotypes were
 334 observed and classified as [49]: Type A, greater staining intensity at the acrosome than the
 335 post-acrosome; Type P, greater staining intensity at the post-acrosome region than the
 336 acrosome; and Type AP, same immunostaining intensity at both the acrosome and post-
 337 acrosome. The selected samples obtained in the presence of low melatonin concentration
 338 (sw-Mel 100 pM) showed a significantly ($p < 0.01$) higher percentage of Type A
 339 spermatozoa. In contrast, the selection with the higher melatonin concentration (sw-Mel 1
 340 μ M) decreased this percentage compared to fresh and standard swim-up samples (sw-
 341 control). Opposite results were found in the presence of both melatonin concentrations
 342 when analysing the Type P sperm population, where a significantly lower percentage
 343 ($p < 0.05$) was observed with melatonin 100 pM compared to the fresh sample. However,
 344 no differences were found in the Type AP subpopulation between treatments.



345

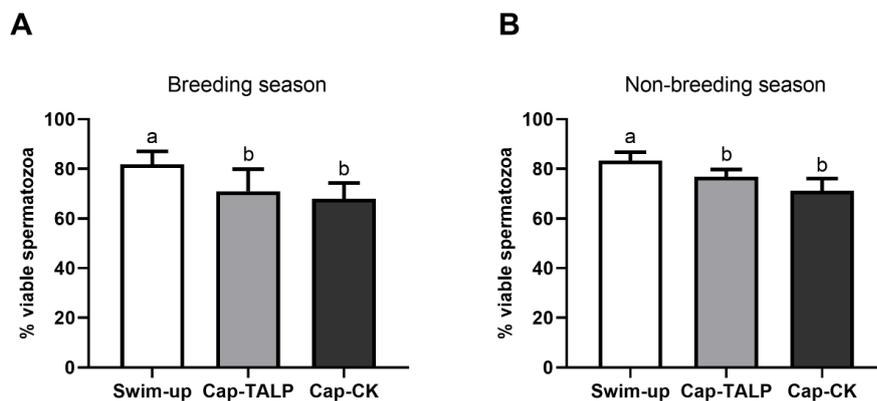
346 **Figure 6.** Percentages of MT₂ melatonin receptor immunotypes in ram spermatozoa before
 347 (fresh) and after dextran/swim-up sperm selection without (sw-control) and with melatonin
 348 (sw-Mel 100 pM and sw-Mel 1 μ M) during the non-breeding season. Data of Type A sperm
 349 (more intensity of acrosome staining than post-acrosome), Type P sperm (more intense
 350 staining on post-acrosome than acrosome), and Type AP sperm (equal staining on both

351 acrosome and post-acrosome) are shown as mean \pm SEM (n = 4). Different letters indicate
 352 statistical differences between experimental groups within the same immunotype (p<0.05).

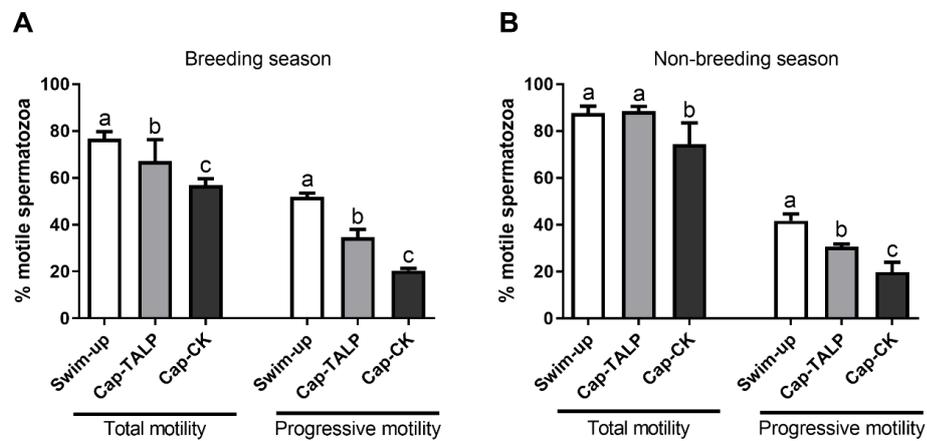
353 **3.2 Experiment 2**

354 **3.2.1. Evaluation of sperm *in vitro* capacitation**

355 The induction of *in vitro* capacitation in ram spermatozoa affected motility, capacitation
 356 status, and cell viability related to membrane integrity. Viability decreased in the
 357 capacitated samples (p<0.05; Figure 7) in both seasons but remained at suitably high
 358 values. Also, total and progressive motility significantly declined (p<0.05) after *in vitro*
 359 capacitation in both seasons (Figure 8). The most notable effect (p<0.001) was observed
 360 when incubation was carried out in TALP with cAMP-elevating agents (Cap-CK), with a
 361 decrease of around 20% in total and progressive motility, irrespective of the season.



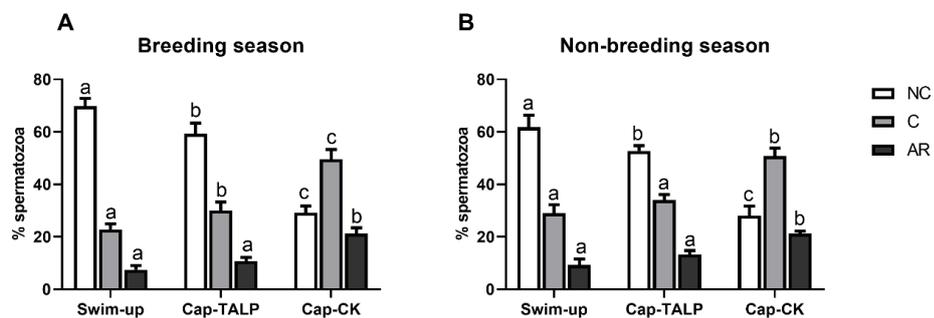
362
 363 **Figure 7.** Percentage of viable spermatozoa (CFDA+/PI-) before (swim-up) and after *in*
 364 *vitro* capacitation without (Cap-TALP) and with cAMP-elevating agents (Cap-CK) in
 365 breeding (A) and non-breeding (B) seasons. Data are shown as mean \pm SEM (n = 4).
 366 Different letters indicate significant differences (p<0.05).



367

368 **Figure 8.** Percentage of total and progressive spermatozoa before (swim-up) and after *in*
 369 *vitro* capacitation without (Cap-TALP) and with cAMP-elevating agents (Cap-CK) in
 370 breeding (A) and non-breeding (B) seasons. Data are shown as mean \pm SEM (n = 4).
 371 Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

372 In order to test that the *in vitro* capacitation was correctly induced, the capacitation status
 373 was evaluated by chlortetracycline staining (CTC) (Figure 9). During the breeding season,
 374 the percentage of non-capacitated spermatozoa was significantly ($p < 0.05$) lower in the
 375 Cap-TALP and Cap-CK than in the swim-up samples ($69.75\% \pm 3.03\%$ in swim-up vs
 376 $59.25\% \pm 4.13\%$ in Cap-TALP and $29.25\% \pm 2.53\%$ in Cap-CK; Figure 9A). In
 377 concordance with these results, the percentage of capacitated spermatozoa increased after
 378 the incubation in capacitating conditions, especially when cAMP-elevating agents were
 379 added to the medium (Cap-CK sample), even doubling the rate ($p < 0.001$) in comparison
 380 with the swim-up sample ($22.75\% \pm 2.17\%$ in swim-up vs $49.50\% \pm 3.80\%$ in Cap-CK).
 381 Similar results were observed during the non-breeding season (Figure 9B), except for the
 382 lack of statistical significance in the percentage of capacitated spermatozoa in the Cap-
 383 TALP compared to the swim-up samples. Conversely, the percentage of non-capacitated
 384 spermatozoa decreased after *in vitro* capacitation in the TALP medium without cAMP-
 385 elevating agents ($p < 0.05$). Regarding the acrosome reaction, *in vitro* capacitation with high
 386 cAMP triggered a significantly higher percentage of spermatozoa undergoing this process
 387 ($p < 0.001$) than in the swim-up and Cap-TALP samples, in both non-breeding and breeding
 388 seasons.

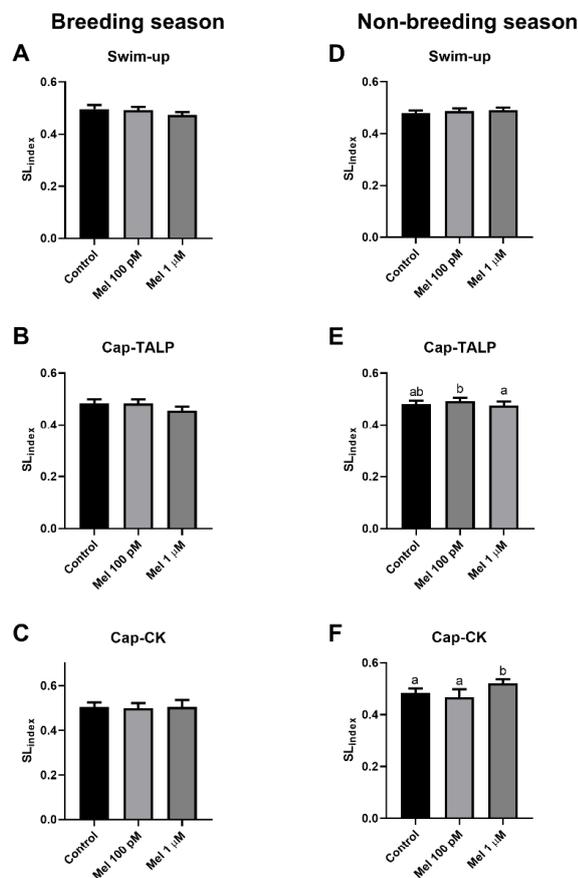


389

390 **Figure 9.** Assessment of capacitation status, evaluated by CTC, in ram spermatozoa before
 391 (swim-up) and after *in vitro* capacitation without (Cap-TALP) and with cAMP-elevating
 392 agents (Cap-CK) during breeding (A) and non-breeding (B) seasons. Data of non-
 393 capacitated (NC), capacitated (C) and acrosome-reacted (AR) spermatozoa in each sample
 394 are shown as mean \pm SEM (n = 4). Different letters within the same sperm subtype indicate
 395 significant differences between experimental groups ($p < 0.05$).

396 3.2.2. Influence of melatonin on sperm orientation

397 In regarding the chemotaxis analysis, no changes were detected in the SL index in the
 398 presence of melatonin during the breeding season (Figures 10A-C). However, in the non-
 399 breeding season, an increment in the SL index was observed when the Cap-CK samples
 400 were exposed to the influence of 1 μ M melatonin (0.48 ± 0.01 in the control and $0.52 \pm$
 401 0.01 with melatonin 1 μ M, $p < 0.01$; Figure 10F). No chemotactic behaviour was observed
 402 when 100 pM melatonin was added or the cap-TALP samples were tested (Figure 10E).



403

404 **Figure 10.** Chemotactic response (SL index) in the absence (control) or presence of
 405 melatonin (Mel 100 pM and 1 μM) in the chamber of ram spermatozoa before (swim-up)
 406 and after *in vitro* capacitation without (Cap-TALP) and with cAMP-elevating agents (Cap-
 407 CK) during breeding (A-C) and non-breeding (D-F) seasons.. Data are shown as mean ±
 408 SEM (n = 4). Different letters indicate significant differences (p < 0.05).

409 4 Discussion

410 Sperm cells must finish their maturation during their transit across the female reproductive
 411 tract to reach their fertilizing ability [50]. The so-called capacitation process involves
 412 membrane remodelling and motility hyperactivation, among other changes [51-53]. . What
 413 is more, only those spermatozoa that are capacitated and hyperactivated are able to
 414 penetrate the cumulus cells surrounding the oocyte [4]. Thus, there are few possibilities for
 415 the sperm to successfully fertilize the egg, and guidance mechanisms must be involved in

416 achieving the sperm-egg fusion. Previous studies have demonstrated the chemoattractant
417 capacity of the follicular fluid in mammalian spermatozoa [9, 11, 55, 56], but the question
418 of which substances act in this chemotaxis response remains unresolved. In the present
419 study, we propose melatonin as a possible candidate to attract ram spermatozoa, since it is
420 present in the oocyte environment [28] and can exert direct effects on spermatozoa [33,
421 34]. Our first approach, consisting of the inclusion of melatonin in the upper layer of the
422 dextran/swim-up procedure (experiment 1), showed a higher sperm recovery rate compared
423 with the standard method without hormone, but only during the non-breeding season.
424 Although the presence of melatonin in the recovery medium did not change the percentage
425 of viability compared to the standard swim-up, taking into account the higher recovery rate
426 achieved with the addition of hormone, a greater number of viable cells in absolute values
427 were selected. On the other hand, the sperm sample selected in the presence of 100 pM
428 melatonin contained a higher percentage of capacitated spermatozoa than other samples.
429 The doubt that arises from this finding is whether capacitated spermatozoa in the fresh
430 sample are more stimulated by 100 pM melatonin than non-capacitated ones or if
431 spermatozoa that swim to the top of the tube become capacitated once they are in the
432 collecting media with melatonin 100 pM. Previous results of our group demonstrated that
433 melatonin at 100 pM, unlike 1 μ M, enhances ram sperm capacitation under capacitating
434 conditions [33, 34]. Although the incubation conditions were different in the present study,
435 100 pM melatonin could have induced sperm capacitation during the swim-up process.
436 Moreover, the selected sample obtained in the presence of 100 pM melatonin showed a
437 higher percentage of the sperm subpopulation exhibiting MT₂ receptor in the acrosome
438 region than the other selected samples (standard swim-up or with 1 μ M melatonin). This
439 was in agreement with Gonzalez-Arto et al. (2016) [57], who described a positive
440 correlation between the acrosome labelling of MT₂ and the capacitated sperm rate.

441 The higher sperm recovery rate in the presence of melatonin at both concentrations means
442 that more spermatozoa swam from the bottom to the top of the tube. This fact could be due
443 to the stimulation of movement in random directions, i.e., a chemokinetic effect, or a
444 guided movement provoked by the chemotactic gradient of melatonin formed between the
445 bottom and the upper layer. Considering that it is generally accepted that chemokinesis
446 implies changes in speed or alterations of the amplitude or frequency of the motile character
447 [58], we compared sperm velocities in the three swim-up samples, and no significant
448 differences between them were found. So, the higher sperm recovery in the presence of

449 melatonin could point to a chemoattractant effect of this hormone. To clarify this issue, as
450 well as the influence of the sperm capacitation status, we performed the second set of
451 experiments. Significant differences, although small, were found between the percentage
452 of spermatozoa moving towards 1 μ M melatonin and those swimming to the control
453 without hormone, but only in capacitated spermatozoa with high cAMP levels (Cap-CK
454 samples) obtained during the non-breeding season. This finding is in concordance with
455 other studies that demonstrated that chemoattraction occurs only in capacitated
456 spermatozoa, at least in human, mouse, bull and rabbit samples [13, 45-48]. In our
457 experiments, no sperm chemoattraction was evidenced with the gradient formed by 100
458 pM melatonin in the chamber. Although the experimental approach is very different
459 between experiments 1 and 2, the lack of effect of melatonin 100 pM in the latter would
460 suggest that the increment in the recovery rate in the first experiment was not due to a
461 chemoattractant effect but to the ability of melatonin 100 pM to increase total motility, and
462 probably hyperactivation, linked to the capacitation state so that spermatozoa would swim
463 better towards the upper layer than in the standard swim-up.

464 In contrast, no differences were observed when experiments were carried out in the
465 breeding season. This may be due to the high melatonin levels found in the seminal plasma
466 during the reproductive season which we reported in a previous work [38]. Melatonin in
467 ram seminal plasma showed monthly variations, with a decrease after the winter solstice
468 and a rise after the summer solstice, reaching maximum levels in October-November, and
469 a marked seasonal variation ($P < 0.01$) with higher levels in the breeding season. Since the
470 seminal plasma is present together with the spermatozoa at the bottom of the tube during
471 the swim-up procedure, this could prevent establishment of the hormone gradient in the
472 medium and, therefore, the possible chemotaxis events. Another possibility could be that
473 spermatozoa had already been exposed to a high melatonin concentration in the ejaculates
474 obtained during the breeding season, so the melatonin receptors may not perceive the
475 hormone stimuli in the same manner as in the non-breeding season [59]. Also, in
476 experiment 2, sperm samples obtained during the breeding season were not able to respond
477 to melatonin, although *in vitro* capacitation was successful in both seasons. This could be
478 explained by the exposure of spermatozoa to a high melatonin concentration in the seminal
479 plasma during the breeding season, which could mask the *in vitro* effects, as mentioned
480 above.

481 Finally, it is worth noting that the chambers used for the study of chemotaxis are not
482 specific for sperm, but for slow-moving cells [60]. The use of specific chambers or devices
483 which allow sperm recovery after the chemotaxis assay in the assessment of sperm
484 parameters could shed more light on the study of sperm chemotaxis.

485

486 **5 Conclusions**

487 In conclusion, melatonin at 1 μ M seems to exert a light chemotactic attraction on ram
488 spermatozoa *in vitro*. The inclusion of melatonin at this concentration in the recovery layer
489 during the dextran/swim-up procedure leads to a high number of recovered spermatozoa
490 without affecting their capacitation status or kinematic parameters. The assays using
491 chemotaxis chambers would point to this chemotactic effect of 1 μ M melatonin on ram
492 spermatozoa obtained in the non-breeding season and after *in vitro* capacitation with high
493 cAMP levels. Melatonin at 100 pM concentration also results in an increase of the
494 recovered spermatozoa during the dextran/swim-up procedure but it seems to be due to a
495 capacitation-mediated effect. The inclusion of melatonin in the swim-up procedure could
496 be considered in order to optimize the swim-up-selection protocol depending on whether
497 more sperm, capacitated or not, are needed for their use in assisted reproductive techniques.

498

499 **6 Conflict of Interest**

500 *The authors declare no conflicts of interest that could be perceived as prejudicing the*
501 *impartiality of the research reported.*

502 **7 Author Contributions**

503 **Sara Miguel-Jiménez:** Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation and
504 Writing-original draft preparation. **Sonia Borao:** Methodology, Formal analysis,
505 Investigation and Data curation. **Virginia Portolés-Bayod:** Methodology, Formal
506 analysis, Investigation and Data curation. **Adriana Casao:** Conceptualization, Formal
507 analysis, Investigation, Data curation, Writing-review and editing and Supervision.
508 **Rosaura Pérez-Pe:** Conceptualization, Investigation, Data curation, Writing-review and
509 editing, Supervision, Project administration and Funding acquisition.

510 All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

511 **8 Funding**

512 This research was funded by Ministerio de Economía, Industria y Competitividad
513 (CICYT AGL-2017-83799-R) and Gobierno de Aragón (DGA A07 20R). S.M.-J. has a
514 predoctoral contract from the Diputación General de Aragón (DGA).

515 **9 Acknowledgments**

516 The authors would like to acknowledge the use of the Servicio General de Apoyo a la
517 Investigación-SAI (Universidad de Zaragoza), ANGRA for supplying the sires, and the
518 funding by Ministerio de Economía Industria y Competitividad (CICYT AGL-2017-
519 83799-R) and Gobierno de Aragón (DGA A07 20R).

520 **10 References**

- 521 [1] Eisenbach M. Sperm chemotaxis. *Rev Reprod.* 1999;4:56-66.
522 [2] Miller RL. Sperm chemo-orientation in the metazoa. New York: Academic Press; 1985.
523 [3] Williams M, Hill CJ, Scudamore I, Dunphy B, Cooke ID, Barratt CL. Sperm numbers
524 and distribution within the human fallopian tube around ovulation. *Hum Reprod.*
525 1993;8:2019-26.
526 [4] Jaiswal BS, Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Eisenbach M. Sperm capacitation is, after
527 all, a prerequisite for both partial and complete acrosome reaction. *FEBS Lett.*
528 1998;427:309-13.
529 [5] Suarez SS, Dai X. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating
530 viscoelastic media. *Biol Reprod.* 1992;46:686-91.
531 [6] Armon L, Caplan SR, Eisenbach M, Friedrich BM. Testing human sperm chemotaxis:
532 how to detect biased motion in population assays. *PLoS One.* 2012;7:e32909.
533 [7] Eisenbach M, Giojalas LC. Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg.
534 *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:276-85.
535 [8] Navarro MC, Valencia J, Vázquez C, Cózar E, Villanueva-Diaz C. Crude Mare
536 Follicular Fluid Exerts Chemotactic Effects on Stallion Spermatozoa. *Reproduction in*
537 *Domestic Animals.* 2007;33:331-24.
538 [9] Oliveira RG, Tomasi L, Rovasio RA, Giojalas LC. Increased velocity and induction of
539 chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids. *J Reprod*
540 *Fertil.* 1999;115:23-7.
541 [10] Ralt D, Goldenberg M, Fetterolf P, Thompson D, Dor J, Mashiach S, et al. Sperm
542 attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. *Proc Natl Acad*
543 *Sci U S A.* 1991;88:2840-4.
544 [11] Vieira LA, Diana A, Soriano-Úbeda C, Matás C. Selection of Boar Sperm by
545 Reproductive Biofluids as Chemoattractants. *Animals.* 2021;11:53.
546 [12] Villanueva-Diaz C, Vadillo-Ortega F, Kably-Ambe A, Diaz-Pérez MA, Krivitzky SK.
547 Evidence that human follicular fluid contains a chemoattractant for spermatozoa. *Fertil*
548 *Steril.* 1990;54:1180-2.

- 549 [13] Gatica LV, Guidobaldi HA, Montesinos MM, Teves ME, Moreno AI, Uñates DR, et
550 al. Picomolar gradients of progesterone select functional human sperm even in subfertile
551 samples. *Mol Hum Reprod.* 2013;19:559-69.
- 552 [14] Guidobaldi HA, Teves ME, Uñates DR, Anastasia A, Giojalas LC. Progesterone from
553 the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus
554 complex. *PLoS One.* 2008;3:e3040.
- 555 [15] Vanderhyden BC, Tonary AM. Differential regulation of progesterone and estradiol
556 production by mouse cumulus and mural granulosa cells by A factor(s) secreted by the
557 oocyte. *Biol Reprod.* 1995;53:1243-50.
- 558 [16] Yamashita Y, Shimada M, Okazaki T, Maeda T, Terada T. Production of progesterone
559 from de novo-synthesized cholesterol in cumulus cells and its physiological role during
560 meiotic resumption of porcine oocytes. *Biol Reprod.* 2003;68:1193-8.
- 561 [17] Gakamsky A, Armon L, Eisenbach M. Behavioral response of human spermatozoa to
562 a concentration jump of chemoattractants or intracellular cyclic nucleotides. *Hum Reprod.*
563 2009;24:1152-63.
- 564 [18] Kaupp UB, Solzin J, Hildebrand E, Brown JE, Helbig A, Hagen V, et al. The signal
565 flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm. *Nat Cell Biol.*
566 2003;5:109-17.
- 567 [19] Matsumoto M, Solzin J, Helbig A, Hagen V, Ueno S, Kawase O, et al. A sperm-
568 activating peptide controls a cGMP-signaling pathway in starfish sperm. *Dev Biol.*
569 2003;260:314-24.
- 570 [20] Orihuela PA, Parada-Bustamante A, Cortes PP, Gatica C, Croxatto HB. Estrogen
571 receptor, cyclic adenosine monophosphate, and protein kinase A are involved in the
572 nongenomic pathway by which estradiol accelerates oviductal oocyte transport in cyclic
573 rats. *Biol Reprod.* 2003;68:1225-31.
- 574 [21] Bohmer M, Van Q, Weyand I, Hagen V, Beyermann M, Matsumoto M, et al. Ca²⁺
575 spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm. *EMBO J.* 2005;24:2741-52.
- 576 [22] Bian F, Mao G, Guo M, Mao G, Wang J, Li J, et al. Gradients of natriuretic peptide
577 precursor A (NPPA) in oviduct and of natriuretic peptide receptor 1 (NPR1) in
578 spermatozoon are involved in mouse sperm chemotaxis and fertilization. *J Cell Physiol.*
579 2012;227:2230-9.
- 580 [23] Eisenbach M. Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation.
581 *Dev Genet.* 1999;25:87-94.
- 582 [24] Machado-Oliveira G, Lefièvre L, Ford C, Herrero MB, Barratt C, Connolly TJ, et al.
583 Mobilisation of Ca²⁺ stores and flagellar regulation in human sperm by S-nitrosylation: a
584 role for NO synthesised in the female reproductive tract. *Development.* 2008;135:3677-86.
- 585 [25] Brzezinski A, Seibel MM, Lynch HJ, Deng MH, Wurtman RJ. Melatonin in human
586 preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64:865-7.
- 587 [26] El-Raey M, Geshi M, Somfai T, Kaneda M, Hirako M, Abdel-Ghaffar AE, et al.
588 Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing
589 oocyte maturation in vitro in cattle. *Mol Reprod Dev.* 2011;78:250-62.
- 590 [27] Shi JM, Tian XZ, Zhou GB, Wang L, Gao C, Zhu SE, et al. Melatonin exists in porcine
591 follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of
592 porcine oocytes. *J Pineal Res.* 2009;47:318-23.
- 593 [28] Xiao L, Hu J, Song L, Zhang Y, Dong W, Jiang Y, et al. Profile of melatonin and its
594 receptors and synthesizing enzymes in cumulus-oocyte complexes of the developing sheep
595 antral follicle—a potential estradiol-mediated mechanism. *Reprod Biol Endocrinol.*
596 2019;17:1.

- 597 [29] Gonzalez-Arto M, Vicente-Carrillo A, Martinez-Pastor F, Fernandez-Alegre E, Roca
598 J, Miro J, et al. Melatonin receptors MT1 and MT2 are expressed in spermatozoa from
599 several seasonal and nonseasonal breeder species. *Theriogenology*. 2016;86:1958-68.
- 600 [30] Pena C, Rincon J, Pedreanez A, Viera N, Mosquera J. Chemotactic effect of melatonin
601 on leukocytes. *J Pineal Res*. 2007;43:263-9.
- 602 [31] Shirakawa H, Ogino N. Novel activity of melatonin. Its chemotactic effect on retinal
603 pigment epithelial cells. *Ophthalmic Res*. 1987;19:226-9.
- 604 [32] Casao A, Gallego M, Abecia JA, Forcada F, Perez-Pe R, Muino-Blanco T, et al.
605 Identification and immunolocalisation of melatonin MT(1) and MT(2) receptors in Rasa
606 Aragonesa ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 2012;24:953-61.
- 607 [33] Casao A, Mendoza N, Perez-Pe R, Grasa P, Abecia JA, Forcada F, et al. Melatonin
608 prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility
609 rate. *J Pineal Res*. 2010;48:39-46.
- 610 [34] Gimeno-Martos S, Casao A, Yeste M, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T, Perez-Pe
611 R. Melatonin reduces cAMP-stimulated capacitation of ram spermatozoa. *Reprod Fertil*
612 *Dev*. 2019;31:420-31.
- 613 [35] Alquezar-Baeta C, Gimeno-Martos S, Miguel-Jimenez S, Santolaria P, Yaniz J,
614 Palacin I, et al. OpenCASA: A new open-source and scalable tool for sperm quality
615 analysis. *PLoS Comput Biol*. 2019;15:e1006691.
- 616 [36] Ollero M, Muino-Blanco T, Lopez-Perez MJ, Cebrian-Perez JA. Viability of ram
617 spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *Int J Androl*.
618 1996;19:287-92.
- 619 [37] García-López N, Ollero M, Muño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. A dextran swim-up
620 procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal
621 plasma. *Theriogenology*. 1996;46:141-51.
- 622 [38] Casao A, Cebrian I, Asumpcao ME, Perez-Pe R, Abecia JA, Forcada F, et al. Seasonal
623 variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and
624 antioxidant enzymes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8:59.
- 625 [39] Harrison RA, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in
626 mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1990;88:343-52.
- 627 [40] Ward CR, Storey BT. Determination of the time course of capacitation in mouse
628 spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol*. 1984;104:287-96.
- 629 [41] Grasa P, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T. Signal transduction mechanisms
630 involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reproduction*. 2006;132:721-32.
- 631 [42] Gillan L, Evans G, Maxwell WM. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-
632 thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 1997;9:481-7.
- 633 [43] Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by
634 heparin. *Biol Reprod*. 1988;38:1171-80.
- 635 [44] Colas C, James P, Howes L, Jones R, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T. Cyclic-
636 AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during
637 ram sperm capacitation. *Reprod Fertil Dev*. 2008;20:649-58.
- 638 [45] Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Dor J, Mashiach S, Eisenbach M. Sperm capacitation
639 in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors.
640 *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92:11039-43.
- 641 [46] Dominguez EM, Moreno-Irusta A, Guidobaldi HA, Tribulo H, Giojalas LC. Improved
642 bovine in vitro embryo production with sexed and unsexed sperm selected by chemotaxis.
643 *Theriogenology*. 2018;122:1-8.
- 644 [47] Fabro G, Rovasio RA, Civalero S, Frenkel A, Caplan SR, Eisenbach M, et al.
645 Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel
646 directionality-based assay. *Biol Reprod*. 2002;67:1565-71.

- 647 [48] Guidobaldi HA, Hirohashi N, Cubilla M, Buffone MG, Giojalas LC. An intact
648 acrosome is required for the chemotactic response to progesterone in mouse spermatozoa.
649 *Mol Reprod Dev.* 2017;84:310-5.
- 650 [49] Gonzalez-Arto M, Luna C, Perez-Pe R, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA, Casao A.
651 New evidence of melatonin receptor contribution to ram sperm functionality. *Reprod Fertil*
652 *Dev.* 2016;28:924-35.
- 653 [50] Austin CR, Bishop MW. Capacitation of mammalian spermatozoa. *Nature.*
654 1958;181:851.
- 655 [51] Gadella BM, Harrison RA. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase
656 A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma
657 membrane. *Development.* 2000;127:2407-20.
- 658 [52] Puga Molina LC, Luque GM, Balestrini PA, Marín-Briggiler CI, Romarowski A,
659 Buffone MG. Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. *Frontiers in Cell and*
660 *Developmental Biology.* 2018;6.
- 661 [53] Yanagimachi R, Noda YD. Physiological changes in the postnuclear cap region of
662 mammalian spermatozoa: a necessary preliminary to the membrane fusion between sperm
663 and egg cells. *J Ultrastruct Res.* 1970;31:486-93.
- 664 [54] Barratt CL, Cooke ID. Sperm transport in the human female reproductive tract--a
665 dynamic interaction. *Int J Androl.* 1991;14:394-411.
- 666 [55] Giojalas LC, Rovasio RA. Mouse spermatozoa modify their motility parameters and
667 chemotactic response to factors from the oocyte microenvironment. *Int J Androl.*
668 1998;21:201-6.
- 669 [56] Sun F, Bahat A, Gakamsky A, Girsh E, Katz N, Giojalas LC, et al. Human sperm
670 chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm
671 chemoattractants. *Hum Reprod.* 2005;20:761-7.
- 672 [57] Gonzalez-Arto M, Luna C, Pérez-Pé R, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA, Casao A.
673 New evidence of melatonin receptor contribution to ram sperm functionality.
674 *Reproduction, Fertility and Development.* 2016;28:924-35.
- 675 [58] Ralt D, Manor M, Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Ben-Shlomo I, Makler A, et al.
676 Chemotaxis and Chemokinesis of Human Spermatozoa to Follicular Factors1. *Biology of*
677 *Reproduction.* 1994;50:774-85.
- 678 [59] Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestine S, Melan MA. Melatonin
679 receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sciences.*
680 2003;72:2183-98.
- 681 [60] Tomasova L, Guttenberg Z, Hoffmann B, Merkel R. Advanced 2D/3D cell migration
682 assay for faster evaluation of chemotaxis of slow-moving cells. *PLOS ONE.*
683 2019;14:e0219708.
- 684

5.2. ARTÍCULO 2

***NADPH Oxidase 5 and Melatonin:
Involvement in Ram Sperm Capacitation***



NADPH Oxidase 5 and Melatonin: Involvement in Ram Sperm Capacitation

Sara Miguel-Jiménez, Blanca Pina-Beltrán, Sílvia Gimeno-Martos, Melissa Carvajal-Serna, Adriana Casao and Rosaura Pérez-Pe*

Grupo BIOFITER-Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular – Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Ana Josefa Soler,
University of Castilla-La Mancha,
Spain

Reviewed by:

David Martin Hidalgo,
University of Porto, Portugal
Satoshi Kishigami,
University of Yamanashi, Japan

*Correspondence:

Rosaura Pérez-Pe
rospez@unizar.es

Specialty section:

This article was submitted to
Cell Growth and Division,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

Received: 19 January 2021

Accepted: 24 March 2021

Published: 07 May 2021

Citation:

Miguel-Jiménez S, Pina-Beltrán B,
Gimeno-Martos S, Carvajal-Serna M,
Casao A and Pérez-Pe R (2021)
NADPH Oxidase 5 and Melatonin:
Involvement in Ram Sperm
Capacitation.
Front. Cell Dev. Biol. 9:655794.
doi: 10.3389/fcell.2021.655794

Reactive oxygen species (ROS) play an essential role in mammalian sperm capacitation. NADPH oxidase 5 (NOX5) has been described as the main source of ROS production in some mammalian spermatozoa, such as human and equine. On the other hand, melatonin can decrease cellular ROS levels and regulates NOX activity in somatic cells. Therefore, the objectives of this work were (1) to identify NOX5 in ram spermatozoa and analyze its possible changes during *in vitro* capacitation and (2) to investigate the effect of melatonin on NOX5 expression and localization and on superoxide levels in capacitated ram spermatozoa. Protein bands associated with NOX5 were detected by Western blot analysis. Likewise, indirect immunofluorescence (IIF) revealed six different immunotypes for NOX5, which varied throughout *in vitro* capacitation. Superoxide ($O_2^{\cdot-}$), evaluated by DHE/Yo-Pro-1, rose after *in vitro* capacitation and in the presence of the calcium ionophore A23187 but decreased in the presence of the NOX inhibitor GKT136901. GKT also reduced the percentage of capacitated and acrosome-reacted spermatozoa that had increased during incubation in capacitating conditions. The presence of melatonin at micromolar concentrations avoided the increment in $O_2^{\cdot-}$ and the changes in NOX5 immunotypes provoked by capacitation. In conclusion, NOX5 is present in ram spermatozoa and the changes in its distribution, associated with sperm capacitation, can be prevented by melatonin. To this extent, it could imply that melatonin exerts its antioxidant role, at least in part, by modulating NOX5 activity during ram sperm capacitation.

Keywords: ram spermatozoa, capacitation, NADPH oxidase, NOX5, melatonin, reactive oxygen species

INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), are involved in sperm functionality under physiological conditions. ROS are essential for processes like capacitation, hyperactivation, acrosome reaction, and sperm-oocyte fusion (Griveau and Le Lannou, 1994; de Lamirande and Gagnon, 1995; O'Flaherty, 2015), but an excess can be detrimental to the sperm function (reviewed by Dutta et al., 2019).

It is well known that sperm cells by themselves can generate the superoxide anion (Aitken and Clarkson, 1987; Alvarez et al., 1987) which spontaneously or enzymatically dismutates to hydrogen

peroxide (H_2O_2) (Halliwell and Gutteridge, 1989). The enzymes responsible for this superoxide production are the NADPH oxidases (NOX) (Bedard and Krause, 2007; Maghzal et al., 2012) and, more specifically, the NOX5 in mammal spermatozoa (Ghanbari et al., 2018). This isoform has some characteristics that differentiate it from other NOX family members (reviewed by Touyz et al., 2019). NOX5 does not need the NADPH oxidase subunit for its activation, but it is entirely calcium-dependent, thanks to the calcium-binding sites on its N-terminal. There is a high-level expression of NOX5 mRNA in the human testis (Banfi et al., 2001), and the presence of the enzyme has also been described in human (Musset et al., 2012), canine (Setyawan et al., 2016), and equine (Sabour and Ball, 2007) spermatozoa. The fact that the addition of a calcium ionophore (A23187) to spermatozoa induces ROS generation (Aitken et al., 1992; de Lamirande et al., 1998) suggests that NOX5 is the primary source of ROS in these cells (Banfi et al., 2001). However, there is no NOX5 gene or protein in murine spermatozoa, which indicates that, at least in this species, another source must be involved in the superoxide generation (Vernet et al., 2001), such as mitochondria (Koppers et al., 2008) or inflammatory leukocytes (Whittington et al., 1999).

An increase in the production of ROS [superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), nitric oxide (NO \cdot), and peroxynitrite (ONOO $^-$)] is one of the essential events that occur during sperm capacitation (de Lamirande and Gagnon, 1995; Herrero et al., 2003; O'Flaherty et al., 2004b). According to Ghanbari et al. (2018), the NOX5 enzyme must be involved in this process, due to its capacity to produce $O_2^{\cdot-}$. Other authors also assumed that the superoxide produced by NOX5, and the peroxides derived from it, activate the adenylyl cyclase, and thus the cAMP-PKA pathway (Zhang and Zheng, 1996; O'Flaherty, 2015; Moreno-Irusta et al., 2020), which finally leads to the phosphorylation of the tyrosine residues associated with sperm capacitation, as described in human and rat (Lewis and Aitken, 2001; O'Flaherty et al., 2004a). This process may also occur in ram spermatozoa. However, to the best of our knowledge, the NOX5 isoform has not been identified in ram spermatozoa.

Ovine reproduction has a marked seasonality, controlled by the secretion of melatonin from the pineal gland. This hormone directly affects the synthesis and secretion of the gonadotropic hormones via the hypothalamic-pituitary axis (Bittman et al., 1983). It is also synthesized by the reproductive tract (Gonzalez-Arto et al., 2016), and it is present in reproductive fluids, such as seminal plasma (Casao et al., 2010a) or follicular fluid (Brzezinski et al., 1987). Thus, as we have demonstrated over recent years, melatonin directly affects ram sperm functionality and modulates capacitation, decreasing apoptosis markers and oxidative stress (Casao et al., 2010b; Gimeno-Martos et al., 2019; Miguel-Jimenez et al., 2020). The well-known antioxidant capacity of melatonin may be the reason for its anti-apoptotic action since elevated ROS levels lead to early cell death (Rao and Gangadharan, 2008; Casao et al., 2010b; du Plessis et al., 2010; Jang et al., 2010; Espino et al., 2011; Gimeno-Martos et al., 2019; Miguel-Jimenez et al., 2020). Furthermore, a recent study in somatic cells (Patino et al., 2016) found an antioxidant melatonin effect throughout NOX regulation.

Considering NOX5 as the principal source of ROS in mammalian spermatozoa, the involvement of ROS in sperm capacitation and the effects of melatonin on regulating this process in ram, we set out to determine whether the effect of this hormone on ram sperm capacitation is mediated by the reduction of superoxide levels through NOX5 activity modulation. For this purpose, the objectives of this work were to detect the NOX5 isoform in ram spermatozoa (1), to determine superoxide and NOX5 involvement in ram sperm capacitation (2), and finally, to investigate how melatonin affects the expression and localization of NOX5 and superoxide levels in capacitated ram spermatozoa (3).

MATERIALS AND METHODS

Unless otherwise stated, all reagents were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Semen Collection and Processing

Semen was collected from nine *Rasa Aragonesa* rams (2–4 years old) with the aid of an artificial vagina. All the rams belonged to the Rasa Aragonesa National Breeding Association (Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino Selecto de Raza Rasa Aragonesa, ANGRA) and were kept at the Experimental Farm of the University of Zaragoza Veterinary School under the same nutritional conditions. All experimental procedures were performed under the project license PI39/17 approved by the University of Zaragoza Ethics Committee for Animal Experiments, following the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

After 2 days of abstinence, two successive ejaculates were collected, and second ejaculates were pooled and processed together to avoid individual differences (Ollero et al., 1996). The ejaculates were kept at 37°C until analysis.

In order to obtain a plasma-free sperm population, a dextran/swim-up procedure (García-López et al., 1996) was performed in a medium with the following composition: 200 mM sucrose, 50 mM NaCl, 2.7 mM $CaCl_2$, 18.6 mM sodium lactate, 21 mM HEPES, 10 mM KCl, 2.8 mM glucose, 0.4 mM $MgSO_4$, 0.3 mM sodium pyruvate, 0.3 mM K_2HPO_4 , 5 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 30 mg/mL dextran, 1.5 IU/mL penicillin, and 1.5 mg/mL streptomycin, pH 6.5.

Sperm concentration was calculated in duplicate using a Neubauer chamber (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany).

In vitro Capacitation

Swim-up-selected spermatozoa, in aliquots of 1.6×10^8 cells/mL, were incubated for 3 h at 39°C in a humidified incubator with 5% CO_2 in the air. Incubations were performed in a complete TALP medium (Parrish et al., 1988) containing 100 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 25 mM $NaHCO_3$, 0.3 mM NaH_2PO_4 , 21.6 mM Na lactate, 3 mM $CaCl_2$, 0.4 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 1 mM Na pyruvate, 5 mM glucose, and 5 mg/mL bovine serum albumin (BSA), with a pH of 7.3 (TALP samples). Several cAMP-elevating

agents, already proven for capacitating ram spermatozoa (Grasa et al., 2006; Colas et al., 2008) and composed of 1 mM dibutyl (db)-cAMP, 1 mM caffeine, 1 mM theophylline, 0.2 mM okadaic acid, and 2.5 mM methyl- β -cyclodextrin, were added to the TALP medium to induce *in vitro* capacitation (capacitated-control samples, Cap-C).

To further investigate the role of NOX5 during *in vitro* capacitation, the NOX inhibitor 2-(2-chlorophenyl)-4-methyl-5-(pyridin-2-ylmethyl)-1H-pyrazolo[4,3-c]pyridine-3,6(2H,5H)-dione (GKT136901, GKT) was added to the capacitation medium at final concentrations of 1 μ M (Musset et al., 2012; Altenhofer et al., 2015). Taking into account that the activation of NOX5 is calcium-dependent (Banfi et al., 2001), 1 μ M calcium ionophore A23187 was added to the sperm samples to evaluate the effect of NOX5 activation on changes related to capacitation.

Melatonin was solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) and phosphate-buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , and 1.76 KH_2PO_4 , pH 7.4) and added to the capacitation medium at a final concentration of 1 μ M. The final concentration of DMSO in all the melatonin samples was 0.1%. To account for the potential adverse effect of DMSO, the same concentration was included in capacitated-control samples to which no melatonin had been added.

Thus, the experimental groups in the present study were swim-up (spermatozoa selected by the dextran/swim-up method before inducing *in vitro* capacitation), TALP samples (spermatozoa incubated under capacitating conditions without cAMP-elevating agents), and capacitated-control (Cap-C, spermatozoa incubated under capacitating conditions in TALP medium with cAMP-elevating agents). Each compound (GKT136901, calcium ionophore A23187, melatonin or a combination of them) was added at 1 μ M concentration to samples incubated in TALP and high-cAMP medium samples.

Sperm Motility Evaluation

Total and progressive motility was evaluated using the motility module of OpenCASA, a free open-source software that we recently developed (Alquezar-Baeta et al., 2019). Two drops of 2 μ L of each sample, diluted to a final concentration of 3×10^7 cells/mL, were placed in a pre-warmed Makler counting chamber (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) and maintained at 37°C during all the analyses by a heated slide holder. Spermatozoa were recorded with a video camera (Basler acA1920; Basler Vision Components, Ahrensburg, Germany) mounted on a microscope (Nikon Eclipse 50i, Nikon Instruments Int, Tokyo, Japan) equipped with a 10 \times negative-phase contrast lens.

Recorded videos were evaluated with the following settings: 60 frames per second, 120 frames, 800×600 pixel image resolution, 10 μm^2 minimum cell size, 100 μm^2 maximum cell size, STR (straightness coefficient) > 80% and VAP (mean velocity) > 90%, 10 $\mu\text{m/s}$ minimum VCL (curvilinear velocity), 100 $\mu\text{m/s}$ VCL lower threshold, 200 m/s VCL upper threshold, 30 frames minimum track length, and 20 μm maximum displacement between frames.

Flow Cytometry Analysis

All the measurements were performed on a Beckman Coulter FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, United States) equipped with two excitation lasers (air-cooled Argon ion laser 488 nm and Red Solid state laser 633 nm); five absorbance filters (FL1-525, FL2-575, FL3-610, FL4-675, and FL5-755; ± 5 nm each band pass filter); and CXP software. A minimum of 20,000 events were evaluated in all the experiments. The sperm population was identified for further analysis on the basis of its specific forward (FS) and side-scatter (SS) properties; thus, other events were excluded. A flow rate stabilized at 200–300 cells/s was used.

Sperm Membrane Integrity

Sperm viability, considered as the integrity of the cell plasma membrane, was assessed by adding 3 μ L of 1 mM carboxyfluorescein diacetate (CFDA), 1.5 mM propidium iodide (PI), and 5 μ L of formaldehyde (0.5% (v/v) in water) to a final concentration of 5×10^6 cells/mL in a 300 μ L volume, based on a modification of the procedure described by Harrison and Vickers (1990). Samples were incubated at 37°C in darkness for 15 min. For the sperm viability analysis, the Argon laser and filters FL1-525 and FL4-675 nm were used to avoid overlapping. The monitored parameters were FS log, SS log, FL1 log (CFDA), and FL4 log (PI). The percentage of viable spermatozoa (PI-/CFDA+) was evaluated.

Superoxide Levels

To detect intracellular superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) levels in viable spermatozoa, cells (500 μ L at 5×10^6 cells/mL) were loaded with 4 μ M DHE and 40 nM Yo-Pro-1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) fluorochromes (Guthrie and Welch, 2006) and incubated at 37°C for 40 min in darkness. Hydroethidine is permeable to cells, and it is oxidized by $\text{O}_2^{\cdot-}$ to the red fluorescent compound ethidium (E), which was detected with the FL4-675-nm filter in the flow cytometer. Yo-Pro-1 labels cells with destabilized membrane (non-viable) with green fluorescence, detectable with the FL1-525-nm filter. Viable cells with intact membrane do not show fluorescence. Dot plots showed four different populations: viable cells with high $\text{O}_2^{\cdot-}$ production (Yo-Pro-1-/E+), viable cells with low $\text{O}_2^{\cdot-}$ production (Yo-Pro-1-/E-), non-viable cells with low $\text{O}_2^{\cdot-}$ production (Yo-Pro-1+/E-), and non-viable cells with high $\text{O}_2^{\cdot-}$ production (Yo-Pro-1+/E+). The percentage of viable spermatozoa with high superoxide levels (Yo-Pro-1-/E+) was evaluated.

Intracellular Calcium

To assess intracellular calcium levels, aliquots of 500 μ L (5×10^6 cells/mL) were incubated with 2 μ M Fluo-4-AM and 0.02% pluronic acid for 15 min at 37°C in darkness (both from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) and 1.5 mM PI. After this, a flow cytometer was used to evaluate the stained samples, as described previously, using the Argon laser and filters FL1-525 and FL4-675 nm. The monitored parameters were FS log, SS log, FL1 log (Fluo-4-AM), and FL4 log (PI).

The percentage of viable spermatozoa with high calcium levels (Fluo-4-AM+/PI-) was evaluated.

Determination of Capacitation Status

The sperm capacitation state was evaluated using the chlortetracycline (CTC) assay (Ward and Storey, 1984) that we previously validated for the evaluation of capacitation and acrosome reaction-like changes in ram spermatozoa (Grasa et al., 2006). A CTC solution (750 μ M; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, United States) was prepared daily in a buffer containing 20 mM Tris, 130 mM NaCl, and 5 μ M cysteine, pH 7.8, and passed through a 0.22- μ m filter. After that, 20 μ L of CTC solution was added to 18 μ L of each sperm sample, fixed with 5 μ L of 1.25% (w/v) paraformaldehyde in 0.5 M Tris-HCl (pH 7.8) and incubated at 4°C in the dark for 30 min. Six microliters of the stained sample was placed onto a glass slide and mixed with 2 μ L of 0.22 M 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) in glycerol:PBS (9:1 v/v). The samples were covered with 24 \times 60 mm coverslips, sealed with transparent enamel, and stored in the dark at -20°C until evaluation. The samples were examined using a Nikon Eclipse E-400 microscope (Nikon Corporation, Kanagawa, Japan) under epifluorescence illumination with a V-2A filter, and at least 200 spermatozoa were scored per sample. Three sperm patterns were identified (Gillan et al., 1997): non-capacitated (even distribution of fluorescence on the head, with or without a bright equatorial band), capacitated (with fluorescence in the acrosome), and acrosome-reacted cells (showing no fluorescence on the head, with or without a bright equatorial band).

Indirect Immunofluorescence

NOX5 localization was revealed by indirect immunofluorescence analyses (IIF). Sperm samples were diluted (2×10^6 cells/mL) in PBS and fixed in 0.5% (v/v) formaldehyde at room temperature for 20 min. Then, cells were centrifugated at $900 \times g$, and the pellet was resuspended in 500 μ L PBS. Forty microliters of cell suspension was placed onto Superfrost slides (Superfrost Plus; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) and permeabilized with 0.5% (v/v) Triton X-100 in PBS for 15 min. Afterward, the cells were fixed again with paraformaldehyde 1.25% (w/v) in Tris-HCl 0.5 M for 5 min and washed three times with PBS. Non-specific binding sites were blocked with 5% (w/v) BSA in PBS for 5 h in a wet chamber. Slides were rewashed in PBS and incubated at 4°C overnight in a wet chamber with the primary antibody anti-NOX5 (Abcam, Cambridge, UK Cat# ab191010) 1/25 in PBS with 1% (v/v) BSA. The next morning, the samples were washed three times with PBS and incubated with the secondary antibody (Alexa Fluor 488 chicken anti-rabbit; Thermo Fisher Scientific; Cat#A-21441, RRID:AB_2535859), diluted 1/600 (v/v) in PBS with 1% (v/v) BSA for 90 min at room temperature in a wet chamber. Slides were then washed three times with PBS before the addition of 6 μ L of 0.22 M 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) in glycerol:PBS (9:1 v/v) to enhance and preserve cell fluorescence. The slides were covered with a coverslip and sealed with transparent enamel. Cells were visualized with a Nikon Eclipse E400 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) under epifluorescence illumination using a B-2A filter

($\times 1,000$). All samples were processed in duplicate, and at least 150 spermatozoa were scored per slide.

The specificity of the anti-NOX5 antibody was tested by the peptide blocking method. The antibody was neutralized with the immunizing blocking peptide (ProteoGenix, Schiltigheim, France) at a final concentration of 2.5 μ g/mL in PBS with 1% BSA for 2 h at room temperature. The neutralized antibody was then used side by side with the antibody alone in two identical slides, and the results were comparatively analyzed. No signal was detected when using the neutralized antibody, which means that the antibody has high affinity for the NOX5 protein.

Western Blotting

For NOX5 detection, sperm proteins were extracted from spermatozoa, as previously described by Colas et al. (2008). Aliquots of 3.2×10^7 cells were centrifuged at $900 \times g$ for 5 min. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 200 μ L of extraction sample buffer [ESB; 68.6mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS (w/v)] with a 10% protease inhibitor cocktail. After incubation at 100°C in a sand bath for 5 min, the samples were centrifuged again at $7,500 \times g$ for 5 min at 4°C. The supernatant was recovered, and β -mercaptoethanol, glycerol, and bromophenol blue (in 10% glycerol) were added to final concentrations of 5, 1, and 0.002% (v/v), respectively. Lysates were stored at -20°C.

Sperm extracted proteins (50 μ L, 1–2 mg/mL) were separated in one dimension by 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) and transferred onto a PVDF membrane using a transfer unit (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad, Hercules, CA, United States). Non-specific sites on the PVDF membrane were blocked with 5% BSA (w/v) in PBS for 4 h. The proteins were immunodetected by incubating overnight at 4°C with a rabbit primary anti-NOX5 (Abcam, Cambridge, UK Cat# ab191010) diluted 1/400 in 0.1% (v/v) Tween-20 in PBS containing 1% (w/v) BSA. A mouse anti-tubulin antibody (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-8035, RRID:AB_628408) was used as a loading control (dilution 1/1,000). We used the commercial HeLa cell lysate (Abcam, Cambridge, United Kingdom), recommended explicitly by the antibody manufacturer, as a positive control. After extensive washing with 0.1% (v/v) Tween-20 PBS, membranes were incubated for 75 min at room temperature with the secondary antibodies donkey anti-rabbit (IRDye 680RD Donkey anti-Rabbit IgG antibody, LI-COR Biosciences Cat# 926-68073, RRID:AB_10954442) and donkey anti-mouse (RDye 800CW Donkey anti-Mouse IgG antibody, LI-COR Biosciences Cat# 926-32212, RRID:AB_621847) diluted 1/15,000 in 0.1% (v/v) Tween-20 PBS containing 1% (v/v) BSA. After extensive washing, the membranes were scanned using the Odyssey CLx Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, United States).

The specificity of the anti-NOX5 antibody was tested by the peptide blocking method, as in the IIF assay. The neutralized antibody was used side by side with the antibody alone in two identical western blot membranes, and the results were comparatively analyzed. No signal was detected when using the neutralized antibody, which means that the antibody has high affinity for the NOX5 protein.

Western blot images were quantified using Odyssey Clx Infrared Imaging System software (Li-COR Biosciences, Lincoln, NE, United States) to determine the NOX5 protein bands' relative intensity, normalized to the tubulin control.

Statistical Analysis

Differences between the groups in motility, superoxide levels, viability, CTC staining, and NOX5 immunotypes were analyzed by means of the chi-square test. Differences in NOX5 expression profiles evaluated by western blot were analyzed by ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test after evaluation of the data distribution by the Kolmogorov–Smirnov test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 (v. 5.03; GraphPad Software, La Jolla, CA, United States).

RESULTS

All data obtained from the sperm samples capacitated without cAMP-elevating agents (TALP samples) are shown in the **Supplementary Material**, as this treatment had scarce effects on spermatozoa. The most evident changes were obtained after capacitating with cAMP-elevating agents, so that we focused on them.

NOX5 Immunodetection and Immunolocalization in Ram Spermatozoa

Western blot analysis identified protein bands with a molecular weight compatible with NOX5 (~85 kDa) in swim-up, TALP samples, and capacitated control (Cap-C) samples (**Figure 1**). The molecular weights of these bands matched those found in the positive control. Besides, bands at 45 kDa and 30 kDa were detected.

Immunofluorescence analysis revealed the presence of the NOX5 enzyme in ram spermatozoa, and six different immunotypes were distinguished (**Figure 2**): immunotype 1, with labeling only at the midpiece; immunotype 2, with labeled acrosomal region; immunotype 3, labeling the apical edge; immunotype 4, labeling the apical edge and postacrosomal region; immunotype 5, labeling acrosomal and postacrosomal regions; and immunotype 6, with postacrosomal labeling. Also, all the immunotypes presented fluorescence at the midpiece.

Influence of NOX5 in Ram Sperm Capacitation

After demonstrating the presence of NOX5 in ram spermatozoa, we wanted to evaluate how the inhibition (by addition of GKT136901) or activation of NOX5 (by the increase in intracellular calcium provoked by the addition of calcium ionophore A23187) influenced some events related with sperm capacitation, such as changes in motility, CTC staining patterns, and superoxide levels. However, first, we verified that the addition of the ionophore was indeed capable of causing the calcium to enter inside the cell (**Supplementary Figure 1**).

Influence of NOX5 on Superoxide Intracellular Levels During Incubation in Capacitating Conditions

Superoxide intracellular levels ($O_2^{\cdot-}$), were assessed by flow cytometry, and the results are shown in **Figure 3**. *In vitro* capacitation with cAMP-elevating agents provoked an increase in the percentage of live spermatozoa with high $O_2^{\cdot-}$ levels (Yo-Pro-1-/E+), and the incubation with the NOX5 inhibitor partially limited this increase ($p < 0.05$). Meanwhile, the activation of NOX5 by the calcium ionophore trebled the Yo-Pro-1-/E + population ($p < 0.0001$). When the calcium ionophore was added in the presence of the GKT, there was still an increase of $O_2^{\cdot-}$ ($p < 0.0001$), but to a much lesser extent ($24.53\% \pm 3.35\%$) than when the ionophore alone was added ($45.83\% \pm 5.83\%$) (**Figure 3**).

Influence of NOX5 on Capacitation Status During Incubation in Capacitating Conditions

According to the chlortetracycline analysis (CTC), the percentage of capacitated spermatozoa significantly increased after a 3 h incubation under capacitating conditions (Cap-C, $57.71\% \pm 3.22\%$) compared to the swim-up samples ($22.66\% \pm 1.5\%$, $p < 0.05$), as shown in **Figure 4**. The NOX5 inhibitor partially prevented sperm capacitation ($52.85\% \pm 3.68\%$, $p < 0.05$). On the other hand, the addition of the calcium ionophore caused a significant percentage of acrosome-reacted spermatozoa ($p < 0.0001$). When GKT was added together with the calcium ionophore, there was a significant reduction in the percentage of acrosome-reacted spermatozoa compared with the same samples in the presence of the ionophore alone ($10.50\% \pm 2.50\%$ vs. $31.50\% \pm 3.80\%$, $p < 0.0001$).

Influence of NOX5 on Sperm Motility During Incubation in Capacitating Conditions

Total and progressive motility significantly decreased after *in vitro* capacitation with cAMP-elevating agents (**Figure 5**). No significant effects on total motility were found in the presence of GKT, but the NOX5 inhibitor was able to increase progressive motility ($15.63\% \pm 4.45\%$ vs. $22.18\% \pm 3.77\%$, $p < 0.001$). However, the addition of the calcium ionophore dramatically compromised total motility ($p < 0.0001$) and the spermatozoa were not able to move progressively at all. The presence of GKT was not able to revert this effect. Viability evaluation revealed that sperm membrane integrity was not compromised in any of the experimental conditions (**Supplementary Figure 2**).

Influence of Melatonin on the NOX5 Action on ram Spermatozoa

Once the existence and localization of the NADPH oxidase 5 in ram spermatozoa and its effects on sperm capacitation and functionality were confirmed, we continued further to elucidate whether the action of melatonin on ram sperm capacitation is mediated by its interaction with NOX5. Previously, we checked the effectiveness of the incubation in capacitating conditions and the already described decapacitating action of melatonin at $1 \mu\text{M}$ concentration on ram spermatozoa (Casao et al., 2010b) by CTC analysis. Melatonin was able to reduce the percentage

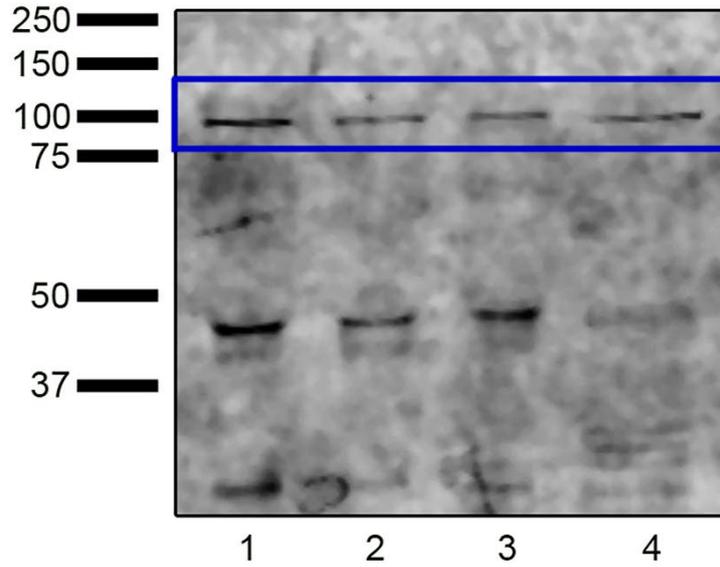


FIGURE 1 | Western blot analysis revealing the presence of NADPH oxidase 5 in ram sperm protein extracts from swim-up selected samples (lane 1) and samples incubated in capacitating conditions without (TALP, lane 2) or with cAMP elevating agents (Cap-C, lane 3). Positive control (lane 4): HeLa cell lysate.

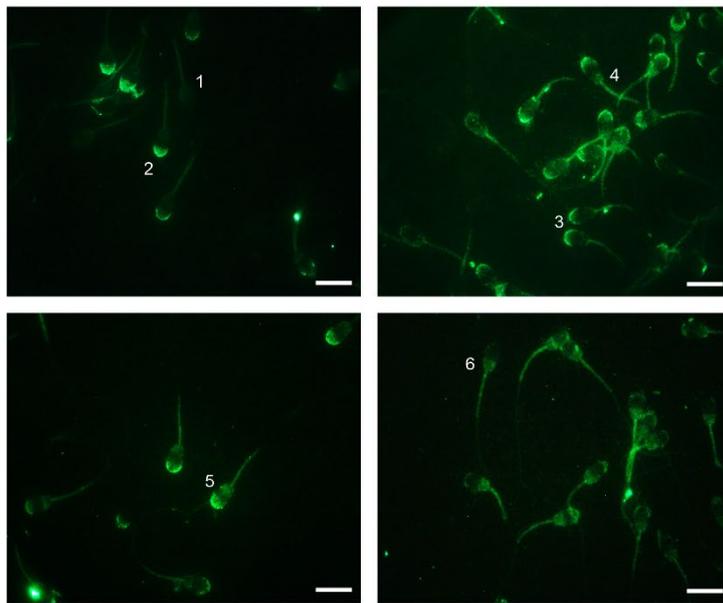
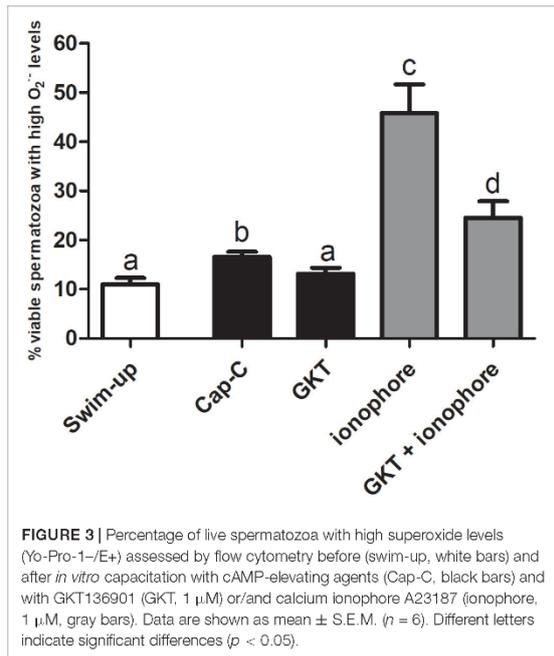


FIGURE 2 | Indirect immunofluorescence (IF) localization of NOX5 evaluated by fluorescence microscopy in ram spermatozoa. Six immunotypes can be seen: labeling in midpiece (1); in the acrosomal region (2); in the apical edge (3); in the apical edge + postacrosomal region (4); in the acrosomal and postacrosomal regions (5); and in the postacrosomal region (6). All of them present midpiece labeling. Original magnification $\times 1,000$. Scale bars = 10 μm .



of capacitated spermatozoa in Cap-C samples ($44.87\% \pm 4.58\%$ vs. $59.13\% \pm 4.16\%$, $p < 0.001$, **Figure 6**) in a similar extent to the NOX5 inhibitor (GKT, $50\% \pm 2.74\%$). Moreover, the incubation with melatonin ameliorated the ionophore effects, presenting a lower percentage of capacitated and acrosome-reacted spermatozoa, and more non-capacitated ($p < 0.01$) than in the ionophore samples.

Effect of Melatonin on Superoxide Levels

Regarding the production of the superoxides, melatonin prevented the superoxide production in live spermatozoa to a significant degree when compared to Cap-C samples ($p < 0.01$, **Figure 7**), even maintaining the same levels as before the capacitation induction (swim-up samples). The addition of calcium ionophore to the melatonin-preincubated sample did not reach the same superoxide levels as when added alone. Thus, melatonin prevented the superoxide production at the same level as the NOX5 inhibitor GKT136901 did.

Effect of Melatonin on NOX5 Levels and Immunolocalization in Capacitated Samples

In order to better understand the results, and since the postacrosomal labeling was sometimes diffuse, we grouped those immunotypes that labeled the acrosomal region (immunotypes 2 and 5) and the apical edge (immunotypes 3 and 4) regardless of the postacrosomal staining (**Figure 8**). Before capacitation, in the swim-up selected samples, the primary localization for NOX5 was in the acrosomal region ($40.85\% \pm 6.549417\%$ immunotypes 2 + 5) and the apical edge ($47.9\% \pm 4.47\%$ immunotypes 3 + 4). The induction of *in vitro* capacitation with

cAMP-elevating agents (Cap-C samples) produced a different redistribution of NOX5 ($p < 0.05$), with a lesser proportion of acrosomal immunotypes (2 + 5) and a higher percentage of immunotype 6 (postacrosomal region).

The addition of 1 μ M melatonin resulted in the spermatozoa showing different labeling patterns. Thus, melatonin partially prevented the rise in the percentage of immunotype 6 that *in vitro* capacitation caused ($p < 0.05$) and led to an inversion in the proportion of acrosomal ($47.41\% \pm 5.68\%$) and apical ($37.74\% \pm 3.97\%$) immunotypes, compared to the Cap-C samples ($32.140\% \pm 5.80\%$ and $49.48\% \pm 4.63\%$ respectively).

The incubation with GKT during sperm capacitation or the final addition of calcium ionophore to the samples did not provoke significant changes in the percentage of acrosomal and apical immunotypes comparing to the Cap-C samples. However, there was a higher proportion of midpiece labeling in all the samples incubated with ionophore ($p < 0.05$), and the combination of melatonin and GKT with calcium ionophore did not show significant differences compared to the ionophore samples.

Western blot assays were performed to investigate whether the melatonin effects on ram sperm-capacitated samples were mediated by changes in the NOX5 levels (**Figure 9**). The quantification of NOX5 bands by densitometry, after their normalization with the α -tubulin loading control (~ 50 kDa), revealed no significant differences between the samples.

DISCUSSION

The discovery of NADPH oxidases clarified the source of ROS production in several cell types (Panday et al., 2015). In spermatozoa, the superoxide production was attributed, until several years ago, solely to leukocytes present in semen samples and related to pathological processes (Plante et al., 1994; Whittington et al., 1999). Nowadays, it is commonly assumed that the generation of ROS in spermatozoa would be mediated by autonomous NADPH oxidase activity and that certain levels of ROS would be necessary for some physiological events (reviewed in Bedard and Krause, 2007). NOX5 was discovered in 2001 in human testis, uterus, spleen, and lymph node (Banfi et al., 2001; Cheng et al., 2001). Some years later, it was found in equine (Sabeur and Ball, 2007), human (Musset et al., 2012; Ghani et al., 2013) and canine spermatozoa (Setyawan et al., 2016).

In the present study, we have demonstrated, for the first time, the presence of the NOX5 isoform in ram spermatozoa by Western blot and by indirect immunofluorescence. The 85-kDa protein band detected on the immunoblot matched with the protein detected in equine spermatozoa (Sabeur and Ball, 2007) and similarly with the 75 kDa protein in human spermatozoa (Musset et al., 2012). Likewise, the lower molecular weight protein bands also detected in ram sperm had previously been observed in equine spermatozoa, and the authors noted that they could correspond to proteolytic processes (Sabeur and Ball, 2007).

According to NOX5 localization in ram spermatozoa, we have described six different immunotypes, in contrast with

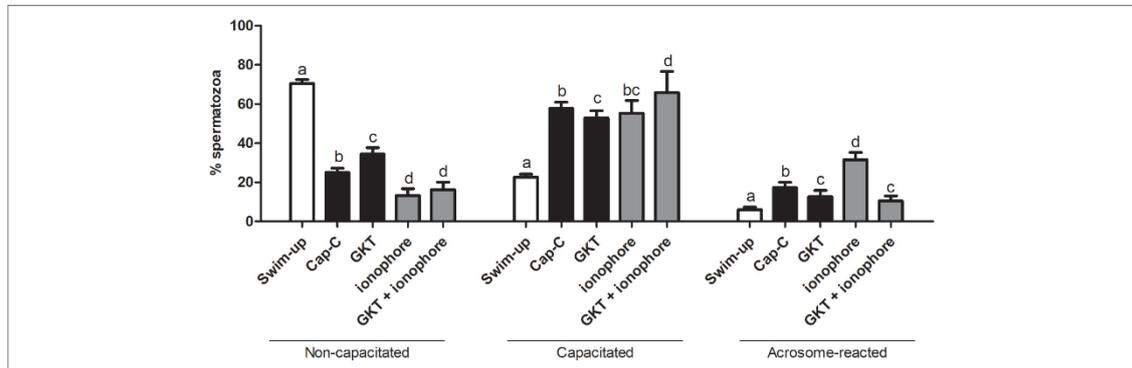


FIGURE 4 | Assessment of capacitation status, evaluated by chlortetracycline (CTC), in ram spermatozoa before (swim-up, white bars) and after *in vitro* capacitation with cAMP-elevating agents (Cap-C, black bars) and with GKT136901 (GKT, 1 μ M) or/and calcium ionophore A23187 (ionophore, 1 μ M, gray bars). Data of non-capacitated, capacitated, and acrosome-reacted spermatozoa are mean percentages \pm SEM ($n = 6$). Different letters within the same group indicate significant differences ($p < 0.05$).

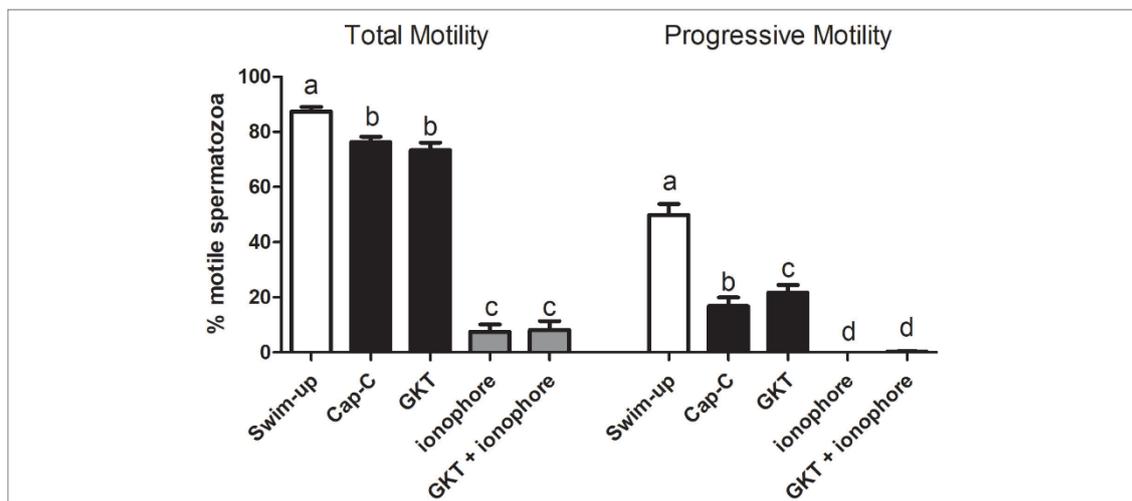


FIGURE 5 | Percentage of total motile (left) and progressive (right) spermatozoa before (swim-up, white bars) and after *in vitro* capacitation with cAMP-elevating agents (Cap-C, black bars) and with GKT136901 (GKT, 1 μ M) or/and calcium ionophore A23187 (ionophore, 1 μ M, gray bars). Data are shown as mean \pm SEM ($n = 6$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

the one or two immunotypes found in human (Musset et al., 2012) and equine (Sabeur and Ball, 2007) spermatozoa, respectively. Thus, NOX5 localization in spermatozoa seems to vary depending on the species. A significant finding of the present work is the evidence, for the first time, that incubation in capacitating conditions triggered a redistribution of NOX5 in ram spermatozoa. These findings suggest that the NOX5 could be involved in ram sperm capacitation, probably by regulating ROS production.

NOX5 product (superoxide anion) increased its levels in samples incubated under capacitating conditions, as reported in human, equine, and boar spermatozoa (de Lamirande and

Gagnon, 1995; O’Flaherty et al., 2005; Burnaugh et al., 2007). Activation of NOX5, by the addition of ionophore A23187, dramatically increased superoxide levels in ram spermatozoa, as previously reported in human and equine (Griveau and Le Lannou, 1994; Aitken et al., 1997; Ball et al., 2001; Burnaugh et al., 2007). Inhibition of NOX5 by the addition of the NOX inhibitor (GKT136901) reduced the superoxide generation in samples incubated in capacitating conditions in the presence of cAMP-elevating agents.

We have also demonstrated that NOX5 is involved in ram sperm capacitation, since its inhibition by GKT136901 reduced the percentage of capacitated and acrosome-reacted spermatozoa

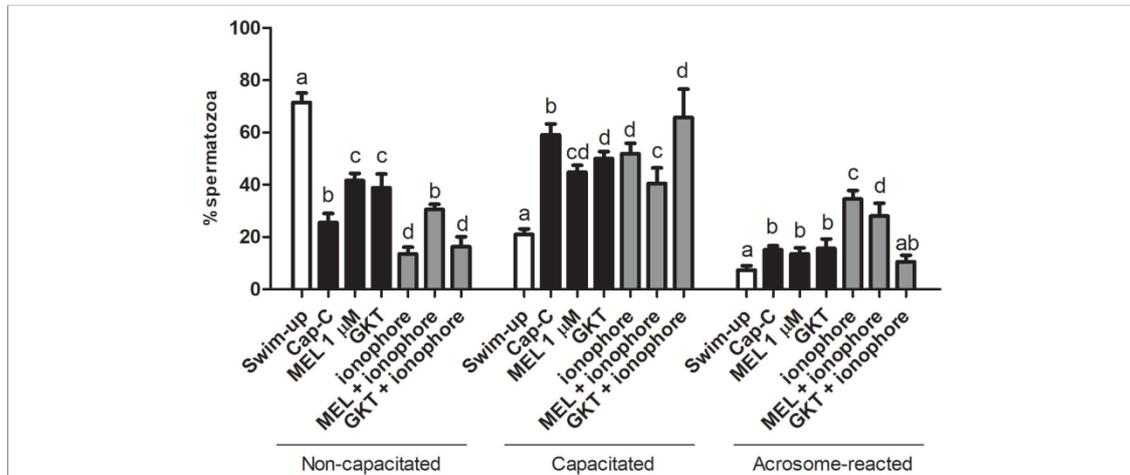


FIGURE 6 | Assessment of capacitation status, evaluated by CTC, in ram spermatozoa before (swim-up, white bars) and after *in vitro* capacitation with cAMP-elevating agents (Cap-C, black bars) and with melatonin (MEL, 1 μM), GKT163901 (GKT, 1 μM), calcium ionophore A23187 (ionophore, 1 μM, gray bars), and a combination of MEL or GKT with ionophore. Data of non-capacitated, capacitated, and acrosome-reacted spermatozoa are mean percentages ± SEM (n = 6). Different letters within the same group indicate significant differences (p < 0.05).

that had increased during incubation in capacitating conditions. NOX5 activation by ionophore led to a high increment in acrosome-reacted sperm that could be prevented in part by the addition of GKT136901. It is well known that A23187 induces the acrosome reaction in the sperm of many species

(Yanagimachi, 1975) and can also immobilize them (Hong et al., 1985; Visconti et al., 1999). In the present study, we observed the same ionophore side effect on motility; however, it did not affect viability, in concordance with the findings of other authors (Suarez et al., 1987). In contrast with different results showing a reduction of sperm motility and viability as a consequence of the inhibition of the NOX5 activity (Ghanbari et al., 2018), we observed an increase in the progressive motility in high cAMP-capacitated samples.

Although other NOX isoforms have been described in spermatozoa from other species (Sabeur and Ball, 2007; Musset et al., 2012; Ghani et al., 2013; Setyawan et al., 2016), on the basis of the results derived from the use of the NOX inhibitor (GKT136901) and the calcium induction, we could postulate that NOX5 is an important source of ROS in ram spermatozoa. This isoform is the only one that has calcium-binding sites, and calcium is crucial for NOX5 activation (reviewed by Touyz et al., 2019). Consequently, the superoxide levels reached after calcium-ionophore addition supported the view that NOX5 is a ROS source in ram spermatozoa. Other authors concluded the same for spermatozoa from other species and affirmed that NOX5 regulates numerous redox-dependent processes in spermatozoa under physiological conditions (Musset et al., 2012; Ghanbari et al., 2018).

Melatonin plays an important role in sperm functionality (Jang et al., 2010; Ortiz et al., 2011), and its antioxidant capacity has been reported in spermatozoa from different species (Succu et al., 2011; Karimfar et al., 2015; Pang et al., 2016; Appiah et al., 2019). It has been demonstrated that, in ram spermatozoa, melatonin is involved in the capacitation process and prevents apoptosis and oxidative stress (Casao et al., 2010b; Gonzalez-Arto et al., 2016; Gimeno-Martos et al., 2019; Pool et al., 2021).

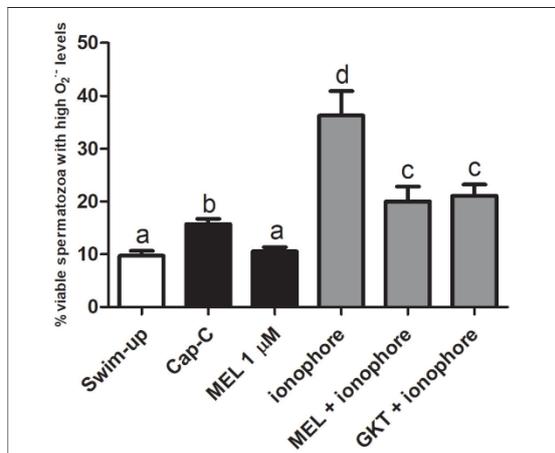


FIGURE 7 | Percentage of live sperm with high superoxide levels (Yo-Pro-1-/E+) assessed by flow cytometry before (swim-up, white bars) and after *in vitro* capacitation with cAMP-elevating agents (Cap-C, black bars) and with melatonin (MEL) 1 μM or/and calcium ionophore A23187 (ionophore, gray bars), plus a GKT136901 with ionophore sample (GKT + ionophore). Data are shown as mean ± SEM (n = 6). Different letters indicate significant differences (p < 0.05).

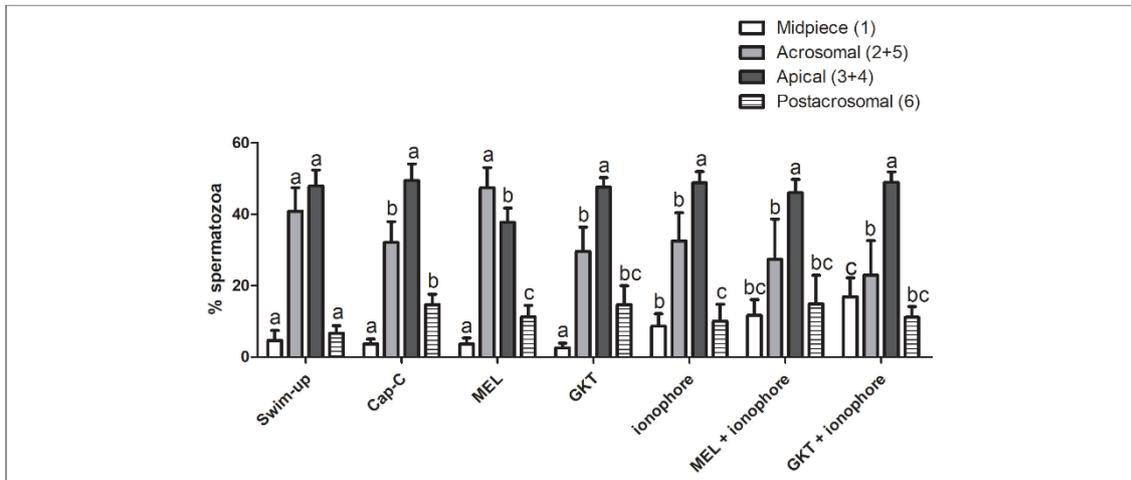


FIGURE 8 | Percentages of the immunotypes for NOX5 in swim-up selected and *in vitro* capacitated ram spermatozoa with cAMP-elevating agents (Cap-C), and with melatonin (MEL) 1 μ M, GKT163901 (GKT, 1 μ M), calcium ionophore A23187 (ionophore, 1 μ M), and a combination of MEL or GKT with ionophore. Immunotypes are represented as follows: (1) plain white bars (2 + 5) plain gray bars (3 + 4) plain black bars, and (6) horizontal striped bars. Results are shown as mean \pm SEM ($n = 6$ for swim-up, Cap-C and Mel; $n = 3$ for GKT, ionophore, MEL + ionophore, GKT + ionophore). Different letters indicate statistical differences between treatments ($p < 0.05$).

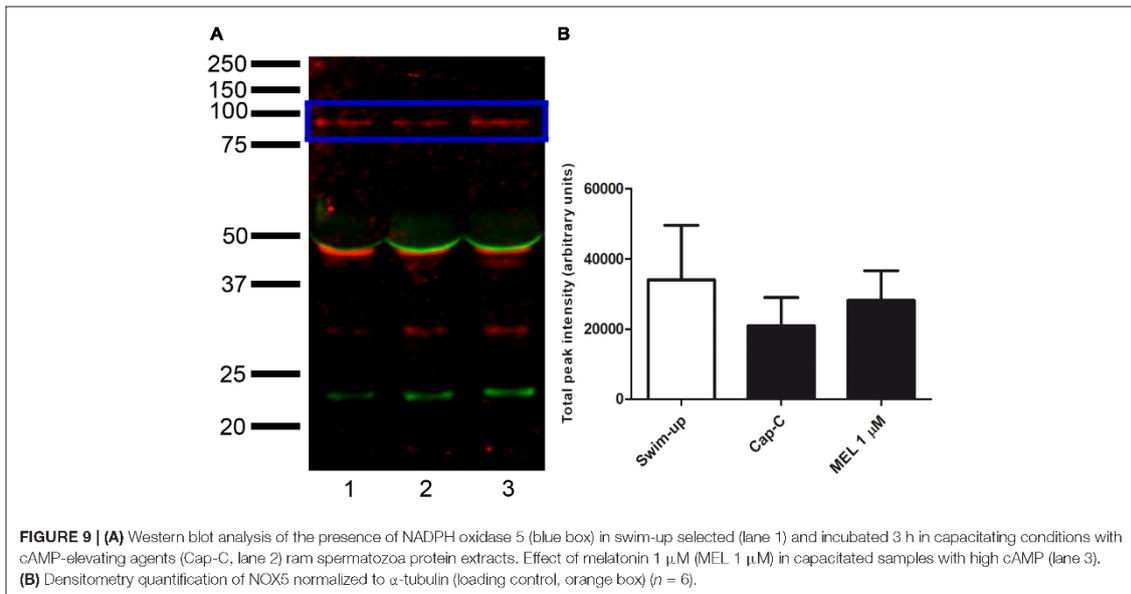


FIGURE 9 | (A) Western blot analysis of the presence of NADPH oxidase 5 (blue box) in swim-up selected (lane 1) and incubated 3 h in capacitating conditions with cAMP-elevating agents (Cap-C, lane 2) ram spermatozoa protein extracts. Effect of melatonin 1 μ M (MEL 1 μ M) in capacitated samples with high cAMP (lane 3). **(B)** Densitometry quantification of NOX5 normalized to α -tubulin (loading control, orange box) ($n = 6$).

In previous works, we showed the capacity of melatonin to prevent ram sperm capacitation at micromolar concentrations (Casao et al., 2010b), in concordance with the present results. This effect appears to be due, at least in part, to its antioxidant capacity, since a melatonin-mediated decrease in general ROS levels in ram (Gimeno-Martos et al., 2019), rabbit (Zhu et al., 2019), bull (Ashrafi et al., 2013), or mouse (Chen et al., 2016)

has been described. In contrast, du Plessis et al. (2010) reported no melatonin effect on ROS levels in human spermatozoa, neither did Pool et al. (2021) in frozen-thawed ram spermatozoa, but interestingly, they concluded that melatonin is specifically able to reduce mitochondrial superoxide production. In this work, we have shown that the addition of 1 μ M melatonin to the ram sperm samples specifically prevented the increase

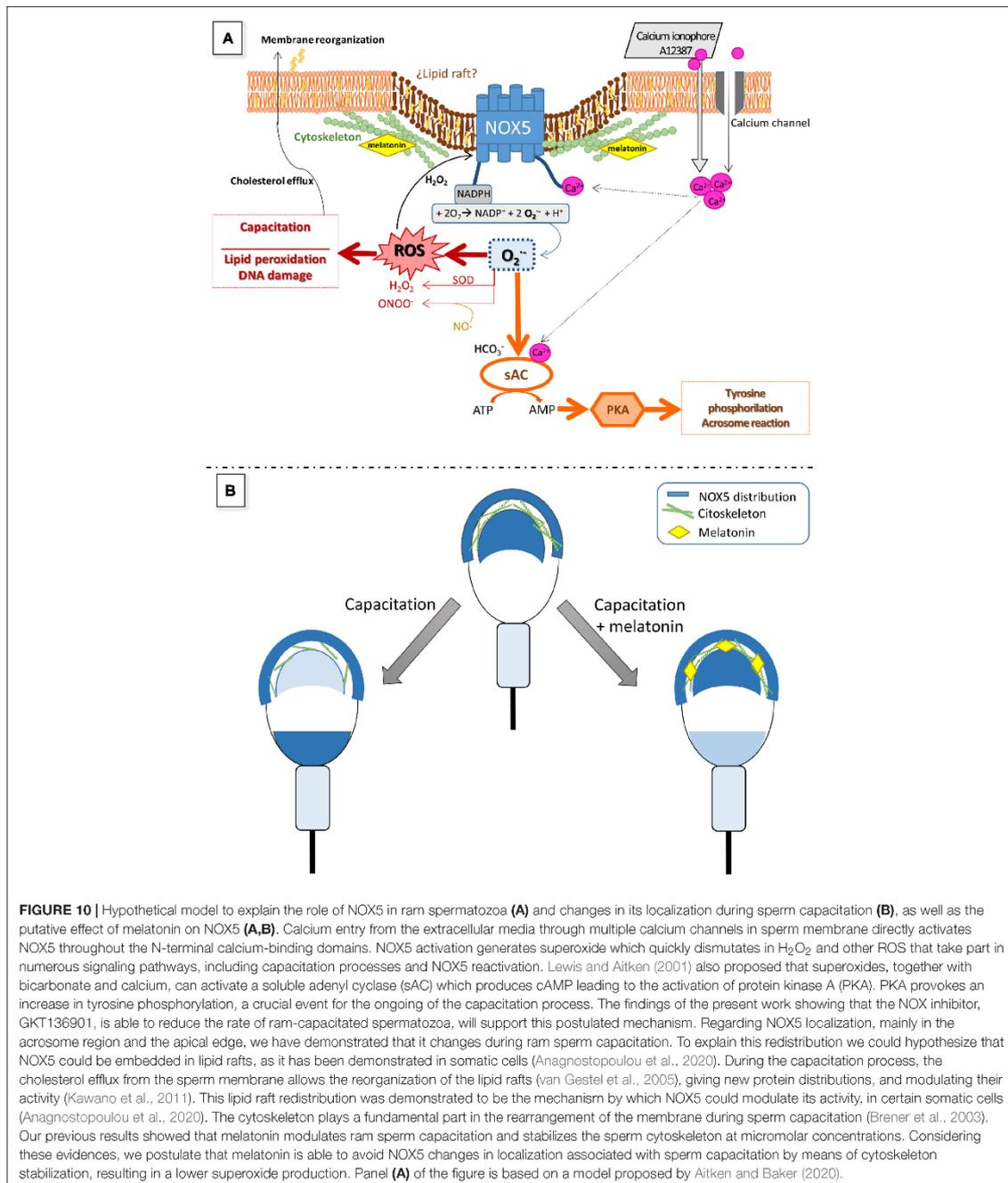


FIGURE 10 | Hypothetical model to explain the role of NOX5 in ram spermatozoa (A) and changes in its localization during sperm capacitation (B), as well as the putative effect of melatonin on NOX5 (A,B). Calcium entry from the extracellular media through multiple calcium channels in sperm membrane directly activates NOX5 throughout the N-terminal calcium-binding domains. NOX5 activation generates superoxide which quickly dismutates in H₂O₂ and other ROS that take part in numerous signaling pathways, including capacitation processes and NOX5 reactivation. Lewis and Aitken (2001) also proposed that superoxides, together with bicarbonate and calcium, can activate a soluble adenylyl cyclase (sAC) which produces cAMP leading to the activation of protein kinase A (PKA). PKA provokes an increase in tyrosine phosphorylation, a crucial event for the ongoing of the capacitation process. The findings of the present work showing that the NOX inhibitor, GKT136901, is able to reduce the rate of ram-capacitated spermatozoa, will support this postulated mechanism. Regarding NOX5 localization, mainly in the acrosome region and the apical edge, we have demonstrated that it changes during ram sperm capacitation. To explain this redistribution we could hypothesize that NOX5 could be embedded in lipid rafts, as it has been demonstrated in somatic cells (Anagnostopoulou et al., 2020). During the capacitation process, the cholesterol efflux from the sperm membrane allows the reorganization of the lipid rafts (van Gestel et al., 2005), giving new protein distributions, and modulating their activity (Kawano et al., 2011). This lipid raft redistribution was demonstrated to be the mechanism by which NOX5 could modulate its activity, in certain somatic cells (Anagnostopoulou et al., 2020). The cytoskeleton plays a fundamental part in the rearrangement of the membrane during sperm capacitation (Bréner et al., 2003). Our previous results showed that melatonin modulates ram sperm capacitation and stabilizes the sperm cytoskeleton at micromolar concentrations. Considering these evidences, we postulate that melatonin is able to avoid NOX5 changes in localization associated with sperm capacitation by means of cytoskeleton stabilization, resulting in a lower superoxide production. Panel (A) of the figure is based on a model proposed by Aitken and Baker (2020).

in superoxide levels provoked by *in vitro* capacitation. This evidence points to a possible action of melatonin through the NOX5 enzyme, an important source of superoxide in

spermatozoa. Furthermore, the incubation with melatonin prior to the addition of calcium ionophore limited the superoxide production that the ionophore triggered alone, as did the NOX

inhibitor (GKT136901). Moreover, we have shown here that melatonin was able to modify the NOX5 distribution in ram spermatozoa, preventing the changes in localization provoked by *in vitro* capacitation. It is worth mentioning that we have recently reported the effect of melatonin on cytoskeletal remodeling during *in vitro* ram sperm capacitation, concluding that 1 μ M melatonin prevents such changes, according to the actin and α -tubulin distribution (Carvajal-Serna et al., 2020). The melatonin action on the cytoskeleton has been also reported in somatic cells (Benítez-King, 2006). Thus, we could postulate that melatonin could affect NOX5 distribution and modulate its capacity to produce superoxides through this stabilizing action on the cytoskeleton, as we proposed in the hypothetical model shown in Figure 10. On the contrary, the incubation with the NOX inhibitor or the calcium ionophore addition did not alter the NOX5 distribution during sperm capacitation, probably because these compounds have a direct modulating action on the enzyme and they could not modify its distribution by themselves. The addition of ionophore after incubation with melatonin avoided its stabilizing effect on cytoskeleton, probably as a consequence of the high increment in intracellular calcium. The fact that NOX5 levels, analyzed by Western blot and quantified by densitometry, did not significantly change after incubation in capacitating conditions, with or without melatonin, may support the previous hypothesis that NOX5 could regulate its action depending on its cell location.

The results from this work have evidenced, for the first time, the presence of NADPH oxidase 5 in ram spermatozoa and the existence of six different immunotypes depending on its location. NOX5 is active and involved in ram sperm capacitation. Finally, melatonin modified the NOX5 location and prevented the oxidative stress deriving from the capacitation process. The findings of this study can be understood as a new insight into the action of melatonin on ram sperm capacitation through NOX5 modulation.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study can be found in the figshare repository doi: 10.6084/m9.figshare.13603226,

REFERENCES

- Aitken, R. J., and Baker, M. A. (2020). The Role of genetics and oxidative stress in the etiology of male infertility—a unifying hypothesis? *Front. Endocrinol.* 11:581838. doi: 10.3389/fendo.2020.581838
- Aitken, R. J., and Clarkson, J. S. (1987). Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 81, 459–469. doi: 10.1530/jrf.0.0810459
- Aitken, R. J., Buckingham, D. W., and West, K. M. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J. Cell Physiol.* 151, 466–477. doi: 10.1002/jcp.1041510305
- Aitken, R. J., Fisher, H. M., Fulton, N., Gomez, E., Knox, W., Lewis, B., et al. (1997). Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene
- iodonium and quinacrine. *Mol. Reprod. Dev.* 47, 468–482. doi: 10.1002/(sici)1098-2795(199708)47:4<468::aid-mrd14>3.0.co;2-s
- Alquizar-Baeta, C., Gimeno-Martos, S., Miguel-Jimenez, S., Santolaria, P., Yaniz, J., Palacin, I., et al. (2019). OpenCASA: a new open-source and scalable tool for sperm quality analysis. *PLoS Comput. Biol.* 15:e1006691. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006691
- Altenhofer, S., Radermacher, K. A., Kleikers, P. W., Winkler, K., and Schmidt, H. H. (2015). Evolution of NADPH oxidase inhibitors: selectivity and mechanisms for target engagement. *Antioxid. Redox Signal.* 23, 406–427. doi: 10.1089/ars.2013.5814
- Alvarez, J. G., Touchstone, J. C., Blasco, L., and Storey, B. T. (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.* 8, 338–348. doi: 10.1002/j.1939-4640.1987.tb00973.x
- Anagnostopoulou, A., Camargo, L. L., Rodrigues, D., Montezano, A. C., and Touyz, R. M. (2020). Importance of cholesterol-rich microdomains in the regulation of

Supplementary Material can be found in the figshare repository doi: 10.6084/m9.figshare.13606394.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by PI39/17 approved by the University of Zaragoza Ethics Committee for Animal Experiments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RP-P and AC: conceptualization, supervision, and writing—review and editing. SM-J, BP-B, SG-M, and MC-S: methodology. SM-J, BP-B, SG-M, and AC: formal analysis. SM-J, MC-S, BP-B, RP-P, and AC: investigation. SM-J, BP-B, RP-P, and AC: data curation. SM-J: writing—original draft preparation. RP-P: project administration, funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

FUNDING

This research was funded by CICYT AGL-2017-83799-R and DGA A07 17R. SM-J was a predoctoral contract from the Diputación General de Aragón (DGA).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge the use of the Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI (Universidad de Zaragoza), ANGRA, for supplying the sires and S. Morales for the collection of semen samples.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.655794/full#supplementary-material>

- Nox isoforms and redox signaling in human vascular smooth muscle cells. *Sci. Rep.* 10:17818.
- Appiah, M. O., He, B., Lu, W., and Wang, J. (2019). Antioxidative effect of melatonin on cryopreserved chicken semen. *Cryobiology* 89, 90–95. doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.05.001
- Ashrafi, I., Kohram, H., and Ardabili, F. F. (2013). Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 139, 25–30. doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.03.016
- Ball, B. A., Vo, A. T., and Baumber, J. (2001). Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 62, 508–515. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.508
- Banfi, B., Molnar, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedus, B., Demaux, N., et al. (2001). A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J. Biol. Chem.* 276, 37594–37601. doi: 10.1074/jbc.M103034200
- Bedard, K., and Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313. doi: 10.1152/physrev.00044.2005
- Benitez-King, G. (2006). Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J. Pineal Res.* 40, 1–9. doi: 10.1111/j.1600-079x.2005.00282.x
- Bittman, E. L., Dempsey, R. J., and Karsch, F. J. (1983). Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. *Endocrinology* 113, 2276–2283. doi: 10.1210/endo-113-6-2276
- Brener, E., Rubinstein, S., Cohen, G., Shternall, K., Rivlin, J., and Breitbart, H. (2003). Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 68, 837–845. doi: 10.1095/biolreprod.102.009233
- Brzezinski, A., Seibel, M. M., Lynch, H. J., Deng, M. H., and Wurtman, R. J. (1987). Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64, 865–867. doi: 10.1210/jcem-64-4-865
- Burnaugh, L., Sabour, K., and Ball, B. A. (2007). Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology* 67, 580–589. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.07.021
- Carvajal-Serna, M., Paesa, M., Barale, J., Gimeno-Martos, S., Peña-Delgado, V., Miguel-Jiménez, S., et al. (2020). Effect of melatonin on actin and α -tubulin distribution related to in vitro capacitation in ram sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 220:106363. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106363
- Casao, A., Cebrian, I., Asumpcao, M. E., Perez-Pe, R., Abecia, J. A., Forcada, F., et al. (2010a). Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8:59. doi: 10.1186/1477-7827-8-59
- Casao, A., Mendoza, N., Perez-Pe, R., Grasa, P., Abecia, J. A., Forcada, F., et al. (2010b). Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *J. Pineal Res.* 48, 39–46. doi: 10.1111/j.1600-079x.2009.00722.x
- Chen, X. J., Zhang, Y., Jia, G. X., Meng, Q. G., Bunch, T. D., Liu, G. S., et al. (2016). Effect of melatonin supplementation on cryopreserved sperm quality in mouse. *Cryo Lett.* 37, 115–122.
- Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., Van Meir, E. G., and Lambeth, J. D. (2001). Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 269, 131–140. doi: 10.1016/s0378-1119(01)00449-8
- Colas, C., James, P., Howes, L., Jones, R., Cebrian-Perez, J. A., and Muino-Blanco, T. (2008). Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation. *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 649–658. doi: 10.1071/rd08023
- de Lamirande, E., and Gagnon, C. (1995). Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum. Reprod.* 10(Suppl. 1), 15–21. doi: 10.1093/humrep/10.suppl_1.15
- de Lamirande, E., Harakat, A., and Gagnon, C. (1998). Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion. *J. Androl.* 19, 215–225. doi: 10.1016/s0008-6363(99)00183-2
- du Plessis, S. S., Hagenaar, K., and Lampiao, F. (2010). The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. *Andrologia* 42, 112–116. doi: 10.1111/j.1439-0272.2009.00964.x
- Dutta, S., Majzoub, A., and Agarwal, A. (2019). Oxidative stress and sperm function: a systematic review on evaluation and management. *Arab J. Urol.* 17, 87–97. doi: 10.1080/2090598x.2019.1599624
- Espino, J., Ortiz, A., Bejarano, I., Lozano, G. M., Monllor, F., Garcia, J. F., et al. (2011). Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor- and extracellular signal-regulated kinase-mediated pathways. *Fertil. Steril.* 95, 2290–2296. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.03.063
- García-López, N., Ollero, M., Muño-Blanco, T., and Cebrián-Pérez, J. A. (1996). A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma. *Theriogenology* 46, 141–151. doi: 10.1016/0093-691x(96)00149-5
- Ghanbari, H., Keshitgar, S., and Kazeroni, M. (2018). Inhibition of the CatSper channel and NOX5 enzyme activity affects the functions of the progesterone-stimulated human sperm. *Iran J. Med. Sci.* 43, 18–25.
- Ghani, E., Keshitgar, S., Habibagahi, M., Ghannadi, A., and Kazeroni, M. (2013). Expression of NOX5 in human teratozoospermia compared to normozoospermia. *Andrologia* 45, 351–356. doi: 10.1111/and.12023
- Gillan, L., Evans, G., and Maxwell, W. M. (1997). Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 481–487. doi: 10.1071/r96046
- Gimeno-Martos, S., Casao, A., Yeste, M., Cebrian-Perez, J. A., Muino-Blanco, T., and Perez-Pe, R. (2019). Melatonin reduces cAMP-stimulated capacitation of ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 31, 420–431. doi: 10.1071/rd18087
- Gonzalez-Arto, M., Hamilton, T. R., Gallego, M., Gaspar-Torrubia, E., Aguilar, D., Serrano-Blesa, E., et al. (2016). Evidence of melatonin synthesis in the ram reproductive tract. *Andrology* 4, 163–171. doi: 10.1111/andr.12117
- 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. doi: 10.1530/rep.1.00770
- Griveau, J. F., and Le Lannou, D. (1994). Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. *Int. J. Androl.* 17, 225–231.
- Guthrie, H. D., and Welch, G. R. (2006). Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J. Anim. Sci.* 84, 2089–2100. doi: 10.2527/jas.2005-766
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press.
- 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. doi: 10.1530/jrf.0.0880343
- Herrero, M. B., De Lamirande, E., and Gagnon, C. (2003). Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. *Curr. Pharm. Des.* 9, 419–425. doi: 10.2174/1381612033391720
- Hong, C. Y., Chiang, B. N., Ku, J., Wei, Y. H., and Fong, J. C. (1985). Calcium antagonists stimulate sperm motility in ejaculated human semen. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 19, 45–49. doi: 10.1111/j.1365-2125.1985.tb02611.x
- Jang, H. Y., Kim, Y. H., Kim, B. W., Park, I. C., Cheong, H. T., Kim, J. T., et al. (2010). Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 943–950. doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01466.x
- Karimfar, M. H., Niazvand, F., Haghani, K., Ghafourian, S., Shirazi, R., and Bakhtiyari, S. (2015). The protective effects of melatonin against cryopreservation-induced oxidative stress in human sperm. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 28, 69–76. doi: 10.1177/0394632015572080
- Kawano, N., Yoshida, K., Miyado, K., and Yoshida, M. (2011). Lipid Rafts: keys to sperm maturation, fertilization, and early embryogenesis. *J. Lipids* 2011:264706.
- Koppers, A. J., De Iulius, G. N., Finnie, J. M., McLaughlin, E. A., and Aitken, R. J. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 3199–3207. doi: 10.1210/jc.2007-2616
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi: 10.1038/227680a0
- Lewis, B., and Aitken, R. J. (2001). A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa. *J. Androl.* 22, 611–622.
- Maghzal, G. J., Krause, K. H., Stocker, R., and Jaquet, V. (2012). Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 1903–1918. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.002

- Miguel-Jimenez, S., Carvajal-Serna, M., Calvo, S., Casao, A., Cebrian-Perez, J. A., Muino-Blanco, T., et al. (2020). Does melatonin exert its effect on ram sperm capacitation through nitric oxide synthase regulation? *Int. J. Mol. Sci.* 21:2093. doi: 10.3390/ijms21062093
- Moreno-Irusta, A., Dominguez, E. M., Marin-Briggiler, C. I., Matamoros-Volante, A., Lucchesi, O., Tomes, C. N., et al. (2020). Reactive oxygen species are involved in the signaling of equine sperm chemotaxis. *Reproduction* 159, 423–436. doi: 10.1530/rep-19-0480
- Musset, B., Clark, R. A., Decoursey, T. E., Petho, G. L., Geiszt, M., Chen, Y., et al. (2012). NOX5 in human spermatozoa: expression, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 287, 9376–9388.
- O'Flaherty, C. (2015). Redox regulation of mammalian sperm capacitation. *Asian J. Androl.* 17, 583–590. doi: 10.4103/1008-682x.153303
- O'Flaherty, C., De Lamirande, E., and Gagnon, C. (2004a). Phosphorylation of the Arginine-X-X (Serine/Threonine) motif in human sperm proteins during capacitation: modulation and protein kinase A dependency. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 355–363. doi: 10.1093/molehr/gah046
- O'Flaherty, C., De Lamirande, E., and Gagnon, C. (2005). Reactive oxygen species and protein kinases modulate the level of phospho-MEK-like proteins during human sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 73, 94–105. doi: 10.1095/biolreprod.104.038794
- O'Flaherty, C., Rodriguez, P., and Srivastava, S. (2004b). L-arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta* 1674, 215–221. doi: 10.1016/j.bbagen.2004.06.020
- Ollero, M., Muino-Blanco, T., Lopez-Perez, M. J., and Cebrian-Perez, J. A. (1996). Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *Int. J. Androl.* 19, 287–292. doi: 10.1111/j.1365-2605.1996.tb00477.x
- Ortiz, A., Espino, J., Bejarano, I., Lozano, G. M., Monllor, F., Garcia, J. F., et al. (2011). High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility. *J. Pineal Res.* 50, 132–139.
- Panday, A., Sahoo, M. K., Osorio, D., and Batra, S. (2015). NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol. Immunol.* 12, 5–23. doi: 10.1038/cmi.2014.89
- Pang, Y. W., Sun, Y. Q., Jiang, X. L., Huang, Z. Q., Zhao, S. J., Du, W. H., et al. (2016). Protective effects of melatonin on bovine sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 83, 993–1002. doi: 10.1002/mrd.22742
- 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.
- Patino, P., Parada, E., Farre-Alins, V., Molz, S., Cacabelos, R., Marco-Contelles, J., et al. (2016). Melatonin protects against oxygen and glucose deprivation by decreasing extracellular glutamate and Nox-derived ROS in rat hippocampal slices. *Neurotoxicology* 57, 61–68. doi: 10.1016/j.neuro.2016.09.002
- Plante, M., De Lamirande, E., and Gagnon, C. (1994). Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil. Steril.* 62, 387–393. doi: 10.1016/s0015-0282(16)56895-2
- Pool, K. R., Rickard, J. P., and De Graaf, S. P. (2021). Melatonin improves the motility and DNA integrity of frozen-thawed ram spermatozoa likely via suppression of mitochondrial superoxide production. *Domest. Anim. Endocrinol.* 74:106516. doi: 10.1016/j.domaniend.2020.106516
- Rao, M. V., and Gangadharan, B. (2008). Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. *Toxicol. In Vitro* 22, 935–942. doi: 10.1016/j.tiv.2008.01.014
- Sabeur, K., and Ball, B. A. (2007). Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. *Reproduction* 134, 263–270. doi: 10.1530/rep-06-0120
- Setyawan, E. M. N., Kim, M. J., Oh, H. J., Kim, G. A., Jo, Y. K., Lee, S. H., et al. (2016). Spermine reduces reactive oxygen species levels and decreases cryocapacitation in canine sperm cryopreservation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 479, 927–932. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.091
- Suarez, S. S., Vincenti, L., and Ceglia, M. W. (1987). Hyperactivated motility induced in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible. *J. Exp. Zool.* 244, 331–336. doi: 10.1002/jez.1402440218
- Succu, S., Berlinguer, F., Pasciu, V., Satta, V., Leoni, G. G., and Naitana, S. (2011). Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *J. Pineal Res.* 50, 310–318. doi: 10.1111/j.1600-079x.2010.00843.x
- Touyz, R. M., Anagnostopoulou, A., Rios, F., Montezano, A. C., and Camargo, L. L. (2019). NOX5: molecular biology and pathophysiology. *Exp. Physiol.* 104, 605–616. doi: 10.1113/ep086204
- van Gestel, R. A., Brewis, I. A., Ashton, P. R., Helms, J. B., Brouwers, J. F., and Gadella, B. M. (2005). Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol. Hum. Reprod.* 11, 583–590. doi: 10.1093/molehr/gah200
- Vernet, P., Fulton, N., Wallace, C., and Aitken, R. J. (2001). Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 65, 1102–1113. doi: 10.1095/biolreprod65.4.1102
- Visconti, P. E., Stewart-Savage, J., Blasco, A., Battaglia, L., Miranda, P., Kopf, G. S., et al. (1999). Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol. Reprod.* 61, 76–84. doi: 10.1095/biolreprod61.1.76
- 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. doi: 10.1016/0012-1606(84)90084-8
- Whittington, K., Harrison, S. C., Williams, K. M., Day, J. L., Mclaughlin, E. A., Hull, M. G., et al. (1999). Reactive oxygen species (ROS) production and the outcome of diagnostic tests of sperm function. *Int. J. Androl.* 22, 236–242. doi: 10.1046/j.1365-2605.1999.00174.x
- Yanagimachi, R. (1975). Acceleration of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa by detergents and other reagents. *Biol. Reprod.* 13, 519–526. doi: 10.1095/biolreprod13.5.519
- Zhang, H., and Zheng, R. L. (1996). Promotion of human sperm capacitation by superoxide anion. *Free Radic. Res.* 24, 261–268. doi: 10.3109/10715769609088023
- Zhu, Z., Li, R., Lv, Y., and Zeng, W. (2019). Melatonin protects rabbit spermatozoa from cryo-damage via decreasing oxidative stress. *Cryobiology* 88, 1–8. doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.04.009

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Miguel-Jiménez, Pina-Beltrán, Gimeno-Martos, Carvajal-Serna, Casao and Pérez-Pe. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

5.3.ARTÍCULO 3

Does Melatonin Exert Its Effect on Ram Sperm Capacitation Through Nitric Oxide Synthase Regulation?



Article

Does Melatonin Exert Its Effect on Ram Sperm Capacitation Through Nitric Oxide Synthase Regulation?

Sara Miguel-Jiménez , Melissa Carvajal-Serna , Silvia Calvo, Adriana Casao ,
José Álvaro Cebrián-Pérez, Teresa Muiño-Blanco  and Rosaura Pérez-Pe * 

Department of Biochemistry and Molecular and Cell Biology, Faculty of Veterinary Sciences, Institute of Environmental Sciences of Aragón (IUCA), University of Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain; 652325@unizar.es (S.M.-J.); mcarvajals@unl.edu.co (M.C.-S.); silvianumber4@gmail.com (S.C.); adriana@unizar.es (A.C.); pcebrian@unizar.es (J.Á.C.-P.); muino@unizar.es (T.M.-B.)

* Correspondence: rosperez@unizar.es

Received: 28 January 2020; Accepted: 16 March 2020; Published: 18 March 2020



Abstract: Nitric oxide (NO \cdot), synthesized from L-arginine by nitric oxide synthase (NOS), is involved in sperm functionality. NOS isoforms have been detected in spermatozoa from different species, and an increment in NOS activity during capacitation has been reported. This work aims to determine the presence and localization of NOS isoforms in ram spermatozoa and analyse their possible changes during in vitro capacitation. Likewise, we investigated the effect of melatonin on the expression and localization of NOS and NO \cdot levels in capacitated ram spermatozoa. Western blot analysis revealed protein bands associated with neuronal NOS (nNOS) and epithelial NOS (eNOS) but not with inducible NOS (iNOS). However, the three isoforms were detected by indirect immunofluorescence (IFI), and their immunotypes varied over in vitro capacitation with cAMP-elevating agents. NO \cdot levels (evaluated by DAF-2-DA/PI staining) increased after in vitro capacitation, and the presence of L-arginine in the capacitating medium raised NO \cdot production and enhanced the acrosome reaction. Incubation in capacitating conditions with a high-cAMP medium with melatonin modified the NOS distribution evaluated by IFI, but no differences in Western blotting were observed. Melatonin did not alter NO \cdot levels in capacitating conditions, so we could infer that its role in ram sperm capacitation would not be mediated through NO \cdot metabolism.

Keywords: ram spermatozoa; capacitation; nitric oxide; melatonin

1. Introduction

Nitric oxide (NO \cdot) is a free radical involved in various physiological processes, acting as a signalling molecule. There has been growing interest in the role of NO \cdot in sperm motility [1], viability [2], hyperactivation [3,4], capacitation [5–7], acrosome reaction [8,9] and zona pellucida-binding [10]. Moreover, an antiapoptotic role has been attributed to NO \cdot in spermatozoa [11].

Nitric oxide synthase (NOS) is the enzyme responsible for NO \cdot production through the conversion of L-arginine to L-citrulline. Three isoforms of this enzyme have been identified to date: type I or neuronal (nNOS), type II or inducible (iNOS) and type III or endothelial (eNOS). Types I and III are constitutive isoforms, and their activation is regulated by calcium and calmodulin [12], whereas type II is independent of calcium, although in mice, it binds calmodulin tightly [13]. Constitutive isoforms are responsible for physiological NO \cdot levels (nM levels) in somatic cells, whereas inducible NOS is involved in the production of higher levels (μ M levels) under intracellular or extracellular inflammatory stimuli [14–16].

All isoforms of this enzyme have been described in human [17–19], bovine [20,21], murine [22] and boar [9] spermatozoa, among others. Furthermore, it has been demonstrated that NOS activity increases during in vitro capacitation in human sperm [5]. However, to the best of our knowledge, there are no previous studies identifying any NOS isoforms in ram spermatozoa.

In mammals, melatonin is secreted by the pineal gland in response to light stimulus, and, apart from other functions, it modulates the secretion and synthesis of gonadotropic hormones via the hypothalamic-pituitary axis [23]. Thus, melatonin regulates reproductive seasonality in some species, such as ovine. Apart from pineal melatonin, this molecule is synthesized in other tissues and organs, including those in the male reproductive tract, as we recently demonstrated in ram [24]. Melatonin is also present in reproductive fluids such as seminal plasma [25] or follicular fluid [26]. This could explain how melatonin affects ram sperm functionality directly, modulating processes such as capacitation and decreasing apoptotic markers and oxidative stress [27]. The antioxidant capacity of melatonin in ram spermatozoa could be the reason for its antiapoptotic action, since high levels of reactive oxygen species (ROS) lead to cell death [28–31]. The ROS include superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl (OH) and nitric oxide ($NO\cdot$) (also included in the reactive nitrogen species, RNS). All these molecules play an important role in sperm capacitation (reviewed by [32]).

Melatonin can modulate NOS activity and, consequently, the nitric oxide in somatic cells [33–35]. Du Plessis et al. [28] concluded that melatonin reduces $NO\cdot$ levels in human spermatozoa in vitro, but they were not able to determine whether the decrease in NOS activity might be the reason for this reduction.

The main objective of this study was to determine whether the effect of melatonin on ram sperm capacitation was mediated by an action on $NO\cdot$ metabolism. For this purpose, we first focused on the detection of nitric oxide synthase isoforms in ram spermatozoa (1). We then analyzed the changes in the protein expression profile and localization of NOS isoforms during in vitro capacitation (2). Moreover, we aimed to determine the involvement of nitric oxide in ram sperm capacitation, using a $NO\cdot$ precursor (L-arginine) and a NOS competitive inhibitor (NG-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME) (3). Finally, we investigated how melatonin affected the expression and localization of NOS and $NO\cdot$ levels in capacitated ram spermatozoa (4).

2. Results

2.1. Nitric Oxide Synthase Immunodetection and Immunolocalization

Western blot analysis identified protein bands with a molecular weight corresponding to eNOS (~100 kDa) and nNOS (~120 kDa) in swim-up and in vitro capacitated samples (control and capacitated control, Cap-C), but no bands associated with iNOS were detected (Figure 1). The molecular weights of these bands matched those found in the positive controls.

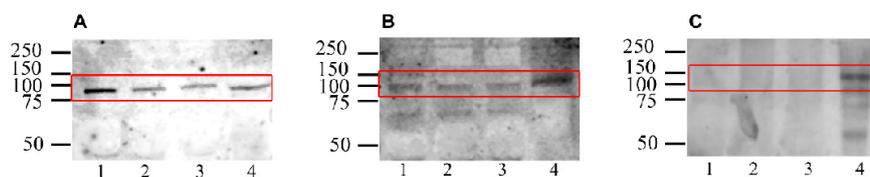


Figure 1. Western blot analysis of the presence of nitric oxide synthase isoforms eNOS (A), nNOS (B) and iNOS (C) in swim-up selected (lane 1) and in vitro capacitated without (control, lane 2) or with cAMP-elevating agents (Cap-C, lane 3) ram sperm protein extracts. Positive controls: rat lung extract (RLE, lane 4 in A) for eNOS, mouse brain extract (MBE, lane 4 in B) for nNOS and mouse macrophage activated with $IFN\gamma$ /LPS lysate (LPS-L, lane 4 in C) for iNOS.

Immunofluorescence analysis revealed the presence of the three isoforms in ram spermatozoa. Two different immunotypes for each isoform were distinguished. Immunotype 1 with labeling at the postacrosomal region, neck and apical edge, and immunotype 2 with labeled postacrosomal region

and neck, were distinguished for eNOS (Figure 2A). Immunotype 3 with labeling at the postacrosomal region and the apical edge and immunotype 4 labeling the postacrosomal region were distinguished in nNOS (Figure 2B) and iNOS (Figure 2C). iNOS also showed brighter fluorescence in the flagellum in both immunotypes 3 and 4 (Figure 2C).

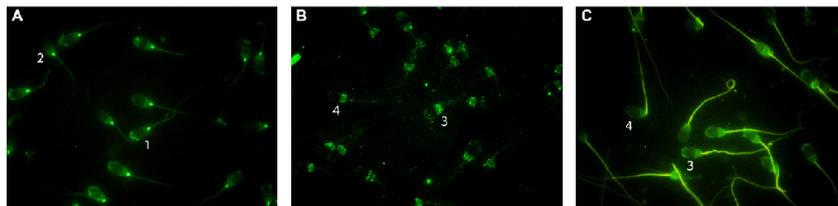


Figure 2. Indirect immunofluorescence (IFI) localization of nitric oxide synthase isoforms eNOS (A), nNOS (B) and iNOS (C) evaluated by fluorescence microscopy in ram spermatozoa. Two immunotypes can be seen in each isoform: labeling in postacrosomal region + neck + apical edge (1) or postacrosomal region + neck (2) in eNOS (A), postacrosomal region + apical edge (3) or postacrosomal region (4) in nNOS (B) and iNOS (C). Original magnification $\times 1000$.

2.2. Role of Nitric Oxide in Ram Sperm Capacitation

Once the presence of NOS in ram spermatozoa had been demonstrated, we evaluated the changes in the levels of its product, i.e., nitric oxide ($\text{NO}\cdot$), after incubation in capacitating conditions. To further investigate the involvement of $\text{NO}\cdot$ in ram sperm capacitation, samples were incubated with a nitric oxide precursor, L-arginine at 10 mM, or with a NOS inhibitor, NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) at 100 μM and 1 mM. The capacitation status together with motility and viability were evaluated. Viability, according to membrane integrity, was not compromised in any of the experimental conditions (Appendix A, Figure A1).

2.2.1. Changes in Nitric Oxide Levels During Incubation in Capacitating Conditions

Nitric oxide levels were assessed by flow cytometry, and the results are shown in Figure 3. The percentage of live sperm with high $\text{NO}\cdot$ levels (PI-/DAF+) significantly increased ($p < 0.05$) after in vitro capacitation without (control) and with cAMP-elevating agents (capacitated control, Cap-C). The addition of 10-mM L-arginine (L-arg) in both the control and Cap-C samples led to a significant increment ($p < 0.05$ and $p < 0.0001$, respectively) in the percentage of live spermatozoa with high $\text{NO}\cdot$ levels. Additionally, the NOS inhibitor, L-NAME, at 100 μM reduced ($p < 0.05$) the nitric oxide production in capacitated sperm (Cap-C), but no effect was appreciated in the control samples.

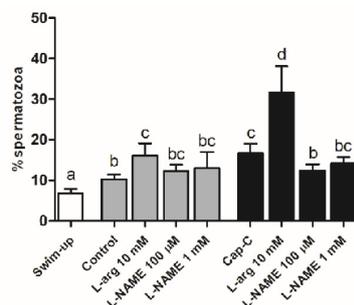


Figure 3. Percentage of live sperm with high nitric oxide levels (PI-/DAF+) assessed by flow cytometry before (swim-up, white bars) and after in vitro capacitation without (control, grey bars) and with cAMP-elevating agents (Cap-C, black bars) and with L-arginine (L-arg, 10 mM) or L-NAME (100 μM or 1 mM). Data are shown as mean \pm S.E.M. ($n = 6$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

2.2.2. Influence of Nitric Oxide on Capacitation Status

The chlortetracycline (CTC) analysis revealed significant differences between samples (Figure 4). As expected, incubation in capacitating conditions produced a significant ($p < 0.001$) decrease in noncapacitated spermatozoa, concomitant with an increase in the percentage of capacitated and acrosome-reacted cells, which was much more marked in samples with c-AMP-elevating agents (Cap-C). The increase in NO \cdot levels by the addition of L-arginine (Figure 3) gave rise to a significantly higher percentage of acrosome-reacted spermatozoa (Figure 4) in the control (25.5% \pm 4.2% in control + L-arg vs. 10.5% \pm 1.15% in control) and capacitated samples (26.13% \pm 2.86% in Cap-C + L-arg vs. 14.75% \pm 1.93% in Cap-C) ($p < 0.001$). Concomitantly, the percentage of noncapacitated (8.63% \pm 1.48%) and capacitated (64.87% \pm 2.31%) spermatozoa decreased significantly ($p < 0.05$) in Cap-C samples with L-arg in comparison with its own control, Cap-C (14.37% \pm 1.91% noncapacitated and 70.88% \pm 2.23% capacitated sperm). However, the slight reduction in NO \cdot levels provoked by the addition of L-NAME (Figure 3) did not exert an effect on sperm samples during capacitation (Figure 4).

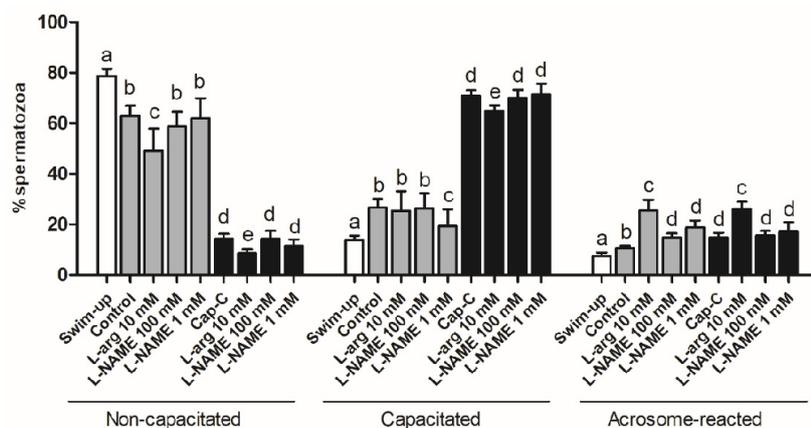


Figure 4. Assessment of capacitation status, evaluated by chlortetracycline(CTC), in ram spermatozoa before (swim-up, white bars) and after in vitro capacitation without (control, grey bars) and with cAMP-elevating agents (Cap-C, black bars) and with L-arginine (L-arg, 10 mM) or L-NAME (100 μ M or 1 mM). Data of noncapacitated, capacitated and acrosome-reacted spermatozoa are mean percentages \pm S.E.M ($n = 8$). Different letters within the same group indicate significant differences ($p < 0.05$).

2.2.3. Influence of Nitric Oxide on Sperm Motility

Total motility declined significantly after in vitro capacitation, but it was not affected by the increase or decrease of NO \cdot levels when L-arginine or L-NAME were added, respectively (Figure 5). Progressive motility did not change in the control samples compared to the swim-up group, but L-NAME at 100 μ M increased significantly ($p < 0.05$) the percentage of progressive motile spermatozoa (Figure 5). Samples capacitated in the presence of c-AMP-elevating agents (Cap-C) showed a significant reduction in progressive motility in comparison with the swim-up and control samples, but incubation with L-arginine or L-NAME in these conditions did not affect the progressive motility results.

2.3. Effect of Melatonin on the Nitric Oxide Metabolism

After confirming the presence of nitric oxide synthase in ram spermatozoa and the influence of nitric oxide on in vitro capacitation, the next step was to determine whether the effect of melatonin on ram sperm capacitation was mediated by the interaction with the nitric oxide metabolism.

CTC staining (Figure 6) showed that melatonin added to capacitated samples (Cap-C) caused a decrease in the percentage of noncapacitated spermatozoa at 100 pM and, in contrast, an increment

with a 1- μ M concentration ($p < 0.05$). The percentage of acrosome-reacted sperm was significantly higher in samples treated with 100-pM melatonin ($15.5\% \pm 2.36\%$ vs. $8.83\% \pm 0.79\%$ in Cap-C).

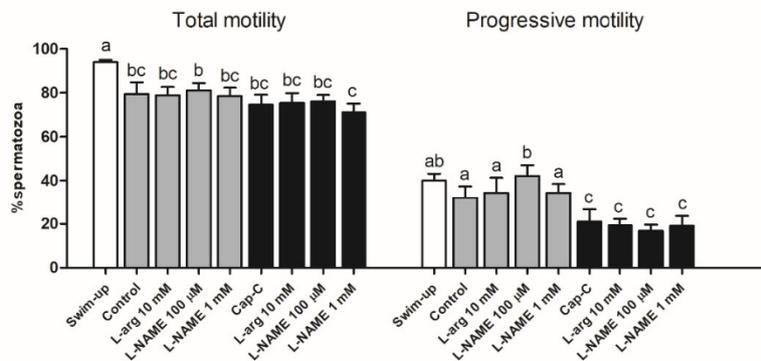


Figure 5. Percentage of total motile (left) and progressive (right) spermatozoa before (swim-up, white bars) and after in vitro capacitation without (control, grey bars) and with cAMP-elevating agents (Cap-C, black bars) and with L-arginine (L-arg, 10 mM) or L-NAME (100 μ M or 1 mM). Data are shown as mean \pm S.E.M. ($n = 5$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

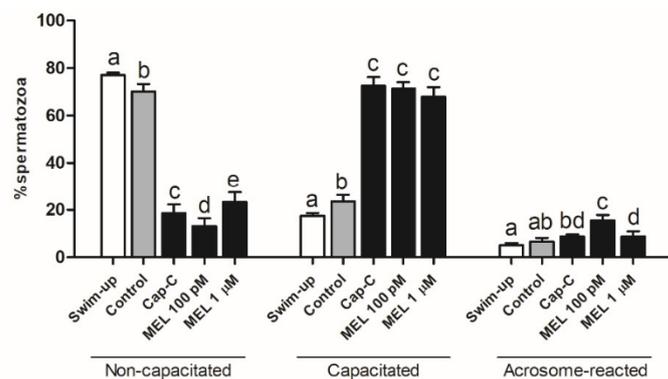


Figure 6. Assessment of capacitation status, evaluated by CTC, in ram spermatozoa before (swim-up, white bars) and after in vitro capacitation without (control, grey bars) and with cAMP-elevating agents (Cap-C, black bars) and with melatonin (MEL, 100 pM or 1 μ M). Data of noncapacitated, capacitated and acrosome-reacted spermatozoa are mean percentages \pm S.E.M ($n = 7$). Different letters within the same group indicate significant differences ($p < 0.05$).

2.3.1. Effect of Melatonin on Nitric Oxide Synthase Levels and Immunolocalization

In order to study whether the concentration-dependent effects of melatonin on ram sperm capacitation were mediated by acting on the nitric oxide synthase, we investigated changes in eNOS and nNOS levels by Western blot in capacitated (Cap-C) samples incubated with melatonin at 100 pM and 1 μ M (Figure 7A,B). Changes in iNOS were not investigated, given that it was not detected by Western blot. After quantifying NOS bands for each isoform by densitometry, in relation to the α -tubulin loading control (~50kDa), no significant differences were found between samples (Figure 7C,D).

However, when we analysed the proportion of the different immunotypes for each NOS isoform, changes associated with in vitro capacitation could be observed (Figure 8). The addition of cAMP-elevating agents (Cap-C sample) led to a decrease ($p < 0.05$) in the percentage of spermatozoa showing labeling on the sperm apical edge in the three isoforms (immunotype 1 for eNOS and 3 for nNOS and iNOS). This reduction became more pronounced in the presence of melatonin (100 pM

and 1 μ M) for iNOS ($56.0\% \pm 12\%$ and $61.67\% \pm 12\%$, respectively, vs. $72.83\% \pm 1.59\%$ in the Cap-C sample; $p < 0.05$; Figure 8C). In contrast, for nNOS, immunotype 3 became predominant again when capacitated samples were incubated with melatonin ($62.67\% \pm 6.3\%$ and $62.00\% \pm 7.01\%$ for 100 pM and 1 μ M, respectively; $p < 0.05$; Figure 8B). No changes in eNOS immunotypes were observed in the presence of melatonin (Figure 8A).

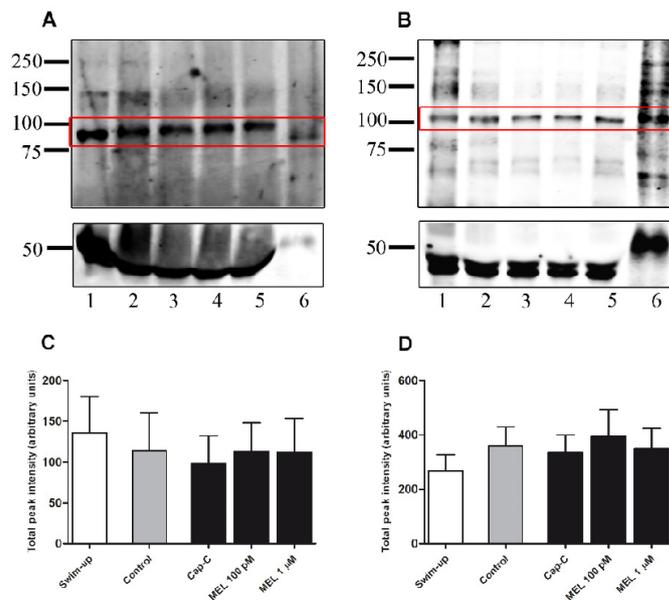


Figure 7. Western blot analysis of the presence of nitric oxide synthase isoforms eNOS (A) and nNOS (B) in swim-up selected (lane 1) and incubated 3 h in capacitating conditions without (control, lane 2) or with cAMP-elevating agents (Cap-C, lane 3) ram spermatozoa protein extracts. Effect of melatonin (MEL) 100 pM and 1 μ M in capacitated samples with high cAMP (lanes 4 and 5). Positive controls: rat lung extract for eNOS (RLE, lane 6 in A) and mouse brain extract for nNOS (MBE, lane 6 in B). Densitometry quantification of eNOS (C) and nNOS (D) normalized to α -tubulin (loading control) analyzed by Western blot ($n = 4$).

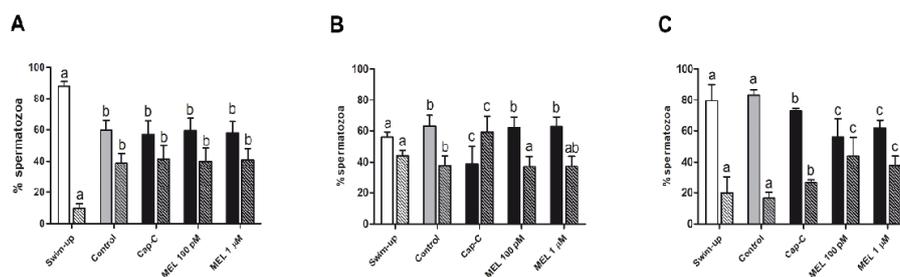


Figure 8. Percentages of the immunotypes for eNOS (A), nNOS (B) and iNOS (C) in swim-up selected (white bars) and in vitro capacitated ram spermatozoa without (control, grey bars) or with cAMP-elevating agents (Cap-C, black bars), and with melatonin (MEL) 100 pM and 1 μ M. Plain bars represent immunotype 1 for eNOS (postacrosomal region + neck + apical edge) and immunotype 3 for iNOS and nNOS (postacrosomal region + apical edge), whereas striped bars represent immunotype 2 (postacrosomal region + apical edge) for eNOS and immunotype 4 (postacrosomal region) for iNOS and nNOS. Results are shown as mean \pm SEM ($n = 5$). Different letters indicate statistical differences between treatments ($p < 0.05$).

2.3.2. Effect of Melatonin on Nitric Oxide Levels

The presence of melatonin did not significantly modify the percentage of live spermatozoa with high nitric oxide levels (PI-/DAF+) compared to the capacitated control sample (Cap-C), although the values obtained were similar to the control sample without cAMP-elevating agents (Figure 9).

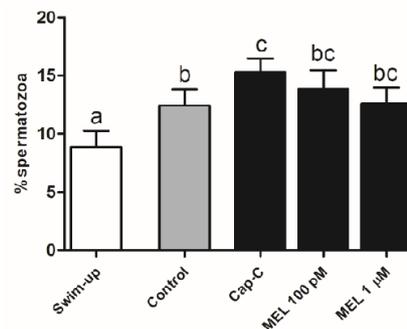


Figure 9. Percentage of live sperm with high nitric oxide levels (PI-/DAF+) assessed by flow cytometry before (swim-up, white bars) and after in vitro capacitation without (control, grey bars) and with cAMP-elevating agents (Cap-C, black bars) and with L-arginine (L-arg, 10 mM) or L-NAME (100 µM or 1 mM). Data are shown as mean \pm S.E.M ($n = 7$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

3. Discussion

The role of nitric oxide in sperm physiology has been widely investigated. It affects sperm motility [1,3], capacitation [5,6] and the acrosome reaction [8]; acts as a chemoattractant and enhances zona pellucida-binding [10]. These actions are regulated by the active nitric oxide synthase (NOS), which generates nitric oxide from L-arginine.

In the present study, we have demonstrated, for the first time, the presence of the three isoforms of NOS in ram spermatozoa and their capacity to produce nitric oxide. Constitutive isoforms, neural (nNOS) and endothelial (eNOS), were detected by Western blotting but not the inducible form (iNOS). Both nNOS and eNOS had previously been identified in spermatozoa from other species, such as human, mouse, bull, boar, stallion and cat, but the inducible form (iNOS) was only detected in some of them (reviewed by [36]). At least in somatic cells, the iNOS should not be expressed without the presence of a stimulus such as inflammation, lipopolysaccharides or cytokines [35,37–39]. If iNOS is present in low quantities under normal conditions, this would explain why it was not possible to detect it by Western blotting in the current work. Moreover, although eNOS and nNOS were evidenced by Western blot, densitometric quantification did not reveal any significant change in their levels after in vitro capacitation. Other techniques to measure NOS activity should be addressed in future studies.

However, the three NOS isoforms were detected by IFI, all being located mainly in the sperm head, with similar labeling patterns. We described two immunotypes for each isoform (immunotypes 1 and 2 for eNOS and immunotypes 3 and 4 for nNOS and iNOS) related to the presence or absence of fluorescence in the apical edge. Meiser and Schulz [20] localized the nNOS isoform in the apical region of the head and tail of bull spermatozoa, whereas the eNOS was located only in the apical region. In ejaculated boar spermatozoa, eNOS and nNOS were identified in the acrosome and iNOS in the whole head, neck and flagellum [40]. However, no immunotypes or changes in NOS localization after in vitro capacitation were reported for bull or boar spermatozoa. In the current work, capacitation induced by the addition of cAMP-elevating agents led to a decrease in the percentage of ram spermatozoa showing labeling on the apical edge for all three isoforms. This would be in concordance with the results reported for mice spermatozoa [22], where NOS disappeared off the head when spermatozoa were incubated under capacitating conditions, although the NOS isoforms were not identified in that

work. Thus, these findings suggest that nitric oxide synthase may change its localization in the sperm cell so as to modulate its activity and, consequently, the nitric oxide production in ram spermatozoa.

After demonstrating the presence of NOS in ram spermatozoa and its distribution changes after *in vitro* capacitation, we investigated how its product, nitric oxide, fluctuates during incubation in capacitating conditions. Our results showed a significant increase in NO \cdot levels, which has also been reported for other species such as human [8] and boar [41]. The addition of L-arginine raised NO \cdot sharply, as expected for a NO \cdot precursor. This extra amount of NO \cdot led to a major percentage of acrosome-reacted sperm, as described for other species [19,42–44].

Ambiguous results have been reported about the role of NO \cdot in sperm motility. Some studies claimed the beneficial effect of NO \cdot in sperm motility [1,45], while others concluded that the induction of NO \cdot , for example by L-arg, was detrimental to progressive motility [21,46–48]. In our study, the increment in NO \cdot induced by the addition of L-arginine had no effect on sperm motility, probably due to how the samples were capacitated and, therefore, hyperactivated, which could mask the putative effect of L-arginine.

Incubation with a NOS inhibitor, L-NAME, was able to reduce the nitric oxide levels only in ram sperm samples incubated with cAMP-elevating agents, but this slight decrease did not provoke changes in sperm motility or the capacitation state. Reported effects of L-NAME on sperm from different species are contradictory. Whereas some authors did not observe any action of this compound [5,49], others clearly found effects on sperm physiology [5,7,43,44,49,50]. These conflicting results could be due to the different responses of spermatozoa from different species to the L-NAME and also the varied protocols used to evaluate its actions. In any case, the small decrease in NO \cdot levels that L-NAME induced in ram spermatozoa was not able to inhibit capacitation or the acrosome reaction, probably because the process had already been triggered.

Melatonin is a well-known antioxidant that also plays an important role in sperm functionality [30,51], especially in ram spermatozoa [24,25]. Our group have previously reported the bimodal action of melatonin on ram sperm in *in vitro* capacitation, as well as its protective role against apoptosis and oxidative stress [27,52]. The results in this study supported our previous findings, confirming that melatonin at micromolar concentrations prevents sperm capacitation, whereas at picomolar concentrations, it increases the percentage of acrosome-reacted, and decreases noncapacitated, spermatozoa. We further investigated whether this melatonin effect was mediated by its interaction with NOS and/or nitric oxide metabolism. Our results showed that melatonin was able to induce changes in NOS distribution in capacitated ram sperm. Thus, the presence of melatonin prevented changes in nNOS immunotypes during capacitation with high-cAMP agents. We might postulate that the nNOS moves out of the acrosomal region due to the membrane reorganization, which occurs during the capacitation process, and that melatonin modifies the nNOS location in the same way that it modulates ram sperm capacitation. On the other hand, melatonin enhanced the effect of capacitation with high-cAMP agents on the iNOS distribution, further decreasing the apical-edge labeling. This behavior could be explained by the different roles of the NOS isoforms. Staicu et al. [40] postulated that the constitutive isoforms (eNOS and nNOS) could be involved in sperm capacitation and that iNOS could be related to inflammation or stress, so the changes observed in iNOS during *in vitro* capacitation with melatonin could not exactly be related to this process. Taking into account the bimodal role that melatonin has on ram sperm in *in vitro* capacitation, stimulating this process at low concentrations (100 pM) and preventing it at high doses (1 μ M) [27], it is quite surprising that both melatonin concentrations have similar effects on iNOS and nNOS distribution. Finally, no changes in eNOS location were detected after capacitation in high-cAMP conditions or with the presence of melatonin. Likewise, no significant changes were observed in the levels of these enzymes analyzed by Western blot after densitometric quantification. To further confirm these results, enzymatic assays should be carried out in future studies.

Finally, the addition of melatonin to the high-cAMP capacitated samples did not affect the nitric oxide production, as L-arginine or L-NAME did. Therefore, we could postulate that the action of

melatonin on ram sperm capacitation is not mediated through the NO[•] pathway. Du Plessis et al. [28] described a scavenging effect of melatonin in human spermatozoa after the evaluation of DAF2-DA fluorescence, but, contrary to our previous publications [52], they did not see any effect on the reactive oxygen species (ROS). This might be due to species-specific differences or, more likely, to the fact that they used raw semen, and we studied the melatonin effects in capacitated samples. Nonetheless, it could still be postulated that there is some effect of melatonin on nitric oxide production, because the percentage of spermatozoa with high NO[•] levels in samples capacitated with melatonin went down to values similar to those in the control sample (without cAMP-elevating agents).

Considering the results obtained from this work taken together, we have evidenced, for the first time, the presence of the nitric oxide synthase isoforms in ram spermatozoa. Moreover, we have proved that nitric oxide plays a role in ram sperm capacitation, given that the location of some NOS isoforms changed and the levels of NO[•] increased after in vitro capacitation. Furthermore, the induction of NO[•] synthesis by the addition of L-arginine caused an increment in the percentage of acrosome-reacted spermatozoa. Melatonin modified the location of NOS isoforms but not their protein expression profile or the NO[•] levels. Thus, the effect produced by this hormone on ram sperm capacitation does not seem to take place through the nitric oxide pathway.

4. Materials and Methods

4.1. Semen Collection and Processing

Semen was collected from nine *Rasa Aragonesa* rams (2–4 years old) using an artificial vagina. All the rams belonged to the National Association of *Rasa Aragonesa* Breeding (ANGRA) and were kept at the Experimental Farm of the University of Zaragoza Veterinary School under uniform nutritional conditions. After a period of two days' abstinence, two successive ejaculates were collected, and second ejaculates were pooled and processed together to avoid individual differences [53]. Ejaculates were kept at 37° until analysis.

All experimental procedures were performed under the project license PI34/11 approved by the University of Zaragoza Ethics Committee for Animal Experiments.

A seminal plasma-free sperm population was obtained using a dextran swim-up procedure [54] performed in a medium with the following composition: 200 mM sucrose, 50 mM NaCl, 18.6 mM sodium lactate, 21 mM HEPES, 10 mM KCl, 2.8 mM glucose, 0.4 mM MgSO₄, 0.3 mM sodium pyruvate, 0.3 mM K₂HPO₄, 5 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 30 mg/mL dextran, 1.5 IU/mL penicillin and 1.5 mg/mL streptomycin, pH 6.5.

The sperm concentration was calculated in duplicate using a Neubauer chamber (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany). Initial concentration of spermatozoa in the collected ejaculates was 3–4 × 10⁹ cells/mL and 3–4 × 10⁸ cells/mL after the swim-up procedure.

4.2. In Vitro Capacitation

Swim-up-selected spermatozoa, in aliquots of 1.6 × 10⁸ cells/mL, were incubated for 3 h at 39 °C in a humidified incubator with 5% CO₂ in the air. Incubations were performed in a complete TALP medium [55] containing 100 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 21.6 mM Na lactate, 3 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM Na pyruvate, 5 mM glucose and 5 mg/mL bovine serum albumin (BSA), with a pH of 7.2. A high-cAMP medium already proven for capacitating ram spermatozoa [56,57] composed of 1 mM dibutyryl (db)-cAMP, 1 mM caffeine, 1 mM theophylline, 0.2 mM okadaic acid and 2.5 mM methyl-β-cyclodextrin was added to the TALP medium to induce in vitro capacitation (capacitated control sample). Another control sample incubated in a TALP medium alone without the addition of cAMP-elevating agents was maintained under the same incubation conditions (control sample).

To further investigate the role of nitric oxide during in vitro capacitation, NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a nonselective nitric oxide synthase inhibitor, was added to the TALP (control)

and high-cAMP samples at final concentrations of 100 μ M and 1 mM, whereas L-arginine (L-arg), a NOS substrate, was used in both media at a 10 mM concentration, based on the previous work of Hassanpour et al. [46].

Melatonin was solubilized in dimethyl sulphoxide (DMSO) and phosphate-buffered saline (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 and 1.76 KH_2PO_4 , pH 7.4) and added to the high-cAMP capacitated samples at a final concentration of 1 μ M or 100 pM. The final concentration of DMSO in all the melatonin samples was 0.1%. The same DMSO concentration was included in the control samples incubated in capacitating conditions.

The experimental groups were defined as follows: swim-up, for the spermatozoa selected by the dextran swim-up method before inducing in vitro capacitation, control, for the spermatozoa incubated under capacitating conditions (3 h at 39 °C in 100% humidity and 5% CO_2 in the air) in TALP medium and capacitated control (Cap-C), for spermatozoa incubated under capacitating conditions in TALP medium with the cAMP-elevating agents. The concentrations of each treatment (L-arg, L-NAME or melatonin) added to each condition were indicated when necessary.

4.3. Sperm Motility Evaluation

Motility kinematic parameters, total motility and progressive motility were evaluated using a computer-assisted sperm analysis (CASA) system, the OpenCASA motility module, a free and open-source software that we recently developed (Alquezar-Baeta et al., 2019). Two drops of 2 μ L of each sample, diluted to a final concentration of 3×10^7 cells/mL, were placed in a Makler counting chamber (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) prewarmed and maintained at 37 °C during all the analyses by a heated slide holder. The spermatozoa were recorded with a video camera (Basler acA1920; Basler Vision Components, Ahrensburg, Germany) mounted on a microscope (Nikon Eclipse 50i, Nikon Instruments Int, Tokyo, Japan) equipped with a 10 \times negative-phase contrast lens.

Recorded videos were evaluated with the following settings: 60 frames per second, 120 frames, 800 \times 600 pixel image resolution, 10 μm^2 minimum cell size, 100 μm^2 maximum cell size, progressive motility, STR (straightness coefficient) >80% and VAP (mean velocity) >90%, 10 $\mu\text{m/s}$ minimum VCL (curvilinear velocity), 100 $\mu\text{m/s}$ VCL lower threshold, 200 $\mu\text{m/s}$ VCL upper threshold, 30 frames minimum track length and 20 μm maximum displacement between frames.

4.4. Western Blotting

For NOS detection, sperm proteins were extracted from swim-up-selected and capacitated spermatozoa, as previously described by Colas et al. [56]. Semen was diluted in PBS (1.6×10^8 cells/mL) and centrifuged at 900 $\times g$ for 5 min. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 200 μ L of extraction sample buffer (ESB; 125 mM Tris-HCl (pH 6.8) and 2% SDS (w/v)) with a 10% protease inhibitor's cocktail (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA). After incubation at 100 °C in a sand bath for 5 min, samples were centrifuged again at 7500 $\times g$ for 5 min at 4 °C. The supernatant was recovered, and β -mercaptoethanol, glycerol and bromophenol blue (in 10% glycerol) were added to final concentrations of 5%, 1% and 0.002% (v/v), respectively. Lysates were stored at -20 °C.

Sperm extracted proteins (40 μ L) were separated in one dimension on 10% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [58] and transferred during 20 h at 22 V onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA, USA) using a wet transfer unit (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Nonspecific sites on the PVDF membrane were blocked with 5% BSA (v/v) in PBS for 4 h. The proteins were immunodetected by incubating with rabbit primary anti-eNOS (Abcam Cat# ab5589, RRID: AB_304967), anti-nNOS (Abcam Cat# ab76067, RRID: AB_2152469) or anti-iNOS (Abcam Cat# ab3523, RRID: AB_303872) antibodies, whereas a mouse anti-tubulin antibody (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-8035, RRID: AB_628408) was used as a loading control. The anti-nNOS, anti-iNOS and anti-eNOS antibodies were diluted 1/500, and the anti-tubulin antibody was diluted 1/1000 in 0.1% (v/v) Tween-20 in PBS containing 1% (w/v) BSA overnight at 4 °C. To check the specificity of the antibodies, the amino

acid sequences from ovine eNOS, iNOS and nNOS, obtained from UniProt Knowledgebase (UniProtKB, at <https://www.uniprot.org>), were aligned (Clustal Omega, Multiple Sequence Alignment program) with the peptide sequences used by the manufacturer to raise the anti-NOS antibodies (when available) or with the human NOS sequences. The high homology found between the sequences (93.75% for eNOS, 91.86% for nNOS and 85.70% for iNOS) suggests that these antibodies can be suitable for their use in ovine. We used the commercial cell lysates recommended explicitly by the antibody manufacturer as positives controls: rat lung extract for eNOS, mouse brain extract for nNOS (both from Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) and mouse macrophage activated with IFN γ /LPS lysate for iNOS (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). After extensive washing with 0.1% (v/v) Tween-20 PBS, membranes were incubated for 75 min at room temperature with the secondary antibodies donkey anti-rabbit (IRDye 680RD donkey anti-rabbit IgG antibody, LI-COR Biosciences Cat# 926-68073, RRID: AB_10954442) and donkey anti-mouse (RDye 800CW donkey anti-mouse IgG antibody, LI-COR Biosciences Cat# 926-32212, RRID: AB_621847) diluted 1/15,000 in 0.1% (v/v) Tween-20 PBS containing 1% (v/v) BSA. After extensive washing, the membranes were scanned using the OdysseyCLx Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA).

Western blot images were quantified using Odyssey Clx Infrared Imaging System software (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) to determine the relative intensity of the NOS protein bands normalized to the tubulin control.

4.5. Indirect Immunofluorescence

The localization of the three isoforms of NOS in ram spermatozoa was investigated by indirect immunofluorescence analyses. Sperm samples were diluted (8×10^6 cells/mL) in PBS and fixed in 0.5% formaldehyde at room temperature for 20 min. After that, cells were centrifugated at $900 \times g$, and the pellet was resuspended in 500- μ L PBS. Forty microliters of cell suspension were placed onto Superfrost slides (Superfrost Plus; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and permeabilized with 0.5% (v/v) Triton X-100 in PBS for 15 min. The cells were then fixed again with paraformaldehyde 1.25% in Tris-HCl 0.5 M for 5 min and washed three times with PBS; after which, the nonspecific binding sites were blocked with 5% (w/v) BSA in PBS for 5 h in a wet chamber. The slides were rewashed in PBS and incubated at 4 °C overnight in a wet chamber with the primary antibody anti-eNOS (Abcam Cat# ab5589, RRID: AB_304967), anti-nNOS (Abcam Cat# ab76067, RRID: AB_2152469) or anti-iNOS (Abcam Cat# ab3523, RRID: AB_303872), all diluted 1/25 in PBS with 1% (v/v) BSA. As indicated for the Western blotting experiments (4.4), the specificity of these antibodies was reviewed by multiple aminoacid sequence alignment. Next morning, samples were washed three times with PBS and incubated with the secondary antibody (Alexa Fluor 488 chicken anti-rabbit; Thermo Fisher Scientific; Cat#A-21441, RRID: AB_2535859) and diluted 1/800 (v/v) in PBS with 1% (v/v) BSA for 90 min at room temperature in a wet chamber. The slides were then washed three times with PBS before the addition of 6 μ L of 0.22 M 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) in glycerol:PBS (9:1 v/v) to enhance and preserve cell fluorescence. The slides were then covered with a coverslip and sealed with transparent enamel. Cells were visualized with a Nikon Eclipse E400 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) under epifluorescence illumination using a B-2A filter ($\times 1000$). All samples were processed in duplicate, and at least 150 spermatozoa were scored per slide.

4.6. Flow Cytometry Analysis

All the measurements were performed on a Beckman Coulter FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) equipped with two excitation lasers (air-cooled Argon ion laser 488 nm and Red Solid state laser 633 nm); five absorbance filters (FL1-525, FL2-575, FL3-610, FL4-675 and FL5-755; ± 5 nm each band pass filter) and CXP software. A minimum of 20,000 events were evaluated in all the experiments. The sperm population was identified for further analysis on the basis of its specific forward (FS) and side-scatter (SS) properties; thus, other events were excluded. A flow rate stabilized at 200–300 cells/s was used.

4.6.1. Evaluation of Sperm Membrane Integrity

Sperm viability, considered as the integrity of the cell plasma membrane, was assessed by adding 3 μ L of 1 mM carboxyfluorescein diacetate (CFDA; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), 1.5 mM propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) and 5 μ L of formaldehyde (0.5% (v/v) in water) to a final concentration of 5×10^6 cells/mL in a 300- μ L volume [59]. Samples were incubated at 37 °C in darkness for 15 min. For the sperm viability analysis, the Argon laser and filters FL1-525 and FL4-675 nm were used to avoid overlapping. The monitored parameters were FS log, SS log, FL1 log (CFDA) and FL4 log (PI). The percentage of viable spermatozoa (CFDA+/PI-) was evaluated.

4.6.2. Intracellular Nitric Oxide Levels

Intracellular levels of nitric oxide (NO \cdot) were determined using 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). DAF-2 is a cell-permeable probe that in the presence of NO \cdot is metabolized to the highly fluorescent triazolofluorescein (DAF-2T) [60]. Samples of 5×10^6 cells/mL were stained with 10 μ M DAF-2 and 1.5 mM PI, incubated at 37 °C in darkness for 15 min and analyzed by flow cytometry using the argon laser and filters FL1-525 and FL4-675 nm. The monitored parameters were FS log, SS log, FL1 log (DAF-2) and FL4 log (PI). Three populations were distinguished: viable cells with high NO \cdot production (PI-/DAF-2+), viable cells with low NO \cdot production (PI-/DAF2-) and nonviable cells with low NO \cdot production (PI+/DAF).

4.7. Determination of Capacitation Status

Capacitation status was determined by chlortetracycline (CTC) staining, a fluorescence assay for the evaluation of capacitation and acrosome reaction-like changes that we previously validated in ram sperm [57]. A CTC solution (750 μ M; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) was prepared daily in a buffer containing 20 mM Tris, 130 mM NaCl and 5 μ M cysteine, pH 7.8, and passed through a 0.22- μ m filter (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). After that, 20 μ L of CTC solution was added to 18 μ L of sperm sample, fixed with 5 μ L of 1.25% (*w/v*) paraformaldehyde in 0.5 M Tris-HCl (pH 7.8) and incubated at 4 °C in the dark for 30 min. Six microliters of the stained sample was placed onto a glass slide and mixed with 2 μ L of 0.22 M triethylenediamine (DABCO; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) in glycerol:PBS (9:1 v/v). The samples were covered with 24 \times 60-mm coverslips, sealed with transparent enamel and stored in the dark at -20 °C until evaluation. The samples were examined using a Nikon Eclipse E-400 microscope (Nikon Corporation, Kanagawa, Japan) under epifluorescence illumination with a V-2A filter, and at least 200 spermatozoa were scored per sample. Three sperm patterns were identified [61]: noncapacitated (even distribution of fluorescence on the head, with or without a bright equatorial band), capacitated (with fluorescence in the acrosome) and acrosome-reacted cells (showing no fluorescence on the head, with or without a bright equatorial band).

4.8. Statistical Analysis

Differences between the groups in motility, nitric oxide levels, viability, CTC staining and NOS immunotypes were analyzed by means of the chi-square test. Differences in NOS expression profiles evaluated by Western blot were analyzed by ANOVA, followed by the Bonferroni post hoc test after evaluation of the data distribution by the Kolmogorov–Smirnov test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 (v. 5.03; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Author Contributions: Conceptualization, R.P.-P., A.C., J.Á.C.-P. and T.M.-B.; methodology, S.M.-J., M.C.-S. and S.C.; formal analysis, S.M.-J., S.C. and A.C.; investigation, S.M.-J., M.C.-S., S.C., R.P.-P. and A.C.; data curation, S.M.-J., S.C., R.P.-P. and A.C.; writing—original draft preparation, S.M.-J.; writing—review and editing, R.P.-P., A.C. and T.M.-B.; supervision, R.P.-P. and A.C.; project administration, R.P.-P. and funding acquisition, R.P.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by CICYT AGL-2017-83799-R and DGA A07 17R. S.M.-J. has a predoctoral contract from the Diputación General de Aragón (DGA).

Acknowledgments: The authors would like to acknowledge the use of Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI (Universidad de Zaragoza), ANGRA for supplying the sires and S. Morales for the collection of semen samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Appendix A

Sperm viability, evaluated by CFDA/PI staining and assessed by flow cytometry. No significant differences between groups were found.

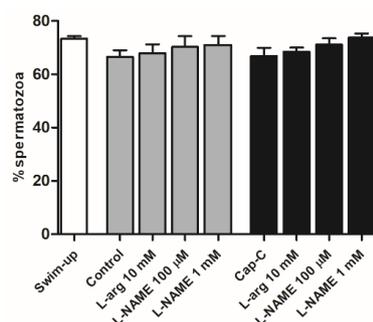


Figure A1. Percentage of viable spermatozoa before (swim-up, white bars) and after in vitro capacitation without (control, grey bars) and with cAMP-elevating agents (Cap-C, black bars) and with L-arginine (L-arg, 10 mM) or L-NAME (100 μM or 1 mM) (n = 7).

References

- Hellstrom, W.J.G.; Bell, M.; Wang, R.; Sikka, S.C. Effects of sodium nitroprusside on sperm motility, viability and lipid peroxidation. *Fertil. Steril.* **1994**, *61*, 1117–1122. [[CrossRef](#)]
- Buzadzic, B.; Vucetic, M.; Jankovic, A.; Stancic, A.; Korac, A.; Korac, B.; Otasevic, V. New insights into male (in)fertility: The importance of NO. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 1455–1467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lewis, S.E.; Donnelly, E.T.; Sterling, E.S.; Kennedy, M.S.; Thompson, W.; Chakravarthy, U. Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: Evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol. Hum. Reprod.* **1996**, *2*, 873–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yeoman, R.R.; Jones, W.D.; Rizk, B.M. Evidence for nitric oxide regulation of hamster sperm hyperactivation. *J. Androl.* **1998**, *19*, 58–64. [[PubMed](#)]
- De Lamirande, E.; Lamothe, G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46*, 502–510. [[CrossRef](#)]
- Zini, A.; De Lamirande, E.; Gagnon, C. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. *J. Androl.* **1995**, *16*, 424–431.
- Leal, A.C.; Caldas-Bussiere, M.C.; Carvalho, C.S.; Viana, K.S.; Quirino, C.R. Role of nitric oxide on quality of freshly ejaculated bull spermatozoa during heparin-induced in vitro capacitation. *Anim. Reprod. Sci.* **2009**, *116*, 38–49. [[CrossRef](#)]
- Herrero, M.B.; De Lamirande, E.; Gagnon, C. Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro. *Biol. Reprod.* **1999**, *61*, 575–581. [[CrossRef](#)]
- Aquila, S.; Giordano, F.; Guido, C.; Rago, V.; Carpino, A. Nitric oxide involvement in the acrosome reaction triggered by leptin in pig sperm. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2011**, *9*, 133. [[CrossRef](#)]
- Herrero, M.B.; Gagnon, C. Nitric oxide: A novel mediator of sperm function. *J. Androl.* **2001**, *22*, 349–356.
- Roessner, C.; Paasch, U.; Glander, H.J.; Grunewald, S. Activity of nitric oxide synthase in mature and immature human spermatozoa. *Andrologia* **2010**, *42*, 132–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Förstermann, U.; Gorsky, L.D.; Pollock, J.S.; Ishii, K.; Schmidt, H.H.; Heller, M.; Murad, F. Hormone-induced biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide-like material in N1E-115 neuroblastoma cells requires calcium and calmodulin. *Mol. Pharmacol.* **1990**, *38*, 7–13. [[PubMed](#)]

13. Cho, H.J.; Xie, Q.W.; Calaycay, J.; Mumford, R.A.; Swiderek, K.M.; Lee, T.D.; Nathan, C. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J. Exp. Med.* **1992**, *176*, 599–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Alderton, W.K.; Cooper, C.E.; Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **2001**, *357*, 593–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Buzadzic, B.; Korac, A.; Petrovic, V.; Korac, B. Redox regulation of brown adipocytes: Molecular and cellular targets in tissue remodeling. *Acta Physiol. Pharmacol. Serb.* **2006**, *42*, 141–159.
16. Moncada, S.; Higgs, E.A. Endogenous nitric oxide: Physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Investig.* **1991**, *21*, 361–374. [[CrossRef](#)]
17. Francavilla, F.; Santucci, R.; Macerola, B.; Ruvolo, G.; Romano, R. Nitric oxide synthase inhibition in human sperm affects sperm-oocyte fusion but not zona pellucida binding. *Biol. Reprod.* **2000**, *63*, 425–429. [[CrossRef](#)]
18. O'Bryan, M.K.; Zini, A.; Cheng, C.Y.; Schlegel, P.N. Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: Correlation with sperm motility. *Fertil. Steril.* **1998**, *70*, 1143–1147. [[CrossRef](#)]
19. Revelli, A.; Soldati, G.; Costamagna, C.; Pellerey, O.; Aldieri, E.; Massobrio, M.; Bosia, A.; Ghigo, D. Follicular fluid proteins stimulate nitric oxide (NO) synthesis in human sperm: A possible role for NO in acrosomal reaction. *J. Cell. Physiol.* **1999**, *178*, 85–92. [[CrossRef](#)]
20. Meiser, H.; Schulz, R. Detection and localization of two constitutive NOS isoforms in bull spermatozoa. *Anat. Histol. Embryol.* **2003**, *32*, 321–325. [[CrossRef](#)]
21. O'Flaherty, C.; Rodriguez, P.; Srivastava, S. L-Arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Gen. Subj.* **2004**, *1674*, 215–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Herrero, M.B.; Perez Martinez, S.; Viggiano, J.M.; Polak, J.M.; De Gimeno, M.F. Localization by indirect immunofluorescence of nitric oxide synthase in mouse and human spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* **1996**, *8*, 931–934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bittman, E.L.; Dempsey, R.J.; Karsch, F.J. Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. *Endocrinology* **1983**, *113*, 2276–2283. [[CrossRef](#)]
24. Gonzalez-Arto, M.; Hamilton, T.R.; Gallego, M.; Gaspar-Torrubia, E.; Aguilar, D.; Serrano-Blesa, E.; Abecia, J.A.; Perez-Pe, R.; Muino-Blanco, T.; Cebrian-Perez, J.A.; et al. Evidence of melatonin synthesis in the ram reproductive tract. *Andrology* **2016**, *4*, 163–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Casao, A.; Cebrian, I.; Asumpcao, M.E.; Perez-Pe, R.; Abecia, J.A.; Forcada, F.; Cebrian-Perez, J.A.; Muino-Blanco, T. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2010**, *8*, 59. [[CrossRef](#)]
26. Brzezinski, A.; Seibel, M.M.; Lynch, H.J.; Deng, M.H.; Wurtman, R.J. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1987**, *64*, 865–867. [[CrossRef](#)]
27. Casao, A.; Mendoza, N.; Perez-Pe, R.; Grasa, P.; Abecia, J.A.; Forcada, F.; Cebrian-Perez, J.A.; Muino-Blanco, T. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *J. Pineal Res.* **2010**, *48*, 39–46. [[CrossRef](#)]
28. Du Plessis, S.S.; Hagenaar, K.; Lampiao, F. The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. *Andrologia* **2010**, *42*, 112–116. [[CrossRef](#)]
29. Espino, J.; Ortiz, A.; Bejarano, I.; Lozano, G.M.; Monllor, F.; Garcia, J.F.; Rodriguez, A.B.; Pariente, J.A. Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor- and extracellular signal-regulated kinase-mediated pathways. *Fertil. Steril.* **2011**, *95*, 2290–2296. [[CrossRef](#)]
30. Jang, H.Y.; Kim, Y.H.; Kim, B.W.; Park, I.C.; Cheong, H.T.; Kim, J.T.; Park, C.K.; Kong, H.S.; Lee, H.K.; Yang, B.K. Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Reprod. Domest. Anim.* **2010**, *45*, 943–950. [[CrossRef](#)]
31. Rao, M.V.; Gangadharan, B. Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. *Toxicol. In Vitro* **2008**, *22*, 935–942. [[CrossRef](#)]
32. Aitken, R.J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol. Reprod. Dev.* **2017**, *84*, 1039–1052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Aydogan, S.; Yerer, M.B.; Goktas, A. Melatonin and nitric oxide. *J. Endocrinol. Investig.* **2006**, *29*, 281–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Kim, J.T.; Jang, H.Y.; Park, C.K.; Cheong, H.T.; Park, I.C.; Yang, B.K. Melatonin attenuates nitric oxide induced oxidative stress on viability and gene expression in bovine oviduct epithelial cells, and subsequently increases development of bovine IVM/IVF embryos. *Asian Australas J. Anim. Sci.* **2011**, *24*, 190–197. [[CrossRef](#)]
35. Zhang, S.; Li, W.; Gao, Q.; Wei, T. Effect of melatonin on the generation of nitric oxide in murine macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *501*, 25–30. [[CrossRef](#)]
36. Staicu, F.D.; Carmen, M.P. Nitric oxide: Key features in spermatozoa. In *Nitric Oxide Synthase—Simple Enzyme-Complex Roles*; Saravi, S., Ed.; IntechOpen: Rijeka, Croatia, 2017; pp. 137–154.
37. Heeba, G.H.; Hamza, A.A. Rosuvastatin ameliorates diabetes-induced reproductive damage via suppression of oxidative stress, inflammatory and apoptotic pathways in male rats. *Life Sci.* **2015**, *141*, 13–19. [[CrossRef](#)]
38. Nathan, C.F.; Hibbs, J.B., Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* **1991**, *3*, 65–70. [[CrossRef](#)]
39. Rochette, L.; Zeller, M.; Cottin, Y.; Vergely, C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 2709–2729. [[CrossRef](#)]
40. Staicu, F.D.; Lopez-Ubeda, R.; Romero-Aguirregomez-corta, J.; Martinez-Soto, J.C.; Matas Parra, C. Regulation of boar sperm functionality by the nitric oxide synthase/nitric oxide system. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2019**, *36*, 1721–1736. [[CrossRef](#)]
41. Hou, M.-L.; Huang, S.-Y.; Lai, Y.-K.; Lee, W.-C. Geldanamycin augments nitric oxide production and promotes capacitation in boar spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* **2008**, *104*, 56–68. [[CrossRef](#)]
42. Funahashi, H. Induction of capacitation and the acrosome reaction of boar spermatozoa by L-arginine and nitric oxide synthesis associated with the anion transport system. *Reproduction* **2002**, *124*, 857–864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Rodriguez, P.C.; O’Flaherty, C.M.; Beconi, M.T.; Beorlegui, N.B. Nitric oxide induces acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia* **2005**, *37*, 166–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Roy, S.C.; Atreja, S.K. Tyrosine phosphorylation of a 38-kDa capacitation-associated buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm protein is induced by L-arginine and regulated through a cAMP/PKA-independent pathway. *Int. J. Androl.* **2008**, *31*, 12–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Keller, D.W.; Polakoski, K.L. L-arginine stimulation of human sperm motility in vitro. *Biol. Reprod.* **1975**, *13*, 154–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Hassanpour, H.; Mirshokrai, P.; Shirazi, A.; Aminian, A. Effect of nitric oxide on ram sperm motility in vitro. *Pak. J. Biol. Sci.* **2007**, *10*, 2374–2378. [[CrossRef](#)]
47. Ratnasooriya, W.D.; Dharmasiri, M.G. L-arginine, the substrate of nitric oxide synthase, inhibits fertility of male rats. *Asian J. Androl.* **2001**, *3*, 97–103.
48. Rosselli, M.; Dubey, R.K.; Imthurn, B.; Macas, E.; Keller, P.J. Effects of nitric oxide on human spermatozoa: Evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Hum. Reprod.* **1995**, *10*, 1786–1790. [[CrossRef](#)]
49. De Andrade, A.F.C.; Arruda, R.P.; Torres, M.A.; Pieri, N.C.G.; Leite, T.G.; Celeghini, E.C.C.; Oliveira, L.Z.; Gardes, T.P.; Bussiere, M.C.C.; Silva, D.F. Nitric oxide in frozen-thawed equine sperm: Effects on motility, membrane integrity and sperm capacitation. *Anim. Reprod. Sci.* **2018**, *195*, 176–184. [[CrossRef](#)]
50. Kameshwari, D.B.; Siva, A.B.; Shivaji, S. Inhibition of in vitro capacitation of hamster spermatozoa by nitric oxide synthase inhibitors. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-Grand)* **2003**, *49*, 421–428.
51. Ortiz, A.; Espino, J.; Bejarano, I.; Lozano, G.M.; Monllor, F.; Garcia, J.F.; Pariente, J.A.; Rodriguez, A.B. High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility. *J. Pineal Res.* **2011**, *50*, 132–139. [[CrossRef](#)]
52. Gimeno-Martos, S.; Casao, A.; Yeste, M.; Cebrian-Perez, J.A.; Muino-Blanco, T.; Perez-Pe, R. Melatonin reduces cAMP-stimulated capacitation of ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* **2019**, *31*, 420–431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ollero, M.; Muino-Blanco, T.; Lopez-Perez, M.J.; Cebrian-Perez, J.A. Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *Int. J. Androl.* **1996**, *19*, 287–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. García-López, N.; Ollero, M.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma. *Theriogenology* **1996**, *46*, 141–151. [[CrossRef](#)]
55. Parrish, J.J.; Susko-Parrish, J.; Winer, M.A.; First, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* **1988**, *38*, 1171–1180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

56. Colas, C.; James, P.; Howes, L.; Jones, R.; Cebrian-Perez, J.A.; Muino-Blanco, T. Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation. *Reprod. Fertil. Dev.* **2008**, *20*, 649–658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Grasa, P.; Cebrian-Perez, J.A.; Muino-Blanco, T. Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reproduction* **2006**, *132*, 721–732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. [[CrossRef](#)]
59. Harrison, R.A.; Vickers, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* **1990**, *88*, 343–352. [[CrossRef](#)]
60. Lampiao, F.; Strijdom, H.; Du Plessis, S.S. Direct nitric oxide measurement in human spermatozoa: Flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *Int. J. Androl.* **2006**, *29*, 564–567. [[CrossRef](#)]
61. Gillan, L.; Evans, G.; Maxwell, W.M. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* **1997**, *9*, 481–487. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5.4. ARTÍCULO 4

Effect of melatonin and nitric oxide on capacitation and apoptotic changes induced by EGF in ram sperm

1 **Effect of melatonin and nitric oxide on capacitation and**
2 **apoptotic changes induced by EGF in ram sperm**

3 Sara Miguel-Jiménez¹, Melissa Carvajal-Serna¹, Victoria Peña-Delgado¹, Adriana
4 Casao¹, Rosaura Pérez-Pe^{1*}.

5 ¹Department of Biochemistry and Molecular and Cell Biology, Faculty of Veterinary
6 Sciences, Institute of Environmental Sciences of Aragón (IUCA), University of Zaragoza;
7 saramiguel@unizar.es (S.M.-J.); mcarvajals@unizar.edu.es (M.C.-S.);
8 vpdelgado@unizar.es (V. P.-D.); adriana@unizar.es (A.C.); rosperez@unizar.es (R. P.-P.)

9 ***Corresponding author:**

10 Rosaura Pérez-Pe. rosperez@unizar.es
11 Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain
12

13 **Abstract**

14 **Context:** Apart from the canonical cAMP-PKA pathway, ram sperm capacitation can be
15 achieved by the MAPK ERK1/2 signalling cascade, activated by the epidermal growth
16 factor (EGF).

17 **Aims:** This study aims to investigate the effect of melatonin and nitric oxide (NO[•]) on
18 capacitation and apoptotic-like changes in EGF-capacitated ram spermatozoa.

19 **Methods:** In vitro capacitation was induced by EGF in absence or presence of melatonin
20 (100 pM or 1 μM). Also, a NO[•] precursor, L-arginine, or a NOS inhibitor, L-NAME,
21 were added to capacitation media to study the interaction of NO[•] and melatonin during
22 EGF-capacitation. Sperm functionality parameters (motility, viability, capacitation state),
23 apoptotic markers (caspase activation and DNA damage), NO[•] levels, and phosphorylated
24 JNK and p38 (assessed by Western blot), were evaluated in swim-up and capacitated
25 samples with EGF.

26 **Key results:** Nitric oxide levels and the apoptotic-related markers raised after EGF
27 incubation. Melatonin had a bimodal role on sperm EGF-capacitation, preventing it at
28 high concentration and promoting acrosome reaction at low concentration, but neither of
29 the two concentrations avoided the increase in apoptotic-like markers or NO[•] levels.
30 However, melatonin at 1 μM prevented the activation of JNK.

31 **Conclusions:** Nitric oxide metabolism does not seem to modulate the apoptosis-like
32 events in ram spermatozoa. Melatonin at 1 μM prevents ram sperm capacitation induced
33 by EGF, independently from nitric oxide metabolism, and it could be exerted by limiting
34 the JNK MAPK activation.

35 **Implications:** This study should improve our understanding of the biochemical
36 mechanisms involved in sperm capacitation, and ultimately, fertility.

37
38 **Keywords:** ram spermatozoa, sperm capacitation, apoptosis, melatonin, epidermal
39 growth factor, nitric oxide, oxidative stress, MAP kinases

40

41 **1. Introduction**

42 In vitro ram sperm capacitation, apart from the canonical cAMP/PKA pathway (Grasa *et al.*
43 *al.* 2006; Colas *et al.* 2008), can be achieved by the binding of the epidermal growth factor
44 to its receptor (EGF/EGFR pathway) (Luna *et al.* 2012). This pathway activates the
45 mitogen-activated protein kinase (MAPK ERK1/2) signalling cascade and seems to share
46 molecular signalling pathways with apoptosis through the activation of JNK and p38
47 MAPKs (Luna *et al.* 2017).

48 Our previous studies have reported a bimodal action of melatonin on ram sperm in vitro
49 capacitation, promoting it at picomolar concentration and preventing it at micromolar
50 level, as well as its protective role against apoptosis and oxidative stress (Casao *et al.*

51 2010; Gimeno-Martos *et al.* 2019; Miguel-Jiménez *et al.* 2021). Du Plessis *et al.* (2010)
52 already proved the scavenging effects of melatonin on nitric oxide (NO \cdot) and other
53 oxygen species in human spermatozoa, and a recent study proved its modulating effect
54 on sperm capacitation and oxidative stress in bull spermatozoa (Fernández-Alegre *et al.*
55 2020). However, there are no studies about the effect of melatonin on EGF-induced ram
56 sperm capacitation.

57 Nitric oxide is shown to have an antiapoptotic role in spermatozoa to NO \cdot (Roessner *et al.*
58 *al.* 2010), along with effects on sperm motility (Hellstrom *et al.* 1994; Donnelly *et al.*
59 1997; O'Bryan *et al.* 1998), viability (Buzadzic *et al.* 2015), hyperactivation (Lewis *et al.*
60 1996; Yeoman *et al.* 1998), capacitation (Zini *et al.* 1995; de Lamirande and Lamothe
61 2009; Tosti and Ménéz 2016), acrosome reaction (Revelli *et al.* 2001; Herrero *et al.*
62 2003) and zona pellucida-binding (Sengoku *et al.* 1998). One of the possible mechanisms
63 of action proposed for NO \cdot on spermatozoa is the interaction with other signalling
64 molecules, such as MAPK, through the extracellular signal-regulated kinase (ERK)
65 pathway (reviewed by (Staicu and Matás 2017)).

66 We recently demonstrated the presence in ram spermatozoa of the three isoforms of the
67 enzyme nitric oxide synthase (NOS), which catalyses NO \cdot production (Miguel-Jimenez
68 *et al.* 2020). Furthermore, these previous results also proved that NO \cdot plays a role in the
69 ram sperm capacitation induced by cAMP-elevating agents (cAMP/PKA pathway), given
70 that the localisation of some NOS isoforms changes and the levels of NO \cdot increase after
71 this process. Also, the induction of NO \cdot synthesis by adding L-arginine causes an
72 increment in the percentage of acrosome-reacted spermatozoa. However, although
73 melatonin modifies the localisation of NOS isoforms in capacitating conditions with high-
74 cAMP in ram sperm, it does not alter NO \cdot levels. Thus, the effect produced by this
75 hormone on ram sperm capacitation induced by cAMP does not seem to be mediated

76 through NO \cdot metabolism. However, we do not know if melatonin could modulate the
77 EGF-induced capacitation on ram spermatozoa through nitric oxide.

78 Considering all this background, we aimed to determine the influence of melatonin at two
79 concentrations, due to the dose-dependent effects that it has on ram spermatozoa, and
80 NO \cdot on EGF-mediated ram sperm capacitation and their effect on apoptotic markers and
81 p38 and JNK kinases activation during this process.

82 **2. Materials and Methods**

83 Otherwise stated, all reagents were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

84 *2.1. Semen Collection and Processing*

85 Semen from nine *Rasa Aragonesa* rams (2–4 years old) was collected with the aid of an
86 artificial vagina. All the rams belonged to the Rasa Aragonesa National Breeding
87 Association (ANGRA, Zaragoza, Spain) and were kept at the Experimental Farm of the
88 Veterinary School of the University of Zaragoza under the same nutritional conditions.
89 All experimental procedures were performed under the project license PI39/17 approved
90 by the University of Zaragoza Ethics Committee for Animal Experiments (approval date:
91 24 May 2017), following the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which
92 meets the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for
93 experimental and other scientific purposes.

94 Two successive ejaculates were collected every two days, and second ejaculates from 4
95 or 5 rams were pooled and processed together to avoid individual differences (Ollero *et*
96 *al.* 1996). Ejaculates were kept at 37 °C until analysis.

97 In order to obtain a plasma-free sperm population, a dextran/swim-up procedure (García-
98 López *et al.* 1996) was performed in a medium with the following composition: 200 mM

99 sucrose, 50 mM NaCl, 2.7 mM CaCl₂, 18.6 mM sodium lactate, 21 mM HEPES, 10 mM
100 KCl, 2.8 mM glucose, 0.4 mM MgSO₄, 0.3 mM sodium pyruvate, 0.3 mM K₂HPO₄, 5
101 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 30 mg/mL dextran, 1.5 IU/mL penicillin and 1.5
102 mg/mL streptomycin, pH 6.5. Four supernatants were obtained, the first one was
103 discarded to avoid seminal plasma contamination, and the three remaining ones were
104 pooled and named “swim-up samples”.

105 Sperm concentration was calculated in duplicate using a Neubauer chamber (Marienfeld,
106 Lauda-Königshofen, Germany).

107 2.2. *In Vitro Capacitation*

108 Swim-up-selected spermatozoa, in aliquots of 1.6×10^8 cells/mL, were incubated for 3 h
109 at 39 °C in a humidified incubator with 5% CO₂ in the air. Incubations were performed
110 in complete TALP medium (Parrish et al., 1988) (100 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 25 mM
111 NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 21.6 mM Na lactate, 3 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂, 10 mM
112 HEPES, 1 mM Na pyruvate, 5 mM glucose and 5 mg/mL BSA, pH 7.3) supplemented
113 with epidermal growth factor (EGF) (Abcam, Cambridge, UK) at 100 nM (Cap-EGF
114 samples) (Luna *et al.* 2012).

115 To further investigate the role of NO[•] during in vitro capacitation, NG-nitro-L-arginine
116 methyl ester (L-NAME), a nonselective NO[•] synthase inhibitor, was added to the Cap-
117 EGF samples at 1 mM, whereas L-arginine (L-arg), a NOS substrate, was used at 10 mM
118 concentration, based on the previous work of Hasanpour (2007) and our previous results
119 in ram spermatozoa (Miguel-Jimenez *et al.* 2020).

120 Melatonin was solubilized in dimethyl sulphoxide (DMSO) and phosphate-buffered
121 saline (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄ and 1.76 KH₂PO₄, pH 7.4)
122 and added to capacitation media at a final concentration of 1 µM or 100 pM on the basis

123 of our previous studies (Casao *et al.* 2010; Gimeno-Martos *et al.* 2019; Miguel-Jimenez
124 *et al.* 2020). The final concentration of DMSO in all melatonin samples was 0.1%. Same
125 DMSO concentration was included in the control samples (without melatonin) incubated
126 in capacitating conditions.

127 The experimental groups were defined as follows: swim-up (spermatozoa selected by the
128 dextran/swim-up method before inducing in vitro capacitation) and Cap-EGF
129 (spermatozoa incubated under capacitating conditions in TALP medium with 100 nM
130 EGF when no compounds were added). The addition of L-arginine, L-NAME or/and
131 melatonin to the Cap-EGF samples was indicated when necessary. Each experimental set
132 was replicated 5 times.

133 *2.3. Sperm Motility Evaluation*

134 Total and progressive motility were evaluated using the motility module of the
135 OpenCASA, a free and open-source software that we recently developed (Alquezar-Baeta
136 *et al.* 2019). Two drops of 2 μL of each sample, diluted to a final concentration of 3×10^7
137 cells/mL, were placed in a Makler counting chamber (Sefi-Medical Instruments, Haifa,
138 Israel) pre-warmed and maintained at 37 °C during all the analyses by a heated slide
139 holder. Spermatozoa were recorded with a video camera (Basler acA1920; Basler Vision
140 Components, Ahrensburg, Germany) mounted on a microscope (Nikon Eclipse 50i,
141 Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japan) equipped with a 10x negative-phase contrast lens.
142 Four different fields were recorded in each drop, and the recorded videos were evaluated
143 with the following settings: 60 frames per second, 120 frames, 800 x 600 pixel image
144 resolution, 10 μm^2 minimum cell size, 100 μm^2 maximum cell size, STR (straightness
145 coefficient) >80% and VAP (mean velocity) >90%, 10 $\mu\text{m}/\text{s}$ minimum VCL (curvilinear
146 velocity), 100 $\mu\text{m}/\text{s}$ VCL lower threshold, 200 $\mu\text{m}/\text{s}$ VCL upper threshold, 30 frames
147 minimum track length and 20 μm maximum displacement between frames.

148 *2.4. Determination of Capacitation Status*

149 Sperm capacitation state was evaluated by the chlortetracycline (CTC) assay (Ward and
150 Storey 1984), previously validated in ram spermatozoa (Grasa *et al.* 2006). A CTC
151 solution (750 μ M; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) was prepared in a buffer
152 containing 20 mM Tris, 130 mM NaCl and 5 μ M cysteine, pH 7.8, and passed through a
153 0.22 μ m filter. After that, 20 μ L of CTC solution was added to 18 μ L of each sperm
154 sample, fixed with 5 μ L of 1.25% (w/v) paraformaldehyde in 0.5 M Tris-HCl (pH 7.8)
155 and incubated at 4 °C in the dark for 30 min. Six microliters of the stained sample were
156 placed onto a glass slide and mixed with 2 μ L of 0.22 M 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
157 (DABCO) in glycerol:PBS (9:1 v/v). The samples were covered with 24 \times 60 mm
158 coverslips, sealed with transparent enamel and stored in the dark at -20 °C until
159 evaluation. The samples were examined using a Nikon Eclipse E-400 microscope (Nikon
160 Corporation, Kanagawa, Japan) under epifluorescence illumination with a V-2A filter,
161 and at least 200 spermatozoa were scored per sample. Three sperm patterns were
162 identified (Gillan *et al.* 1997): non-capacitated (even distribution of fluorescence on the
163 head, with or without a bright equatorial band), capacitated (with fluorescence in the
164 acrosome) and acrosome-reacted cells (showing no fluorescence on the head, with or
165 without a bright equatorial band).

166 *2.5. Flow Cytometry Analysis*

167 All the measurements were performed on a Beckman Coulter FC 500 flow cytometer
168 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) equipped with two excitation lasers (488 nm air-
169 cooled Argon ion laser and 633 nm Red Solid-state laser); five absorbance filters (FL1-
170 525, FL2-575, FL3-610, FL4-675 and FL5-755; \pm 5 nm bandpass filters) and CXP
171 software. A minimum of 20,000 events were evaluated in each sample. The sperm
172 population was identified for further analysis on the basis of its specific forward (FS) and

173 side-scatter (SS) properties; thus, other events were excluded. A flow rate stabilized at
174 200–300 cells/s was used.

175 2.5.1. *Sperm Membrane Integrity*

176 Sperm viability, considered the integrity of the cell plasma membrane, was assessed by
177 adding 3 μL of 1 mM carboxyfluorescein diacetate (CFDA), 1.5 mM propidium iodide
178 (PI) and 5 μL of formaldehyde (0.5% (v/v) in water) to a final concentration of 5×10^6
179 cells/mL in a 300 μL volume, based on a modification of the procedure described by
180 Harrison and Vickers (Harrison and Vickers 1990). Samples were incubated at 37 °C in
181 darkness for 15 min. For the sperm viability analysis, the Argon laser and filters FL1-525
182 and FL4-675 nm were used to avoid overlapping. The monitored parameters were FS log
183 and SS log (for sperm identification), FL1 log (CFDA) and FL4 log (PI). The percentage
184 of viable spermatozoa (PI-/CFDA+) was evaluated.

185 2.5.2. *Intracellular Nitric Oxide Levels*

186 Intracellular NO \cdot levels were determined using 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-
187 2; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). DAF-2 is a cell-permeable probe that, in
188 the presence of NO \cdot , is metabolized to the highly fluorescent triazolofluorescein (DAF-
189 2T) (Lampiao *et al.* 2006). Samples of 5×10^6 cells/mL were stained with 10 μM DAF-
190 2 and 1.5 mM PI, incubated at 37 °C in darkness for 15 min and analysed by flow
191 cytometry using the argon laser and filters FL1-525 and FL4-675 nm. The monitored
192 parameters were FS log, SS log, FL1 log (DAF-2) and FL4 log (PI). Three populations
193 were distinguished: viable cells with high NO \cdot production (PI-/DAF-2+), viable cells with
194 low NO \cdot production (PI-/DAF-2-) and nonviable cells (PI+/DAF-2-).

195 2.5.3. *Caspases activation*

196 Active caspase-3 and -7 were detected with the Vybrant™ FAM Caspase-3 and -7 Assay
197 Kit for flow cytometry (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States). Samples

198 of 300 μ L (6×10^6 cells) were loaded with 3 μ L of the 30x FAM-Peptide-FMK and were
199 incubated at 37°C and 5% CO₂ in the dark for 60 min. After washing twice with 300 μ L
200 of washing buffer (supplied with the kit) by centrifuging at $600 \times g$ for 8 min at RT, the
201 obtained pellet was resuspended with 300 μ L of washing buffer, and cells were evaluated
202 by flow cytometry. Monitored parameters were FS log and SS log to identify sperm cells,
203 and FL1 (FITC-VADFMK). Percentages of caspase+ spermatozoa were represented.

204 2.5.4. DNA fragmentation

205 Apoptotic-like DNA fragmentation in ram spermatozoa was evaluated by the TUNEL
206 (terminal transferase-mediated dUDP nick end-labelling) assay using an In Situ Cell
207 Death Detection Kit with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled dUTP (Roche,
208 Mannheim, Germany) (Li and Darzynkiewicz 1995). After fixation of sperm samples (4
209 $\times 10^7$ cells/ml) with 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature (RT) for 1 h, cells
210 were washed with 100 μ L of PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in 0.1%
211 sodium citrate. After washing with PBS, the elongation reaction was performed by
212 incubating the obtained pellet with 50 μ L of labelling solution that contained the TdT
213 enzyme and dUTP for 1 h at 37 °C in the dark. For each experimental set, a negative
214 control was prepared by omitting TdT from the reaction mixture. Two subsequent washes
215 with PBS at $600 \times g$ for 10 min at RT were performed to stop the reaction, and flow
216 cytometry analysis was carried out. Positive controls were simultaneously prepared by an
217 additional treatment with 10 IU DNase I for 10 min at 15 °C–25 °C before the elongation
218 reaction. Monitored parameters were FS log, SS log, and FL1 (TUNEL). Percentages of
219 DNA-damaged spermatozoa (TUNEL+) were represented.

220

221 2.6.SDS-PAGE and immunoblotting

222 To investigate the role of melatonin in the activation of certain MAPKs, Western blot
223 analysis were performed to detect the active (phosphorylated) forms of JNK and p38
224 proteins. Sperm proteins were extracted from swim-up-selected and EGF-capacitated
225 spermatozoa, as previously described by Colas et al. (Colas *et al.* 2008). Semen was
226 diluted in PBS (1.6×10^8 cells/mL) and centrifuged at $900 \times g$ for 5 min. The supernatant
227 was discarded, and the pellet was resuspended in 200 μ L of extraction sample buffer (125
228 mM Tris-HCl (pH 6.8) and 2% SDS (w/v)) with a 10% protease inhibitors cocktail
229 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; reference P8340). After incubation at 100 °C in a
230 sand bath for 5 min, samples were centrifuged again at $7500 \times g$ for 5 min at 4 °C. The
231 supernatant was recovered, and β -mercaptoethanol, glycerol and bromophenol blue (in
232 10% glycerol) were added to final concentrations of 5%, 1% and 0.002 % (v/v),
233 respectively. Lysates were stored at -20 °C.

234 Sperm extracted proteins (25 μ L, 0.5-1 mg/mL) were separated in one dimension by 10%
235 sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli
236 1970) and transferred onto a PVDF membrane using a transfer unit (Trans-Blot Turbo
237 Transfer System, Bio-Rad, Hercules, CA, United States). A positive antigen control
238 consisting of 10 μ g of an EGF-stimulated A431 cell lysate (Millipore; Merck Millipore,
239 Darmstadt, Germany) was added. Nonspecific sites on the PVDF membrane were
240 blocked with 5% BSA (w/v) in PBS for 4 h. To identify the phosphorylated forms of JNK
241 and p38 MAPKs, membranes were incubated overnight at 4 °C with anti-phospho-JNK
242 (Thr183/Tyr185, Thr221/Tyr223) (Millipore Cat# 07-175, RRID:AB_310412), and anti-
243 phospho-p38 α (Thr180/Tyr182) (Millipore Cat# 05-1059, RRID:AB_1977402) rabbit
244 primary antibodies, respectively, whereas a mouse anti-tubulin antibody (Santa Cruz
245 Biotechnology, Dallas, TX, USA, Cat#sc-8035, RRID: AB_628408) was used as a

246 loading control. All antibodies were diluted 1/1000 in 0.1% (v/v) Tween-20 in PBS
247 containing 1% (w/v) BSA. After extensive washing with 0.1% (v/v) Tween-20 PBS,
248 membranes were incubated for 75 min at room temperature with the secondary antibodies
249 donkey anti-rabbit (IRDye 680RD donkey anti-rabbit IgG antibody, LI-COR
250 Biosciences, Lincoln, NE, USA, Cat# 926-68073, RRID: AB_10954442) and donkey
251 anti-mouse (RDye 800CW donkey anti-mouse IgG antibody, LI-COR Biosciences Cat#
252 926-32212, RRID: AB_621847) diluted 1/15,000 in 0.1% (v/v) Tween-20 PBS
253 containing 1% (v/v) BSA. After extensive washing, membranes were scanned using the
254 OdysseyCLx Imaging System (LI-COR Biosciences). Western blot images were
255 quantified using Odyssey Clx Infrared Imaging System software (Li-COR Biosciences)
256 to determine the relative intensity of the JNK and p38 protein bands normalized to the
257 tubulin control.

258 *2.7. Statistical Analysis*

259 Differences between the groups in motility, viability, CTC staining, NO[•] levels, and
260 apoptotic-like markers (caspase activation and DNA damage) were analysed by means of
261 the chi-square test. After evaluating the data distribution of MAPKs expression profiles
262 by the Shapiro-Wilk test, differences in phospho-JNK and phospho-p38 were analysed
263 by Kruskal-Wallis non-parametric test, followed by Dunn's post hoc test. A *p* value of <
264 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using
265 GraphPad Prism 8 (v. 8.01; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

266

267

268

269

270 3. Results

271 3.1. *Effect of L-arginine, L-NAME and melatonin on sperm motility during in vitro* 272 *capacitation*

273 Sperm motility, total and progressive, was not affected by capacitation with EGF (Figure
274 1). At any of the studied concentrations, melatonin did not cause any significant changes
275 in terms of total or progressive motility. The addition of L-arginine to EGF capacitated
276 samples decreased total motility ($p < 0.05$), and combination with melatonin did not
277 prevent it. However, L-arginine did not alter progressive motility (Figure 1 right). The
278 presence of L-NAME did not significantly affect total motility, but sperm progressivity
279 was higher than in Cap-EGF samples ($p < 0.05$), and the combination with melatonin 1
280 μM kept the high progressivity values. Nevertheless, combination of 100 pM melatonin
281 did not cause any significant effect. After evaluating other sperm kinematic parameters,
282 no significant differences between treatments were found (Supplementary material).

283 3.2. *Effect of L-arginine, L-NAME and melatonin on sperm viability during in vitro* 284 *capacitation*

285 Sperm viability, according to membrane integrity, slightly decreased after EGF-induced
286 in vitro capacitation ($p < 0.05$) (Figure 2). The combination of melatonin 100 pM with L-
287 arginine resulted in the largest decline in sperm viability ($p < 0.05$).

288 3.3. *Effect of L-arginine, L-NAME and melatonin on the capacitation status*

289 The assessment of ram sperm capacitation by CTC staining revealed an increment ($p <$
290 0.05) in the percentage of capacitated and acrosome-reacted spermatozoa under
291 capacitating conditions (Cap-EGF), in comparison to swim-up samples (Figure 3).

292 The presence of melatonin at 1 μM concentration in the EGF capacitation medium
293 significantly reduced ($p < 0.01$) sperm capacitation rate, consequently maintaining a

294 higher percentage of non-capacitated spermatozoa, similar to that existing in the swim-
295 up samples. The NOS inhibitor, L-NAME, had similar effects to melatonin 1 μ M, but the
296 combination of both treatments did not boost their individual effects. In contrast, the
297 addition of L-arginine raised significantly ($p < 0.01$) the percentage of acrosome-reacted
298 spermatozoa compared to Cap-EGF samples. When L-arginine was combined with
299 melatonin 1 μ M, acrosome reaction was significantly lower ($p < 0.01$) than in samples
300 with L-arginine only. On the other hand, the addition of melatonin 100 pM to the EGF-
301 capacitation media caused a significant ($p < 0.01$) increment in the percentage of
302 acrosome-reacted spermatozoa, reaching similar values to those provoked by L-arginine.
303 This effect was not altered by combining melatonin 100 pM with L-arginine or L-NAME.

304 *3.4. Effect of L-arginine, L-NAME and melatonin on nitric oxide levels during EGF-*
305 *induced capacitation*

306 Nitric oxide levels were assessed by flow cytometry before and after in vitro capacitation,
307 and results are shown in Figure 4. The percentage of live spermatozoa with high NO \cdot -
308 levels (DAF+/PI-) increased after in vitro capacitation induced by EGF ($p < 0.01$, Figure
309 4). The presence of melatonin 1 μ M did not significantly alter NO \cdot levels, nor did the
310 NOS inhibitor, L-NAME. However, the addition of L-arginine to the capacitation media
311 sharply increased the percentage of spermatozoa with high NO \cdot levels compared to Cap-
312 EGF samples ($p < 0.05$, Figure 4). When L-arginine was combined with melatonin 1 μ M,
313 the oxidative effect of L-arginine was diminished to a certain extent ($21 \pm 1.69\%$ in L-
314 arg vs $16.10 \pm 2.07\%$ in Mel 100 pM + L-arg, $p = 0.07$, Figure 4), and differences with
315 Cap-EGF sample also disappeared. However, when L-arginine was combined with
316 melatonin at 100 pM, NO \cdot values were not decreased.

317 *3.5. Effect of L-arginine, L-NAME and melatonin on apoptotic markers in EGF-*
318 *capacitated samples*

319 *3.5.1. Caspases activation*

320 Spermatozoa with active caspases-3 and 7 were detected by flow cytometry, and the
321 results showed a significant increase ($p < 0.001$) of caspase activation after in vitro
322 capacitation by EGF addition (Figure 5). No remarkable effects were caused by any of
323 the treatments in comparison to Cap-EGF samples ($p > 0.05$).

324 *3.5.2. DNA fragmentation*

325 Damaged DNA is another indication of apoptotic-like changes, so we evaluated DNA
326 fragmentation in ram spermatozoa by the TUNEL assay evaluated with flow cytometry.
327 Higher percentages ($p < 0.05$) of spermatozoa with fragmented DNA were observed after
328 in vitro capacitation with EGF (Figure 6). However, neither the presence of melatonin
329 nor the NOS inhibitor or the activator did affect the DNA integrity ($p > 0.05$).

330 *3.6. Effect of L-Arginine, L-NAME and melatonin on activation of JNK and p38 in*
331 *EGF- capacitated samples*

332 To determine the effect of melatonin and $\text{NO}\cdot$ on activation of JNK and p38 MAPKs in
333 EGF-capacitated samples, Western blot analysis of the phosphorylated (active) forms of
334 both proteins (Figure 7) were performed. A band of approximately 50 kDa compatible
335 with the predicted molecular weight for phospho-JNK was revealed (Figure 7A). Levels
336 of phospho-JNK sharply increased after 3 h incubation in capacitating conditions with
337 EGF ($p < 0.01$, Figure 7C). The addition of 1 μM melatonin to EGF capacitation media
338 resulted in a significant ($p < 0.05$) reduction of the phospho-JNK signal intensity
339 compared with Cap-EGF and L-arginine samples.

340 Regarding phospho-p38 MAPK, a band of approximately 40 kDa, compatible with the
341 predicted molecular weight was observed in all samples (Figure 7B). Also, p38
342 phosphorylation levels remained unchanged during in vitro capacitation.

343 4. Discussion

344 Our previous studies showed that melatonin has a dual effect on ram sperm capacitation,
345 promoting this process at picomolar concentration and avoiding it at micromolar
346 concentration. This bimodal role of melatonin was observed when ram spermatozoa were
347 in vitro capacitated in a basal medium with calcium and bicarbonate (Casao *et al.* 2010)
348 and by cAMP-elevating agents (Gimeno-Martos *et al.* 2019). The evidence of an
349 alternative way to induce capacitation in ram spermatozoa, involving EGF/EGFR and
350 MAPK pathways (Luna *et al.* 2012; Luna *et al.* 2017), made us investigate whether
351 melatonin may also have a modulating effect in these conditions. In the present study, the
352 presence of 100 nM EGF in capacitation media successfully led to sperm capacitation,
353 as Luna *et al.* (2012) had previously demonstrated. Under these conditions, we showed
354 that the addition of melatonin at micromolar concentration prevented the capacitating
355 effect of EGF, while at picomolar concentration, acrosome reaction was promoted and
356 non-capacitated spermatozoa decreased. One possible mechanism by which melatonin
357 modulates ram sperm capacitation induced by EGF could be a direct action on NO \cdot levels.

358 In spermatozoa, there must be a balance in the reactive oxygen species (ROS) levels, as
359 they are essential for sperm functionality, but an excess can be detrimental (reviewed by
360 (Aitken 2017; Dutta *et al.* 2019)). ROS comprises not only oxygen radicals but also a
361 subclass of nitrogen-containing compounds collectively known as reactive nitrogen
362 species (RNS), where NO \cdot is included. Nitric oxide is involved in sperm function,
363 including motility (Hellstrom *et al.* 1994; Lewis *et al.* 1996; O'Bryan *et al.* 1998),

364 capacitation (de Lamirande and Lamothe 2009; Tosti and Ménéz 2016), acrosome
365 reaction (Revelli *et al.* 2001; Herrero *et al.* 2003) chemotaxis (Miraglia *et al.* 2007) and
366 apoptosis (Roessner *et al.* 2010). We had already observed that NO \cdot levels increase during
367 canonical ram sperm capacitation induced by cAMP-elevating agents (Miguel-Jimenez
368 *et al.* 2020). In the present study, we showed that NO \cdot production was also increased
369 during sperm capacitation mediated by EGF. In addition, the stimulation with L-arginine
370 raised NO \cdot levels and promoted acrosome reaction in EGF-capacitated ram spermatozoa,
371 as we had already observed in canonical cAMP/PKA-mediated capacitation (Miguel-
372 Jimenez *et al.* 2020). However, the NOS inhibitor, L-NAME, did not prevent NO \cdot -
373 generation as expected. Previously, we had observed this lack of effect when ram sperm
374 capacitation was induced in TALP media, but an increment in NO \cdot levels was detected
375 when TALP was supplemented with cAMP-elevating agents (Miguel-Jimenez *et al.*
376 2020). A possible explanation could be that cAMP-elevating agents, which promote ram
377 sperm capacitation more efficiently, raised NO \cdot levels to a greater extent than the addition
378 of EGF or the TALP medium alone; thus, the L-NAME preventive effects would be more
379 evident. Surprisingly, although L-NAME did not apparently reduce NO \cdot levels in the
380 present study, it prevented the decrease in the percentage of non-capacitated spermatozoa
381 provoked by EGF, maintaining similar values than before capacitation induction, and
382 enhanced sperm progressive motility. Contradictory effects of L-NAME have been
383 reported in different species. The preventive effect of NOS inhibitors in sperm
384 capacitation and acrosome reaction has been described in human (Herrero *et al.* 1999; de
385 Lamirande and Lamothe 2009), mice (Kameshwari *et al.* 2003), boar (Aquila *et al.* 2011),
386 buffalo (Roy and Atreja 2008) and bull (O'Flaherty *et al.* 2004), whereas other authors
387 did not observe any action of this compound on capacitation (Zini *et al.* 1995; de Andrade
388 *et al.* 2018). Similarly, differing results have been published about the effects of NO \cdot on

389 sperm motility. While some authors state the beneficial effects of NO \cdot at low
390 concentration (Hellstrom *et al.* 1994; Zini *et al.* 1995; Lewis *et al.* 1996; Donnelly *et al.*
391 1997), others point to the detrimental effect on sperm movement at higher concentrations
392 (Rosselli *et al.* 1995; Weinberg *et al.* 1995; Ratnasooriya and Dharmasiri 2001;
393 Hassanpour *et al.* 2007). Our results agreed with those statements, as higher levels of
394 NO \cdot , promoted by L-arginine, reduced total motility although without affecting
395 progressivity.

396 Among the effects attributed to melatonin in sperm function, it is noteworthy its
397 antioxidant role (Jang *et al.* 2010; Ortiz *et al.* 2011; Pool *et al.* 2021; Bhalothia *et al.*
398 2022; Shayestehyekta *et al.* 2022). Particularly in ram spermatozoa, melatonin has a
399 protective role against oxidative stress, at least reducing ROS and superoxide levels
400 (Gimeno-Martos *et al.* 2019; Miguel-Jiménez *et al.* 2021; Pool *et al.* 2021; Bhalothia *et*
401 *al.* 2022). However, melatonin has no scavenging effects on NO \cdot levels in ram
402 spermatozoa capacitated with cAMP-elevating agents, despite being able to change the
403 NOS location (Miguel-Jimenez *et al.* 2020). In this work, we have demonstrated the same
404 lack of effect of melatonin on NO \cdot levels when ram spermatozoa are capacitated with
405 EGF. Nonetheless, melatonin at 1 μ M tended to reduce the NO \cdot levels raised by L-
406 arginine to similar values than in control capacitated samples. This slight antioxidant
407 effect was not observed when combining L-arginine with melatonin at 100 pM since NO \cdot
408 levels remained as high as those provoked by L-arginine alone. These contrasting results
409 may be a consequence of the observed bimodal role of this hormone on ram sperm
410 capacitation. Thus, melatonin at micromolar concentrations, which had a decapacitating
411 effect, was even able to inhibit the promoting effect of L-arginine on acrosome reaction,
412 together with a reduction of the NO \cdot levels. Conversely, 100 pM melatonin promoted
413 acrosome reaction in the same way as L-arginine did, and its presence did not modify the

414 effects of the L-Arginine, except for a slight decrease in viability. The combination of
415 100 pM melatonin with L-NAME avoided the decapacitating effect of the latter, reducing
416 the percentage of non-capacitated spermatozoa and leading to a high rate of acrosome
417 reaction. However, although acting in the same way that L-NAME, the higher
418 concentration of melatonin did not show a synergic effect in combination with it.
419 Considering these results, it seems that melatonin could modulate EGF-mediated ram
420 sperm capacitation by a direct action on NO \cdot levels because melatonin at high
421 concentration provoked the same effect as the NOS inhibitor, maintaining sperm in a non-
422 capacitated status. On the contrary, melatonin at low concentration acts similarly to the
423 NO \cdot generator, promoting acrosome reaction. The fact that melatonin did not show a
424 scavenging effect of NO \cdot levels may be due to the technical limitations of the
425 measurement, as NO \cdot is a short half-life molecule, which makes it difficult to detect
426 (Donnelly *et al.* 1997) except when high NO \cdot production was forced through L-arginine.
427 Yet, changes in the sperm capacitation state were avoided when L-arginine was combined
428 with 1 μ M melatonin.

429 One possible mechanism of action for NO \cdot in spermatozoa (reviewed by (Lopez-Ubeda
430 and Matás 2015; Staicu and Matás 2017) could be the modulation of the extracellular
431 signal-regulated kinase (ERK) pathway (reviewed by (Staicu and Matás 2017), through
432 the interaction with signalling molecules such as MAPK. JNK and p38 MAPKs are
433 activated during in vitro ram sperm capacitation with EFG and are also involved in sperm
434 apoptotic-like changes (Luna *et al.* 2017). Thus, the effect of NO \cdot and melatonin on
435 apoptotic-like markers and JNK and p38 MAPKs activation would be of great interest. In
436 the present study, the analysis of apoptotic-like markers revealed an increase in the
437 caspases activation and DNA damage after EGF mediated-capacitation, as well as the
438 activation of JNK evidenced by Western blotting, in concordance with Luna *et al.* (2017).

439 However, p38 MAPK phosphorylation showed no changes after capacitation. Concerning
440 the role that would play NO \cdot on apoptosis-like events, the sharp increase in NO \cdot levels
441 by L-arginine addition did not provoke any change in neither apoptosis markers nor JNK
442 and p38 phosphorylation. Previous studies have reported contradictory effects of NO \cdot .
443 Incremented caspase-3 activation was detected in the presence of a NO \cdot donor in boar
444 (Moran *et al.* 2008) and human spermatozoa (Lampiao *et al.* 2014), whereas Roessner *et al.*
445 (Roessner *et al.* 2010) correlated NOS activity negatively to caspase activation and
446 DNA fragmentation in human.

447 Melatonin did not cause any significant effect in caspase activation or DNA
448 fragmentation triggered by EGF-capacitation; however, at 1 μ M concentration it was able
449 to reduce JNK activation. Other studies have reported an antiapoptotic action of melatonin
450 in somatic cells (Sainz *et al.* 2003; Jou *et al.* 2007), rat testes (Guneli *et al.* 2008; Huang
451 *et al.* 2009) and spermatozoa from rabbit (Zhu *et al.* 2019), human (Zhao *et al.* 2021) and
452 ram (Casao *et al.* 2010; Pool *et al.* 2020; Pool *et al.* 2021). However, differences in the
453 treatments and incubations that lead to apoptosis in those studies (cold-shock, heat-stress
454 or different capacitating conditions), together with the species specificity, could influence
455 the melatonin ability to prevent apoptotic-like changes.

456 Summarizing the results in this paper, we have evidenced the modulating role of
457 melatonin on EGF-mediated ram sperm capacitation, preventing it at high concentration
458 and promoting acrosome reaction at low concentration. Also, we have demonstrated that
459 NO \cdot is involved in EGF-mediated capacitation since it was increased after this process,
460 and a greater rate of acrosome-reacted spermatozoa was observed after enhancing NO \cdot
461 production by L-arginine. Although melatonin at high concentration does not
462 significantly reduce the increment in the NO \cdot levels provoked by a NO \cdot generator (L-
463 arginine), it is able to avoid its effect on acrosome reaction. However, NO \cdot does not seem

464 to be involved in the apoptosis-like events nor in the activation of JNK or p38 MAPKs in
465 ram spermatozoa. Nonetheless, melatonin at high concentration is able to reduce JNK
466 activation, which seems to be more related to its decapacitating action than to an
467 antiapoptotic effect since no changes in apoptotic-like markers were observed.

468

469 **Ethics Approval**

470 The animal study was reviewed and approved by PI39/17 approved by the University of
471 Zaragoza Ethics Committee for Animal Experiments (approval date: 24 May 2017).

472 **Availability of Data and Materials**

473 The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the
474 figshere repository doi: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19780402.v1>

475 **Conflicts of Interest**

476 The authors declare no conflicts of interest that could be perceived as prejudicing the
477 impartiality of the research reported.

478 **Authors' Contributions**

479 **Sara Miguel-Jiménez:** Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation and
480 Writing-original draft preparation. **Melisa Carvajal-Serna:** Methodology and
481 Investigation. **Victoria Peña-Delgado:** Methodology and Investigation. **Adriana Casao:**
482 Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing-review and
483 editing and Supervision. **Rosaura Pérez-Pe:** Conceptualization, Investigation, Data
484 curation, Writing-review and editing, Supervision, Project administration and Funding
485 acquisition.

486 All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

487 **Declaration of Funding**

488 This research was funded by Ministerio de Economía, Industria y Competitividad
 489 (CICYT AGL-2017-83799-R) and Gobierno de Aragón (DGA A07 20R). S.M.-J. has a
 490 predoctoral contract from the Diputación General de Aragón (DGA).
 491

492 **Acknowledgments**

493 The authors would like to acknowledge the use of the Servicio General de Apoyo a la
 494 Investigación-SAI (Universidad de Zaragoza), ANGRA for supplying the sires, and the
 495 funding by Ministerio de Economía Industria y Competitividad (CICYT AGL-2017-
 496 83799-R) and Gobierno de Aragón (DGA A07 20R).

497 **5. References**

- 498 Aitken, RJ (2017) Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and
 499 pathological damage. *Molecular Reproduction and Development* **84**(10), 1039-1052
 500
- 501 Alquezar-Baeta, C, Gimeno-Martos, S, Miguel-Jimenez, S, Santolaria, P, Yaniz, J,
 502 Palacin, I, Casao, A, Cebrian-Perez, JA, Muino-Blanco, T, and Perez-Pe, R (2019)
 503 Opencasa: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis. *PLoS Comput*
 504 *Biol* **15**(1), e1006691
 505
- 506 Aquila, S, Giordano, F, Guido, C, Rago, V, and Carpino, A (2011) Nitric oxide
 507 involvement in the acrosome reaction triggered by leptin in pig sperm. *Reprod Biol*
 508 *Endocrinol* **9**, 133
 509
- 510 Bhalothia, SK, Mehta, JS, Kumar, T, Prakash, C, Talluri, TR, Pal, RS, and Kumar, A
 511 (2022) Melatonin and canthaxanthin enhances sperm viability and protect ram
 512 spermatozoa from oxidative stress during liquid storage at 4°C. *Andrologia* **54**(1), e14304
 513
- 514 Buzadzic, B, Vucetic, M, Jankovic, A, Stancic, A, Korac, A, Korac, B, and Otasevic, V
 515 (2015) New insights into male (in)fertility: The importance of no. *Br J Pharmacol* **172**(6),
 516 1455-67
 517
- 518 Casao, A, Mendoza, N, Perez-Pe, R, Grasa, P, Abecia, JA, Forcada, F, Cebrian-Perez,
 519 JA, and Muino-Blanco, T (2010) Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like
 520 changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *J Pineal Res* **48**(1), 39-46
 521
- 522 Colas, C, James, P, Howes, L, Jones, R, Cebrian-Perez, JA, and Muino-Blanco, T (2008)
 523 Cyclic-amp initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux
 524 during ram sperm capacitation. *Reprod Fertil Dev* **20**(6), 649-58
 525
- 526 de Andrade, AFC, Arruda, RP, Torres, MA, Pieri, NCG, Leite, TG, Celeghini, ECC,
 527 Oliveira, LZ, Gardes, TP, Bussiere, MCC, and Silva, DF (2018) Nitric oxide in frozen-

- 528 thawed equine sperm: Effects on motility, membrane integrity and sperm capacitation.
 529 *Anim Reprod Sci* **195**, 176-184
 530
- 531 de Lamirande, E, and Lamothe, G (2009) Reactive oxygen-induced reactive oxygen
 532 formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* **46**(4), 502-10
 533
- 534 Donnelly, ET, Lewis, SE, Thompson, W, and Chakravarthy, U (1997) Sperm nitric oxide
 535 and motility: The effects of nitric oxide synthase stimulation and inhibition. *Mol Hum*
 536 *Reprod* **3**(9), 755-62
 537
- 538 du Plessis, SS, Hagenaar, K, and Lampiao, F (2010) The in vitro effects of melatonin on
 539 human sperm function and its scavenging activities on no and ros. *Andrologia* **42**(2), 112-
 540 6
 541
- 542 Dutta, S, Majzoub, A, and Agarwal, A (2019) Oxidative stress and sperm function: A
 543 systematic review on evaluation and management. *Arab J Urol* **17**(2), 87-97
 544
- 545 Fernández-Alegre, E, Álvarez-Fernández, I, Domínguez, JC, Casao, A, and Martínez-
 546 Pastor, F (2020) Melatonin non-linearly modulates bull spermatozoa motility and
 547 physiology in capacitating and non-capacitating conditions. *Int J Mol Sci* **21**(8)
 548
- 549 García-López, N, Ollero, M, Muiño-Blanco, T, and Cebrián-Pérez, JA (1996) A dextran
 550 swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from
 551 seminal plasma. *Theriogenology* **46**(1), 141-151
 552
- 553 Gillan, L, Evans, G, and Maxwell, WM (1997) Capacitation status and fertility of fresh
 554 and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* **9**(5), 481-7
 555
- 556 Gimeno-Martos, S, Casao, A, Yeste, M, Cebrian-Perez, JA, Muino-Blanco, T, and Perez-
 557 Pe, R (2019) Melatonin reduces camp-stimulated capacitation of ram spermatozoa.
 558 *Reprod Fertil Dev* **31**(2), 420-431
 559
- 560 Grasa, P, Cebrian-Perez, JA, and Muino-Blanco, T (2006) Signal transduction
 561 mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reproduction* **132**(5), 721-32
 562
- 563 Guneli, E, Tugyan, K, Ozturk, H, Gumustekin, M, Cilaker, S, and Uysal, N (2008) Effect
 564 of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Eur Surg Res*
 565 **40**(4), 354-60
 566
- 567 Harrison, RA, and Vickers, SE (1990) Use of fluorescent probes to assess membrane
 568 integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* **88**(1), 343-52
 569
- 570 Hassanpour, H, Mirshokrai, P, Shirazi, A, and Aminian, A (2007) Effect of nitric oxide
 571 on ram sperm motility in vitro. *Pak J Biol Sci* **10**(14), 2374-8
 572
- 573 Hellstrom, WJG, Bell, M, Wang, R, and Sikka, SC (1994) Effects of sodium nitroprusside
 574 on sperm motility, viability and lipid peroxidation. *Fertility and Sterility* **61**, 1117-1122
 575

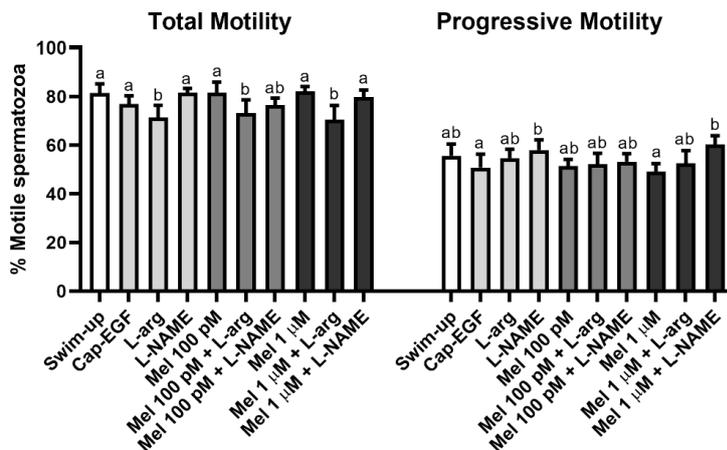
- 576 Herrero, MB, de Lamirande, E, and Gagnon, C (1999) Nitric oxide regulates human
577 sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro. *Biol Reprod* **61**(3), 575-
578 81
579
580 Herrero, MB, de Lamirande, E, and Gagnon, C (2003) Nitric oxide is a signaling molecule
581 in spermatozoa. *Curr Pharm Des* **9**(5), 419-25
582
583 Huang, F, Ning, H, Xin, QQ, Huang, Y, Wang, H, Zhang, ZH, Xu, DX, Ichihara, G, and
584 Ye, DQ (2009) Melatonin pretreatment attenuates 2-bromopropane-induced testicular
585 toxicity in rats. *Toxicology* **256**(1-2), 75-82
586
587 Jang, HY, Kim, YH, Kim, BW, Park, IC, Cheong, HT, Kim, JT, Park, CK, Kong, HS,
588 Lee, HK, and Yang, BK (2010) Ameliorative effects of melatonin against hydrogen
589 peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro
590 embryo development. *Reprod Domest Anim* **45**(6), 943-50
591
592 Jou, MJ, Peng, TI, Yu, PZ, Jou, SB, Reiter, RJ, Chen, JY, Wu, HY, Chen, CC, and Hsu,
593 LF (2007) Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-
594 augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. *J Pineal Res* **43**(4), 389-403
595
596 Kameshwari, DB, Siva, AB, and Shivaji, S (2003) Inhibition of in vitro capacitation of
597 hamster spermatozoa by nitric oxide synthase inhibitors. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*
598 **49**(3), 421-8
599
600 Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
601 bacteriophage t4. *Nature* **227**(5259), 680-5
602
603 Lampiao, F, Huussen, J, and Plessis, SD (2014) Effects of nitric oxide exposure on human
604 sperm function and apoptosis markers. *The Open Reproductive Science Journal* **6**(1), 17-
605 20
606
607 Lampiao, F, Strijdom, H, and du Plessis, SS (2006) Direct nitric oxide measurement in
608 human spermatozoa: Flow cytometric analysis using the fluorescent probe,
609 diaminofluorescein. *Int J Androl* **29**(5), 564-7
610
611 Lewis, SE, Donnelly, ET, Sterling, ES, Kennedy, MS, Thompson, W, and Chakravarthy,
612 U (1996) Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: Evidence
613 that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol Hum Reprod* **2**(11), 873-
614 8
615
616 Li, X, and Darzynkiewicz, Z (1995) Labelling DNA strand breaks with brdudp. Detection
617 of apoptosis and cell proliferation. *Cell Prolif* **28**(11), 571-9
618
619 Lopez-Ubeda, R, and Matás, C (2015) An approach to the factors related to sperm
620 capacitation process. *Andrology-Open Access* **04**(01)
621
622 Luna, C, Colás, C, Pérez-Pé, R, Cebrián-Pérez, JA, and Muiño-Blanco, T (2012) A novel
623 epidermal growth factor-dependent extracellular signal-regulated map kinase cascade
624 involved in sperm functionality in sheep. *Biol Reprod* **87**(4), 93
625

- 626 Luna, C, Mendoza, N, Casao, A, Pérez-Pé, R, Cebrián-Pérez, JA, and Muño-Blanco, T
 627 (2017) C-jun n-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways link
 628 capacitation with apoptosis and seminal plasma proteins protect sperm by interfering with
 629 both routes†. *Biol Reprod* **96**(4), 800-815
 630
- 631 Miguel-Jimenez, S, Carvajal-Serna, M, Calvo, S, Casao, A, Cebrian-Perez, JA, Muino-
 632 Blanco, T, and Perez-Pe, R (2020) Does melatonin exert its effect on ram sperm
 633 capacitation through nitric oxide synthase regulation? *Int J Mol Sci* **21**(6)
 634
- 635 Miguel-Jiménez, S, Pina-Beltrán, B, Gimeno-Martos, S, Carvajal-Serna, M, Casao, A,
 636 and Pérez-Pe, R (2021) NADPH oxidase 5 and melatonin: Involvement in ram sperm
 637 capacitation. *Front Cell Dev Biol* **9**, 655794
 638
- 639 Miraglia, E, Rullo, ML, Bosia, A, Massobrio, M, Revelli, A, and Ghigo, D (2007)
 640 Stimulation of the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway elicits
 641 human sperm chemotaxis in vitro. *Fertil Steril* **87**(5), 1059-63
 642
- 643 Moran, JM, Madejón, L, Ortega Ferrusola, C, and Peña, FJ (2008) Nitric oxide induces
 644 caspase activity in boar spermatozoa. *Theriogenology* **70**(1), 91-6
 645
- 646 O'Flaherty, C, Rodriguez, P, and Srivastava, S (2004) L-arginine promotes capacitation
 647 and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biochim Biophys Acta*
 648 **1674**(2), 215-21
 649
- 650 O'Bryan, MK, Zini, A, Cheng, CY, and Schlegel, PN (1998) Human sperm endothelial
 651 nitric oxide synthase expression: Correlation with sperm motility. *Fertility and Sterility*
 652 **70**(6), 1143-1147
 653
- 654 Ollero, M, Muino-Blanco, T, Lopez-Perez, MJ, and Cebrian-Perez, JA (1996) Viability
 655 of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *Int J*
 656 *Androl* **19**(5), 287-92
 657
- 658 Ortiz, A, Espino, J, Bejarano, I, Lozano, GM, Monllor, F, Garcia, JF, Pariente, JA, and
 659 Rodriguez, AB (2011) High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality
 660 and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility. *J*
 661 *Pineal Res* **50**(2), 132-9
 662
- 663 Pool, KR, Rickard, JP, and de Graaf, SP (2021) Melatonin improves the motility and
 664 DNA integrity of frozen-thawed ram spermatozoa likely via suppression of mitochondrial
 665 superoxide production. *Domest Anim Endocrinol* **74**, 106516
 666
- 667 Pool, KR, Rickard, JP, Tumeth, E, and de Graaf, SP (2020) Treatment of rams with
 668 melatonin implants in the non-breeding season improves post-thaw sperm progressive
 669 motility and DNA integrity. *Anim Reprod Sci* **221**, 106579
 670
- 671 Ratnasooriya, WD, and Dharmasiri, MG (2001) L-arginine, the substrate of nitric oxide
 672 synthase, inhibits fertility of male rats. *Asian J Androl* **3**(2), 97-103
 673

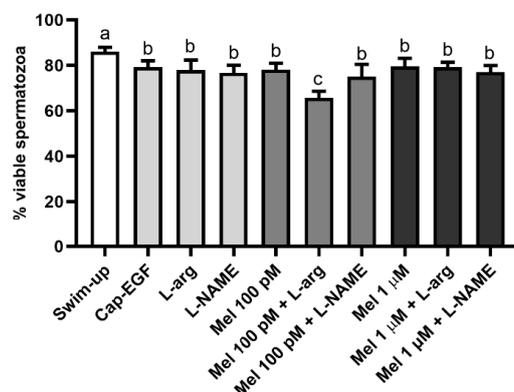
- 674 Revelli, A, Costamagna, C, Moffa, F, Aldieri, E, Ochetti, S, Bosia, A, Massobrio, M,
675 Lindblom, B, and Ghigo, D (2001) Signaling pathway of nitric oxide-induced acrosome
676 reaction in human spermatozoa. *Biol Reprod* **64**(6), 1708-12
677
- 678 Roessner, C, Paasch, U, Glander, HJ, and Grunewald, S (2010) Activity of nitric oxide
679 synthase in mature and immature human spermatozoa. *Andrologia* **42**(2), 132-7
680
- 681 Rosselli, M, Dubey, RK, Imthurn, B, Macas, E, and Keller, PJ (1995) Effects of nitric
682 oxide on human spermatozoa: Evidence that nitric oxide decreases sperm motility and
683 induces sperm toxicity. *Hum Reprod* **10**(7), 1786-90
684
- 685 Roy, SC, and Atreja, SK (2008) Tyrosine phosphorylation of a 38-kda capacitation-
686 associated buffalo (*bubalus bubalis*) sperm protein is induced by l-arginine and regulated
687 through a camp/pka-independent pathway. *Int J Androl* **31**(1), 12-24
688
- 689 Sainz, RM, Mayo, JC, Rodriguez, C, Tan, DX, Lopez-Burillo, S, and Reiter, RJ (2003)
690 Melatonin and cell death: Differential actions on apoptosis in normal and cancer cells.
691 *Cell Mol Life Sci* **60**(7), 1407-26
692
- 693 Sengoku, K, Tamate, K, Yoshida, T, Takaoka, Y, Miyamoto, T, and Ishikawa, M (1998)
694 Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of
695 human spermatozoa. *Fertil Steril* **69**(3), 522-7
696
- 697 Shayestehyekta, M, Mohammadi, T, Soltani, L, and PooyanMehri, M (2022) Effect of
698 different concentrations of melatonin on ram epididymal spermatozoa recovered post-
699 mortem under oxidative stress conditions and storage at 4 °c. *Reprod Domest Anim*
700
- 701 Staicu, FD, and Matás, C (2017) Nitric oxide: Key features in spermatozoa. In 'Nitric
702 oxide synthase - simple enzyme-complex roles.'. (Ed. S Saravi) pp. p. 137–154.
703 (IntechOpen: Rijeka, Croatia)
704
- 705 Tosti, E, and Ménézo, Y (2016) Gamete activation: Basic knowledge and clinical
706 applications. *Hum Reprod Update* **22**(4), 420-39
707
- 708 Vasan, SS (2011) Semen analysis and sperm function tests: How much to test? *Indian J*
709 *Urol* **27**(1), 41-8
710
- 711 Ward, CR, and Storey, BT (1984) Determination of the time course of capacitation in
712 mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol* **104**(2), 287-
713 96
714
- 715 Weinberg, JB, Doty, E, Bonaventura, J, and Haney, AF (1995) Nitric oxide inhibition of
716 human sperm motility. *Fertil Steril* **64**(2), 408-13
717
- 718 Yeoman, RR, Jones, WD, and Rizk, BM (1998) Evidence for nitric oxide regulation of
719 hamster sperm hyperactivation. *Journal of Andrology* **19**(1), 58-64
720
- 721 Zhao, F, Whiting, S, Lambourne, S, Aitken, RJ, and Sun, YP (2021) Melatonin alleviates
722 heat stress-induced oxidative stress and apoptosis in human spermatozoa. *Free Radic Biol*
723 *Med* **164**, 410-416

724
 725 Zhu, Z, Li, R, Lv, Y, and Zeng, W (2019) Melatonin protects rabbit spermatozoa from
 726 cryo-damage via decreasing oxidative stress. *Cryobiology* **88**, 1-8
 727
 728 Zini, A, De Lamirande, E, and Gagnon, C (1995) Low levels of nitric oxide promote
 729 human sperm capacitation in vitro. *J Androl* **16**(5), 424-31
 730
 731
 732
 733
 734
 735
 736

737 **Figures**

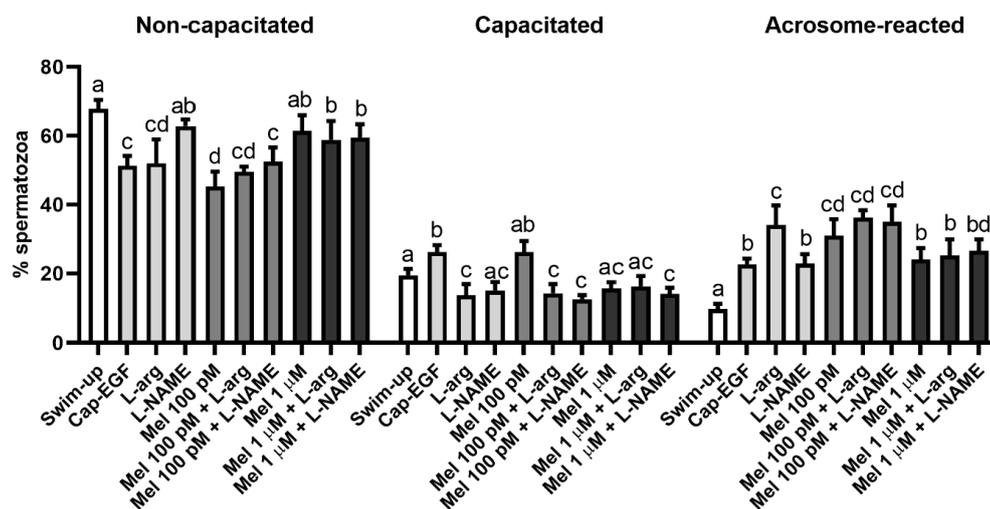


738
 739 **Figure 1.** Percentage of total motile spermatozoa (left) and progressive spermatozoa
 740 (right) before (swim-up, white bars) and after EGF-mediated in vitro capacitation without
 741 (Cap-EGF) or with L-arginine 10 mM (L-arg), L-NAME 100 μM (light grey bars) or
 742 melatonin (Mel) at 100 pM (dark grey bars) and 1 μM concentrations (black bars) alone
 743 or in combination with L-arg or L-NAME. Data are represented as mean ± S.E.M (n = 5).
 744 Different letters indicate significant statistical differences ($p < 0.05$).



745

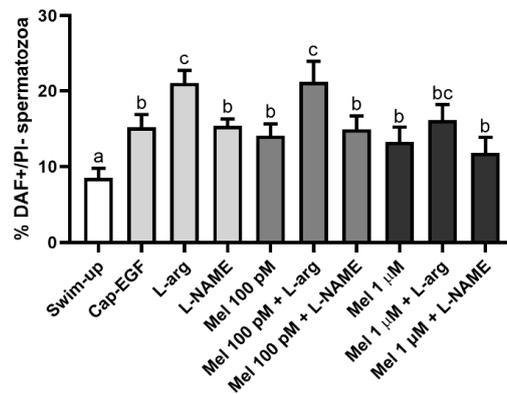
746 **Figure 2.** Percentage of viable spermatozoa before (swim-up, white bars) and after in
 747 vitro capacitation with EGF without (Cap-EGF) or with L-arginine 10 mM (L-arg), L-
 748 NAME 100 μM (light grey bars), or melatonin (Mel) at 100 pM (dark grey bars) and 1
 749 μM concentrations (black bars) alone or in combination with L-arg or L-NAME. Data are
 750 represented as mean ± S.E.M (n = 5). Different letters indicate significant statistical
 751 differences ($p < 0.05$).



752

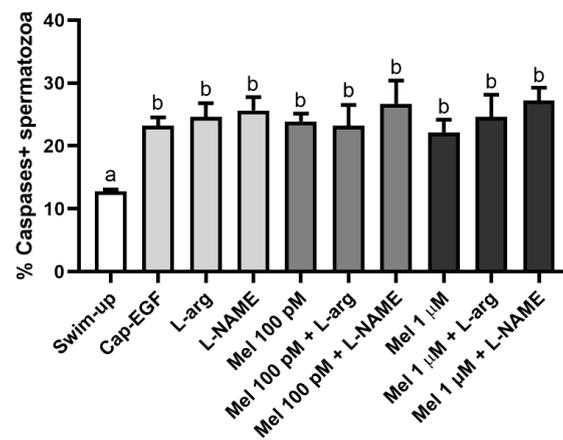
753 **Figure 3.** Percentage of non-capacitated, capacitated and acrosome-reacted ram
 754 spermatozoa, evaluated by CTC, before (swim-up, white bars) and after in vitro

755 capacitation with EGF (Cap-EGF) and with L-arginine 10 mM (L-arg), L-NAME 100
 756 μM (light grey bars), or melatonin (Mel) at 100 pM (dark grey bars) and 1 μM
 757 concentrations (black bars) alone or in combination with L-arg or L-NAME. Data are
 758 represented as mean \pm S.E.M (n = 5). Different letters indicate significant statistical
 759 differences ($p < 0.05$).



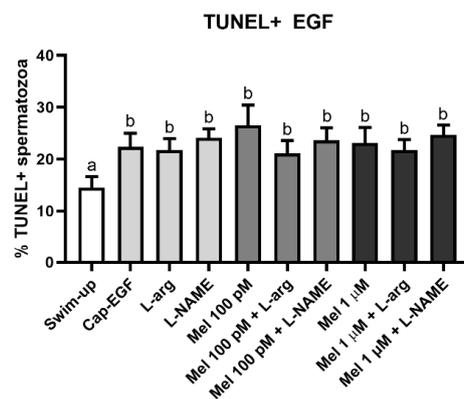
760

761 **Figure 4.** Percentage of live spermatozoa with high $\text{NO}\cdot$ levels (DAF+/PI-) before (swim-
 762 up, white bars) and after in vitro capacitation with EGF without (Cap-EGF) or with L-
 763 arginine 10 mM (L-arg), L-NAME 100 μM (light grey bars), or melatonin (Mel) at 100
 764 pM (dark grey bars) and 1 μM concentrations (black bars) alone or in combination with
 765 L-arg or L-NAME. Data are represented as mean \pm S.E.M (n = 5). Different letters
 766 indicate significant statistical differences ($p < 0.05$).



767

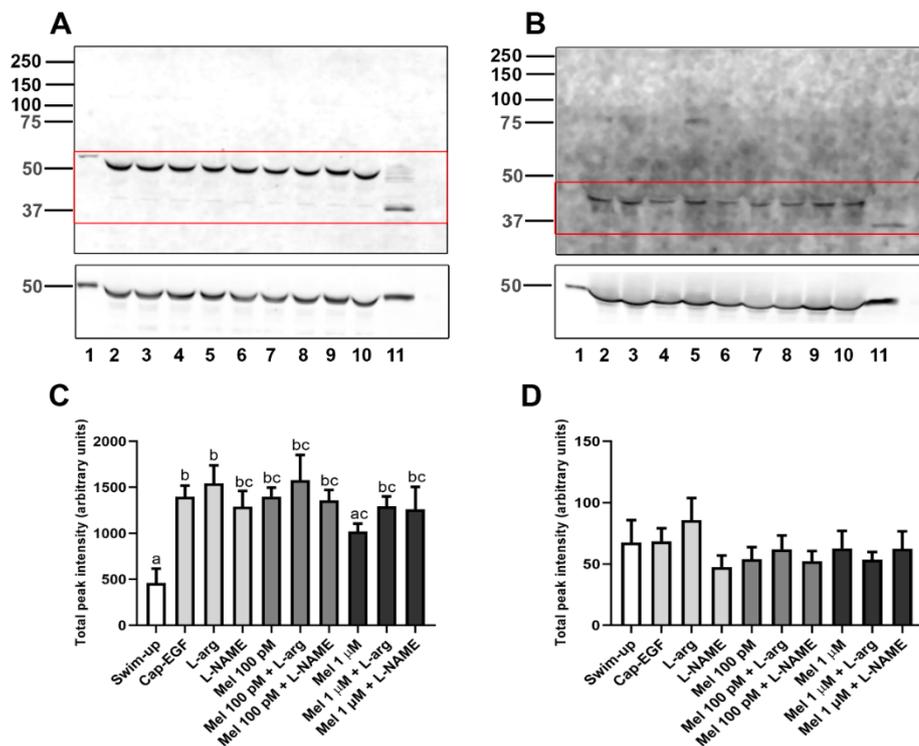
768 **Figure 5.** Percentage spermatozoa with active caspases-3 and 7 (Caspases+), before
 769 (swim-up, white bars) and after in vitro capacitation with EGF without (Cap-EGF) or
 770 with L-arginine 10 mM (L-arg), L-NAME 100 μM (light grey bars), or melatonin (Mel)
 771 at 100 pM (dark grey bars) and 1 μM concentrations (black bars) alone or in combination
 772 with L-arg or L-NAME. Data are represented as mean ± S.E.M (n = 5). Different letters
 773 indicate significant statistical differences ($p < 0.05$).



774

775 **Figure 6.** Percentage spermatozoa with damaged DNA (TUNEL+), before (swim-up,
 776 white bars) and after in vitro capacitation with EGF without (Cap-EGF) or with L-
 777 arginine 10 mM (L-arg), L-NAME 100 μM (light grey bars), or melatonin (Mel) at 100

778 pM (dark grey bars) and 1 μ M concentrations (black bars) alone or in combination with
 779 L-arg or L-NAME. Data are represented as mean \pm S.E.M (n = 5). Different letters
 780 indicate significant statistical differences ($p < 0.05$).



781

782 **Figure 7.** Representative image of western blot analysis of the phosphorylated forms of
 783 JNK (A) and p38 (B) MAPKs in ram spermatozoa protein extracts before (swim-up, lane
 784 1) and after in vitro capacitation with EGF without (Cap-EGF, lane 2) or with L-arginine
 785 10 mM (lane 3), L-NAME 100 μ M (lane 4), or melatonin (Mel) at 100 pM (lane 5) and 1
 786 μ M concentrations (lane 8) alone or in combination with L-arg (lanes 6 and 9,
 787 respectively) or L-NAME (lane 7 and 10, respectively). Positive control (EGF-stimulated
 788 A431 cell lysate, lane 11). Densitometric quantification of JNK (C) and p38 (D)
 789 normalized to α -tubulin (loading control, cropped lanes in panels A, B) before (swim-up,
 790 white bars) and after in vitro capacitation with EGF without (Cap-EGF) or with L-

791 arginine 10 mM (L-arg), L-NAME 100 μ M (light grey bars), or melatonin (Mel) at 100
792 pM (dark grey bars) and 1 μ M concentrations (black bars) alone or in combination with
793 L-arg or L-NAME. Data represented as mean \pm S.E.M (n = 5). Different letters indicate
794 significant statistical differences ($p < 0.05$).

6 DISCUSIÓN GENERAL

6.1. Efecto quimiotáctico de la melatonina sobre la orientación espermática en la especie ovina

Los espermatozoides eyaculados deben completar su maduración a lo largo de su tránsito por el tracto reproductor femenino, para finalmente adquirir la capacidad fecundante (Austin, 1951; Chang, 1951). El proceso de capacitación, como se ha explicado anteriormente, implica una serie de cambios a nivel de membrana y en su patrón de movimiento (denominado hiperactivación flagelar), entre otros (Yanagimachi and Noda, 1970; Gadella and Harrison, 2000; Puga Molina *et al.*, 2018). Durante este tránsito, se produce una selección espermática y sólo unos pocos llegan al entorno del ovocito (Barratt and Cooke, 1991; Williams *et al.*, 1993). Allí, en la mayoría de las especies, solo los espermatozoides capacitados e hiperactivados son capaces de atravesar las células del *cumulus* (Jaiswal *et al.*, 1998; Gakamsky *et al.*, 2009). Así pues, para llegar con éxito hasta el ovocito parece fundamental la existencia mecanismos de orientación espermática, como la quimiotaxis. Estudios previos han demostrado la capacidad quimioatrayente del fluido folicular sobre espermatozoides de algunos mamíferos (Giojalas and Rovasio, 1998; Oliveira *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2021), pero la cuestión principal es cuál o cuáles de todos sus componentes son los que provocan dicha respuesta.

Dado que la melatonina está presente en el entorno del ovocito (Xiao *et al.*, 2019) y es capaz de ejercer efectos directos sobre los espermatozoides ovinos (Casao *et al.*, 2010b; Gimeno-Martos *et al.*, 2019), en esta tesis se planteó la hipótesis de que **la melatonina podría ser una sustancia con capacidad quimioatrayente para el espermatozoide ovino**, y su demostración constituyó el **primer objetivo de la presente tesis doctoral**. El primer abordaje para lograr este objetivo consistió en la inclusión de melatonina a diferentes concentraciones en la capa superior o medio de recogida utilizado en la técnica de selección espermática *swim-up*/dextrano. En esta técnica el eyaculado es depositado en el fondo de un tubo y los espermatozoides son capaces de nadar hacia este medio de recogida. Una capa intermedia, enriquecida en dextrano y depositada entre el eyaculado y el medio de recogida, constituye una barrera física que impide el paso de espermatozoides sin buena motilidad, y además retiene en parte a los espermatozoides con su membrana alterada. Por tanto, al cabo de un tiempo de incubación, en el medio de recogida se obtiene una población espermática libre de

plasma seminal, además de enriquecida en espermatozoides con buena motilidad y viabilidad. La inclusión de melatonina a concentración 100 pM o 1 μ M en el medio de recogida dio lugar a un **mayor porcentaje de recuperación de espermatozoides que en el grupo control, es decir, sin melatonina en la capa superior, pero solamente durante la época no reproductiva (artículo-manuscrito 1)**. A pesar de que la presencia de melatonina en la capa superior del *swim-up*/dextrano no aumentó el porcentaje de células viables, como el porcentaje de células recuperadas fue mayor en presencia de hormona, se puede decir que también se obtuvo un mayor número de espermatozoides viables en la capa superior en comparación con el grupo control sin hormona. Por otro lado, la población espermática seleccionada en presencia de **melatonina a concentración 100 pM en la capa de recogida presentó un mayor porcentaje de espermatozoides capacitados que las otras muestras**. Esto sugirió dos posibles explicaciones: o bien los espermatozoides que ya estaban capacitados en el eyaculado son los que mayoritariamente respondieron a ese gradiente hormonal, como ocurre en otras especies (Cohen-Dayag *et al.*, 1995; Fabro *et al.*, 2002), o bien que los espermatozoides que llegan hasta la capa superior se capacitan al entrar en contacto con la melatonina. Aunque las condiciones de incubación fueron diferentes a las del presente estudio, trabajos previos en nuestro grupo de investigación demostraron que una concentración de melatonina 100 pM tiene efecto capacitante en la especie ovina (Casao *et al.*, 2010b; Gimeno-Martos *et al.*, 2019), por lo que también podría tener el mismo efecto durante el proceso de *swim-up*. Además, los espermatozoides seleccionados con melatonina 100 pM mostraron una mayor intensidad de marcaje para el receptor MT₂ en el acrosoma (inmunotipo A, evaluado por inmunofluorescencia indirecta), en comparación con el grupo control o con melatonina 1 μ M. Estos resultados concuerdan con los de Gonzalez-Arto *et al.* (2016b), que describieron una correlación positiva entre el inmunotipo A para MT₂ y el porcentaje de espermatozoides capacitados.

El mayor porcentaje de recuperación celular obtenido en presencia de melatonina a las dos concentraciones ensayadas implica que una mayor cantidad de espermatozoides nadan desde el fondo del tubo hasta el medio de recogida. Esto podría deberse bien a un estímulo del movimiento espermático en direcciones aleatorias, es decir, a un efecto de quimioquinesis, o bien al movimiento dirigido hacia el gradiente de melatonina que se establece entre el fondo del tubo y la capa de recogida del *swim-up*, lo que sería un efecto

quimiotáctico. Teniendo en cuenta que la quimoquinesis se define como el aumento o disminución de la velocidad, o las alteraciones de los caracteres de frecuencia o amplitud y de la dirección de las células en respuesta a un estímulo químico (Ralt *et al.*, 1994), se decidió comparar las velocidades de los espermatozoides seleccionados en los tres *swim-up*. La falta de diferencias significativas entre ellos apuntaría a que **el mayor porcentaje de recuperación celular obtenido en los *swim-up* que incluyen melatonina en el medio de recogida se podría deber un efecto quimiotáctico de esta hormona.**

Para dilucidar esta cuestión y comprobar el posible efecto quimiotáctico de la melatonina, se llevó a cabo un segundo abordaje utilizando cámaras comerciales para el estudio de la quimiotaxis en otros tipos celulares y un software capaz de analizar las trayectorias de los espermatozoides. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que, únicamente en la época no reproductiva, sólo **los espermatozoides previamente capacitados en un medio con agentes elevadores del AMPc fueron capaces de responder y moverse hacia el gradiente de melatonina generado por la concentración de 1 μ M (artículo-manuscrito 1)** y, si bien, las diferencias entre tratamientos fueron pequeñas, eran estadísticamente significativas. Estos resultados coinciden con otros estudios que afirman que solamente los espermatozoides capacitados responden a estímulos de quimioatracción, al menos en humano (Cohen-Dayag *et al.*, 1995; Gatica *et al.*, 2013), ratón (Guidobaldi *et al.*, 2017), toro (Dominguez *et al.*, 2018) y conejo (Fabro *et al.*, 2002). Sin embargo, no se observó respuesta quimiotáctica de los espermatozoides ovinos con el gradiente de melatonina generado por la concentración de 100 pM, como sí apuntaban los resultados del primer abordaje experimental. Aunque el diseño experimental es diferente en ambos casos, el hecho de que la melatonina 100 pM no ejerza efecto al ensayarla en las cámaras de quimiotaxis, sugiere que **el incremento en el porcentaje de recuperación usando esta concentración en el primer experimento no se debe a un efecto quimiotáctico. Este incremento podría deberse a la capacidad de la melatonina 100 pM de promover la motilidad total y, probablemente, la hiperactivación flagelar asociada al estado de capacitación (Ho and Suarez, 2001),** por lo que los espermatozoides podrían nadar mejor hacia la capa superior que en el *swim-up* control.

Por otra parte, **no se observaron diferencias significativas cuando ambos abordajes experimentales se llevaron a cabo durante la época reproductiva,** lo que podría deberse a

los altos niveles de melatonina presentes en el plasma seminal durante esta época. Cabe recordar que los niveles de melatonina en el plasma seminal del morueco varían significativamente entre estaciones, con una disminución a partir del solsticio de invierno, y un aumento tras el solsticio de verano, alcanzando los niveles máximos durante los meses de octubre y noviembre (Casao *et al.*, 2010a). En el primer abordaje experimental, es importante tener en cuenta que en el fondo del tubo se deposita el eyaculado completo, es decir, los espermatozoides junto con el plasma seminal, y ese plasma seminal contiene melatonina. Si existe una menor concentración de melatonina en el plasma seminal que en la capa superior, se establecerá un gradiente de concentración, que es la base de la quimiotracción. Sin embargo, la concentración de melatonina en el plasma seminal en la época reproductiva es incluso superior al 1 μM (Casao *et al.*, 2010a). Esto puede implicar que no se establezca un gradiente de concentración entre el fondo del tubo y la capa de recogida donde se ha incluido la melatonina, lo que explicaría la falta de diferencias con el grupo control en época reproductiva. Otra explicación sería que los espermatozoides ya han sido expuestos a altas concentraciones de melatonina en el momento de la eyaculación durante la época reproductiva, por lo que los receptores de melatonina podrían estar parcialmente saturados y no responder a los estímulos hormonales del mismo modo que en la época no reproductiva (Witt-Enderby *et al.*, 2000).

En el segundo abordaje experimental tampoco se observó una respuesta quimiotáctica de los espermatozoides obtenidos en época reproductiva, a pesar de que la capacitación *in vitro* se indujo con éxito en ambas épocas. Esto podría explicarse, como ya se ha mencionado anteriormente, por la exposición previa de los espermatozoides a las altas concentraciones de melatonina presentes en el plasma seminal durante la época reproductiva, que enmascararía los efectos *in vitro* de esta hormona.

Es importante mencionar que las cámaras de quimiotaxis empleadas en esta tesis doctoral no están especialmente diseñadas para espermatozoides, sino para células de movimiento lento (Tomasova *et al.*, 2019). Seguramente, el uso de cámaras específicas que permitan la recuperación de los espermatozoides la exposición al quimioatrayente, facilitando la evaluación de los parámetros de calidad a posteriori, podrían arrojar más luz en el estudio de la quimotaxis espermática.

En resumen, los resultados obtenidos correspondientes al primer objetivo de esta tesis doctoral, sugieren que **la melatonina a concentración 1 μ M parece ejercer cierto efecto quimiotáctico *in vitro* sobre los espermatozoides ovinos**, en base al mayor porcentaje de recuperación celular obtenido al incluirla en la capa de recogida del *swim-up* y al mayor índice quimiotáctico observado en las cámaras de quimiotaxis con espermatozoides capacitados con AMPc, si bien, este efecto solo fue evidente cuando se utilizaron espermatozoides obtenidos en la época no reproductiva. Además, **la presencia de melatonina 100 pM en la capa de recogida del *swim-up* también aumentó la proporción de espermatozoides recuperados en comparación con el control, aunque este efecto parece estar mediado por su efecto capacitante, más que por la quimioatracción.**

Por tanto, se podría considerar la inclusión de melatonina en el protocolo de *swim-up*/dextrano para la optimización de este procedimiento de selección espermática, usando distintas concentraciones en función de si se necesitan más espermatozoides capacitados o no capacitados, para su uso en técnicas de reproducción asistida.

6.2. Estudio de los mecanismos moleculares de respuesta de los espermatozoides ovinos a la melatonina en los procesos de capacitación y apoptosis

Previo al estudio del efecto de la melatonina en estos procesos, y teniendo en cuenta su papel antioxidante, se hizo necesario evaluar en el espermatozoide ovino los niveles de especies oxígeno y nitrógeno reactivas, así como la presencia de las enzimas que los generan, y la implicación de los mismos en la capacitación y la apoptosis.

6.2.1. Identificación y localización de la NADPH oxidasa 5 (NOX5) en el espermatozoide ovino

El descubrimiento de las NADPH oxidasas ayudó a comprender la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en numerosos tipos celulares (Panday *et al.*, 2015). Hasta hace unos cuantos años, se creía que la generación de superóxidos en los espermatozoides procedía exclusivamente de los leucocitos presentes en el semen, por lo que esta producción de ROS estaba relacionada con causas patológicas (Plante *et al.*, 1994; Whittington *et al.*, 1999). Sin embargo, hoy en día se acepta que los espermatozoides por sí solos son capaces de

generar ROS, que son necesarias para mantener la funcionalidad espermática, y que esta producción estaría mediada por la actividad de la NADPH oxidasa 5 (NOX5) (Bedard and Krause, 2007). En 2001 se describió la presencia de esta enzima en tejidos de órganos como el testículo, el útero, el bazo y en los nódulos linfáticos (Banfi *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2001). Posteriormente se detectó en espermatozoides de caballo (Sabeur and Ball, 2007), humano (Musset *et al.*, 2012; Ghani *et al.*, 2013) y perro (Setyawan *et al.*, 2016), lo que sustentó la hipótesis de la generación autónoma de superóxidos en las células espermáticas. Por este motivo, dentro **del segundo objetivo general de esta tesis, se planteó primeramente identificar y localizar la NOX5 en espermatozoides ovinos (objetivo 2.1).**

Los resultados de los análisis por *western blot* e inmunofluorescencia indirecta revelaron, por primera vez, **la presencia de la enzima NOX5 en espermatozoides ovinos** (artículo 2). Así, mediante *western blot* se detectó una banda de una proteína de 85 kDa, que coincidía con la observada en espermatozoides de caballo (Sabeur and Ball, 2007), y se aproximaba al peso molecular de la proteína identificada en humano (Musset *et al.*, 2012). Además, nuestros resultados revelaron otras bandas de menor peso molecular (45 y 30 kDa), que también han sido descritas por otros autores en muestras equinas (Sabeur and Ball, 2007), y que podrían deberse a procesos proteolíticos.

En relación a la localización de la NOX5 en los espermatozoides ovinos, en base a los resultados de inmunofluorescencia indirecta pudimos describir **seis inmunotipos diferentes**, lo que contrasta con la única localización o los dos inmunotipos que habían sido descritos previamente en humano (Musset *et al.*, 2012) y caballo (Sabeur and Ball, 2007), respectivamente. Por tanto, estos resultados sugieren que la localización de esta enzima podría ser variable en función de la especie.

Además, nuestros resultados revelaron, por primera vez, que **la NOX5 sufre una redistribución en los espermatozoides ovinos tras ser incubados en condiciones capacitantes**, lo que hace suponer que la NOX5 estaría implicada en la capacitación espermática en la especie ovina, seguramente regulando la producción de ROS, como se discutirá a continuación.

6.2.2. Implicación de la NOX5 y del anión superóxido en la capacitación espermática ovina

Una vez confirmada la presencia de la NOX5 en los espermatozoides de morueco y la evaluación de su distribución durante la capacitación *in vitro*, se planteó como siguiente objetivo **determinar la implicación de la NOX5 y del anión superóxido en la capacitación espermática ovina (objetivo 2.1)**.

En la mayoría de las especies, la capacitación espermática se puede inducir *in vitro* incubando los espermatozoides en un medio con alto contenido de calcio y bicarbonato, como es el medio TALP. No obstante, en la especie ovina, además de calcio y bicarbonato (Pérez-Pé *et al.*, 2002) se requieren sustancias que mantengan unos niveles intracelulares altos de AMPc (Grasa *et al.*, 2006).

En espermatozoides humanos, equinos y porcinos ya se había demostrado previamente que los niveles de superóxidos aumentan tras la incubación en condiciones capacitantes (de Lamirande and Gagnon, 1995; O'Flaherty *et al.*, 2005; Burnaugh *et al.*, 2007). En este trabajo, **la capacitación *in vitro* de espermatozoides ovinos, usando un medio con agentes elevadores del AMPc, también dio lugar a un incremento en los niveles de superóxidos**. Además, la inducción de la activación de NOX5, que es una enzima calcio-dependiente, con ionóforo de calcio A23187 disparó los niveles de superóxidos en los espermatozoides ovinos incubados en condiciones capacitantes, del mismo modo que se había observado previamente en humano (Griveau *et al.*, 1995; Aitken *et al.*, 1997) y caballo (Ball *et al.*, 2001; Burnaugh *et al.*, 2007). Y al contrario, la inhibición de la NOX5 con el compuesto GKT136901 redujo la producción de superóxidos en las muestras capacitadas con agentes elevadores del AMPc (artículo 2). La NOX5 es la única isoforma de esta enzima cuya activación depende exclusivamente del calcio, gracias a que posee sitios de unión a este ion (revisado por Touyz *et al.* (2019)). Por consiguiente, el aumento en los niveles de superóxidos genera tras la adición del ionóforo de calcio, junto con la disminución observada al utilizar el inhibidor de NOX5 (GKT136901), demuestran que **la NOX5 es una importante fuente de ROS en el espermatozoide ovino**.

De igual forma, **la NOX5 estaría implicada en el proceso de capacitación**, ya que al añadir su inhibidor, el GKT136901, al medio de capacitación *in vitro*, se observó una

disminución del porcentaje de espermatozoides capacitados y reaccionados, evaluados mediante la tinción con CTC. Por otro lado, la activación de NOX5 con ionóforo A23187 también incrementó considerablemente el porcentaje de espermatozoides reaccionados. Este resultado podría ser debido a un efecto directo del ionóforo de calcio sobre la reacción acrosómica (Yanagimachi, 1975; Marti *et al.*, 2000), pero la combinación del inhibidor de NOX5 con el ionóforo de calcio previno la reacción acrosómica a la vez que limitaba la producción de superóxidos, lo que se demuestra que este efecto sobre la reacción acrosómica también estaría mediado por la NOX5.

Algunos autores habían descrito que la adición de ionóforo de calcio podría dar lugar a una inhibición de la motilidad en espermatozoides de distintas especies (Hong *et al.*, 1985; Visconti *et al.*, 1999b). Nuestros resultados también revelaron este efecto secundario del ionóforo sobre la motilidad espermática, pero sin afectar a la viabilidad, igual que habían visto otros autores (Suarez *et al.*, 1987). Por otra parte, la inhibición de NOX5 con GKT136901 incrementó la motilidad progresiva en los espermatozoides de morueco capacitados con alto AMPc, al contrario de lo observado en otros estudios que vinculaban la inhibición de NOX5 con una menor motilidad y viabilidad espermáticas (Ghanbari *et al.*, 2018).

6.2.3. Detección y localización de la óxido nítrico sintasa (NOS) en el espermatozoide ovino

Además de la relevancia de los superóxidos generados por la NOX5 en la capacitación espermática, en esta tesis doctoral también quisimos estudiar la implicación en este proceso de otra especie reactiva, en este caso de nitrógeno: el óxido nítrico (NO·). El papel del óxido nítrico en la fisiología espermática se ha estudiado ampliamente en varias especies, demostrándose su implicación en la motilidad (Hellstrom *et al.*, 1994; Lewis *et al.*, 1996), la capacitación (Zini *et al.*, 1995; de Lamirande and Lamothe, 2009), la reacción acrosómica (Herrero *et al.*, 1999), y a la unión a la zona pelúcida (Herrero and Gagnon, 2001). Sin embargo, antes de estudiar la implicación del óxido nítrico en la funcionalidad espermática en la especie ovina, se hizo necesario **identificar y localizar la enzima responsable de la producción del óxido nítrico, la óxido nítrico sintasa (NOS) en el espermatozoide de morueco (objetivo 2.1).**

La NOS tiene tres isoformas, dos constitutivas, la neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS), y una inducible (iNOS). Las dos primeras se han identificado en espermatozoides de

humano, ratón, toro, cerdo, caballo y gato, pero la forma inducible (iNOS) solo se ha detectado en algunos de ellos (revisado por Staicu y Matás (2017)). **En esta tesis doctoral se ha demostrado, por primera vez, la presencia de las tres isoformas de NOS en espermatozoides de morueco, así como su capacidad para producir óxido nítrico (artículo 3).** Las isoformas eNOS y nNOS se evidenciaron mediante *western blot*, pero no se pudo identificar por este método la isoforma iNOS. Al menos en células somáticas, la iNOS sólo se expresa si existe un estímulo, como la inflamación (Nathan and Hibbs, 1991), o la presencia de lipopolisacáridos o citoquinas (Zhang *et al.*, 2004; Heeba and Hamza, 2015). Por lo tanto, es lógico pensar que en condiciones fisiológicas esta isoforma se encuentre en cantidades tan pequeñas que, en determinados tipos celulares, sea imposible detectarla por *western blot*.

Sin embargo, al estudiar la localización de NOS por inmunofluorescencia directa, se identificaron las tres isoformas de NOS, localizadas principalmente en la cabeza del espermatozoide. Así, describimos dos inmunotipos para cada isoforma (inmunotipo 1 y 2 para eNOS, e inmunotipos 3 y 4 para nNOS e iNOS), en relación con su presencia o ausencia en el borde apical de la cabeza. En espermatozoides de toro, Meiser y Schulz (2003) identificaron la nNOS en la zona apical de la cabeza y en el flagelo, mientras que la eNOS se presentaba solo en la región apical. En espermatozoides porcinos se identificaron ambas eNOS y nNOS en el acrosoma, e iNOS en cabeza, cuello y flagelo (Staicu *et al.*, 2019). No obstante, la distribución de estas isoformas no se modificaba durante la capacitación espermática ni en toro ni en cerdo. Nuestros resultados, sin embargo, demostraron que **la capacitación inducida por adición de elevadores del AMPc producía un descenso en el porcentaje de espermatozoides ovinos con marcaje en el borde apical en las tres isoformas (artículo 3).** Este hallazgo está en concordancia con lo observado previamente en espermatozoides de ratón (Herrero *et al.*, 1996), ya que el marcaje de NOS desaparecía de la cabeza en condiciones capacitantes. Sin embargo, no se apreciaron cambios significativos en sus niveles estudiados por *western blot* tras la inducción de la capacitación *in vitro*.

Por tanto, los resultados de nuestra investigación sugieren que **las isoformas de la óxido nítrico sintasa cambiarían su localización en el espermatozoide para modular su actividad y, consecuentemente, la producción de óxido nítrico en el espermatozoide ovino.**

6.2.4. Implicación del óxido nítrico en la capacitación espermática ovina

Tras demostrar que las tres isoformas de NOS están presentes en los espermatozoides de morueco, y que su localización varía tras la incubación de éstos en condiciones capacitantes, **tratamos de averiguar si su producto, el óxido nítrico, está implicado en el proceso de capacitación espermática ovina (objetivo 2.1).**

Como se ha comentado anteriormente, para lograr exitosamente la capacitación *in vitro*, los espermatozoide ovinos requieren altos niveles de AMPc en el medio de capacitación (Grasa *et al.*, 2006), además de calcio y bicarbonato (Pérez-Pé *et al.*, 2002). Asimismo, se ha descrito que, aunque en menor medida, también el factor de crecimiento epidérmico (EGF) estimula la capacitación en los espermatozoides de morueco (Luna *et al.*, 2012). **Nuestros resultados mostraron un aumento en los niveles intracelulares de óxido nítrico al incubar los espermatozoides ovinos en condiciones capacitantes, tanto en medio TALP sólo como en presencia de agentes elevadores del AMPc (medio *cocktail*) (artículo 3) o de EGF (artículo 4).** Este aumento de NO \cdot asociado a la capacitación ya se había observado en la especie humana (Herrero *et al.*, 1999) y porcina (Hou *et al.*, 2008). Asimismo, la adición de L-arginina, un precursor del óxido nítrico, al medio de capacitación aumentó muy significativamente los niveles de óxido nítrico en los espermatozoides, como era de esperar. **Estos altos niveles de óxido nítrico provocaron a su vez un incremento en el porcentaje de espermatozoides reaccionados en esas muestras incubadas en condiciones capacitantes** (artículos 3 y 4), como ya se había descrito en otras especies (Revelli *et al.*, 1999; Funahashi, 2002; Rodriguez *et al.*, 2005; Roy and Atreja, 2008).

En relación a la motilidad, al inducir la capacitación espermática de los espermatozoides ovinos en medio TALP y en medio *cocktail* (artículo 3), el incremento de los niveles de óxido nítrico por la L-arginina no dio lugar a ningún efecto sobre este parámetro. Sin embargo, cuando la capacitación espermática se indujo con el EGF, la presencia de L-arginina sí que afectó a la motilidad espermática total, que se redujo, pero sin disminuir la progresividad (artículo 4). Estudios previos de la acción del óxido nítrico sobre la motilidad espermática, habían arrojado resultados contradictorios. Por un lado, algunos autores consideran que este compuesto mantiene o estimula la motilidad espermática (Keller and Polakoski, 1975; Hellstrom *et al.*, 1994; de Andrade *et al.*, 2018), mientras otros consideran que la perjudica (Rosselli *et al.*, 1995; Ratnasooriya and Dharmasiri, 2001; O'Flaherty *et al.*,

2004b; Hassanpour *et al.*, 2007), como hemos visto en los espermatozoides ovinos capacitados con EGF. En esta tesis doctoral también se ha observado un efecto diferente de la L-arginina sobre la motilidad en función de cómo se ha inducido la capacitación *in vitro*, independientemente del efecto que tuvo sobre el estado de capacitación o de los niveles de óxido nítrico generados en cada caso.

La incubación de las muestras con L-NAME, el inhibidor de la enzima NOS, disminuyó los niveles de óxido nítrico en los espermatozoides ovinos capacitados en un medio con elevadores del AMPc (art 3), pero no cuando se indujo la capacitación únicamente en medio TALP (artículo 3) o con EGF (artículo 4). Esto podría deberse a que el *cocktail* de sustancias elevadoras de AMPc aumenta de manera más acusada la producción de óxido nítrico que los otros dos medios de capacitación, por lo que los efectos del L-NAME podrían ser más evidentes. No obstante, en estas condiciones de capacitación con agentes elevadores del AMPc, la reducción de los niveles de óxido nítrico por el inhibidor de la NOS no tuvo efectos significativos ni en la motilidad, ni en el estado de capacitación y reacción acrosómica, probablemente porque la inducción de la capacitación está tan forzada en estas condiciones que no se puede frenar. Sin embargo, en el caso de la capacitación con EGF, a pesar de que el L-NAME no afectó a los niveles de óxido nítrico, sí que limitó la capacitación espermática, manteniéndose en valores similares a los observados antes de inducir la capacitación, y mejoró la motilidad progresiva. Los efectos descritos de este inhibidor en espermatozoides de otras especies son contradictorios. Algunos autores no observan ninguna acción al incubar los espermatozoides con L-NAME (de Lamirande and Lamothe, 2009; de Andrade *et al.*, 2018), pero otros ven un claro efecto sobre la fisiología espermática (Kameshwari *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2005; Roy and Atreja, 2008; Leal *et al.*, 2009). Estas diferencias pueden deberse a la distinta respuesta de los espermatozoides de diferentes especies al L-NAME, así como a los diferentes protocolos utilizados para evaluar sus efectos.

En resumen, **la inducción *in vitro* de la capacitación en espermatozoides ovinos tanto en medio TALP solo, como con elevadores de AMPc y con EGF produjo un aumento en los niveles de óxido nítrico intracelular. Además, la inducción de la síntesis de óxido nítrico mediante la adición de su precursor, la L-arginina, incrementó el porcentaje de espermatozoides reaccionados, mientras que el inhibidor de la NOS, el L-NAME, fue capaz de reducir el porcentaje de espermatozoides capacitados *in vitro* en presencia de EGF, lo que**

refuerza la hipótesis de la **implicación de la NOS y el NO[•] en la capacitación espermática ovina**.

6.2.5. Efecto de la melatonina sobre los niveles de óxido nítrico y superóxidos durante la capacitación *in vitro* en el espermatozoide ovino

La función antioxidante de la melatonina ha sido ampliamente demostrada en espermatozoides de distintas especies (Succu *et al.*, 2011; Karimfar *et al.*, 2015; Pang *et al.*, 2016; Appiah *et al.*, 2019), así como el importante papel que juega en la funcionalidad espermática (Jang *et al.*, 2010; Ortiz *et al.*, 2011). Concretamente en la especie ovina, algunos trabajos describen que la melatonina está involucrada en la regulación de la capacitación espermática (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016b), y disminuye el estrés oxidativo (Pool *et al.*, 2021; Bhalothia *et al.*, 2022; Shayestehyekta *et al.*, 2022) y los marcadores apoptóticos (Casao *et al.*, 2010b; Gimeno-Martos *et al.*, 2019)

Los estudios llevados a cabo en esta tesis doctoral han confirmado, una vez más, el efecto bimodal que tiene la melatonina sobre la capacitación espermática ovina, promovéndola, junto con la reacción acrosómica, a concentraciones picomolares y previniéndola a concentraciones micromolares (artículos 2, 3 y 4). El efecto descapacitante parece estar mediado, al menos en parte, por su capacidad de disminuir las ROS, como se ha descrito en conejo (Zhu *et al.*, 2019), toro (Ashrafi *et al.*, 2013) o ratón (Chen *et al.*, 2016). Por el contrario, du Plessis *et al.* (2010) no observaron ningún efecto sobre los niveles de ROS en espermatozoides humanos. Tampoco Pool *et al.* (2021) reportaron un efecto de la melatonina sobre los niveles de ROS en espermatozoides ovinos congelados, aunque concluyeron que la melatonina es capaz de reducir específicamente la producción mitocondrial de superóxidos.

En esta tesis doctoral se ha demostrado que la presencia de **melatonina a concentración 1 μ M en un medio de capacitación con agentes elevadores del AMPc es capaz de prevenir el aumento de superóxidos** generados por los espermatozoides ovinos capacitados *in vitro* (artículo 2). Es más, la incubación con melatonina, previamente a la adición del ionóforo de calcio a la muestra espermática, fue capaz de limitar la producción desmesurada de superóxidos desencadenada por este compuesto, reduciéndolos hasta el mismo nivel que cuando se añade el inhibidor de NOX5 (GKT136901). Estas evidencias

apuntan a la posible acción antioxidante de la melatonina mediante la regulación de la enzima NOX5.

Esta idea se corroboró cuando demostramos que la **melatonina era capaz de modificar la distribución de la NOX5 en los espermatozoides ovinos, previniendo los cambios en su localización asociados a la capacitación *in vitro* (artículo 2)**. Es importante mencionar que nuestro grupo había descrito previamente el efecto de la melatonina sobre el citoesqueleto en espermatozoides ovinos, limitando los cambios en la distribución de la actina y la α -tubulina asociados a la capacitación *in vitro* (Carvajal-Serna *et al.*, 2020c). Esta acción de la melatonina sobre el citoesqueleto ya se había observado en células somáticas (Benítez-King, 2006). Los resultados de esta tesis sugieren que la melatonina podría afectar a la distribución de la NOX5 y modular su capacidad para producir superóxidos mediante la estabilización del citoesqueleto durante la capacitación *in vitro*, como se muestra en el modelo propuesto en la figura 10 del artículo 2. Por el contrario, ni la incubación con el inhibidor de NOX5 (GKT136901) ni con el ionóforo de calcio modificaron la distribución de la enzima durante la capacitación, probablemente porque estos compuestos modulan su actividad de manera directa, y no afectan a su distribución en la célula. No obstante, la adición de ionóforo de calcio podría evitar el efecto estabilizador de la melatonina sobre el citoesqueleto, probablemente como consecuencia del alto incremento de calcio intracelular (Finkelstein *et al.*, 2010; Breitbart and Finkelstein, 2018). Finalmente, el hecho de que los niveles de NOX5 analizados por *western blot* no cambiasen durante la incubación de los espermatozoides en condiciones capacitantes, refuerza la idea de que la NOX5 podría regular su actividad en función de su localización celular.

En cuanto a la producción de óxido nítrico, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral han demostrado que **la melatonina es capaz de producir cambios en la distribución de algunas isoformas de la NOS asociados a la capacitación *in vitro*** de los espermatozoides ovinos, al igual que ocurría con la NOX5. Así, la melatonina impidió los cambios en los inmunotipos descritos para la nNOS observados en muestras capacitadas con AMPc. Probablemente, la presencia de la nNOS en la región acrosomal disminuya debido a la reorganización de membrana que se da durante el proceso de capacitación, y la melatonina, igual que modula este proceso, sería capaz de evitar la redistribución de la enzima. Esto podría estar mediado por el efecto estabilizador de la melatonina sobre el citoesqueleto en los

espermatozoides ovinos, como se ha mencionado anteriormente. Por el contrario, la melatonina potenció el efecto en la distribución de iNOS que se observó tras la capacitación espermática, disminuyendo el marcaje en la región apical. Este comportamiento se podría explicar en base a las distintas funciones que tiene cada isoforma de la NOS. Se sospecha que las formas constitutivas (eNOS y nNOS) pueden estar involucradas en la capacitación espermática, mientras que la isoforma inducible (iNOS) estaría más relacionada con procesos inflamatorios o de respuesta a estrés (Staicu *et al.*, 2019). Resulta curioso que las dos concentraciones de melatonina ensayadas, 100 pM y 1 μ M, provocasen efectos similares en la distribución de iNOS y nNOS, ya que dichas concentraciones ejercieron efectos contrarios sobre la capacitación: la concentración picomolar disminuyó el porcentaje de espermatozoides no capacitados, mientras que la micromolar, lo aumentó. En cuanto a la isoforma eNOS, no se apreciaron cambios significativos en su localización en los espermatozoides incubados en condiciones capacitantes con y sin melatonina. Tampoco se observaron cambios en los niveles de ninguna isoforma de NOS cuando se cuantificaron densitométricamente tras el western blot.

Dado que la melatonina modificó la distribución de dos de las isoformas de NOS (nNOS e iNOS) durante la capacitación *in vitro*, podría esperarse que también tuviera un efecto final sobre los niveles de óxido nítrico. Sin embargo, **la presencia de melatonina durante la capacitación *in vitro*, tanto en medio TALP como con elevadores del AMPc, no redujo significativamente la producción de óxido nítrico en los espermatozoides ovinos**, como sí hicieron la L-arginina o el L-NAME. No obstante, el hecho de que esta hormona disminuyera, aunque no de forma estadísticamente significativa ($p = 0,06$), el porcentaje de espermatozoides con altos niveles de $\text{NO}\cdot$ en muestras capacitadas con agentes elevadores del AMPc a niveles similares a la muestra control (artículo 3), apoya una posible implicación de esta hormona en la regulación de la producción de $\text{NO}\cdot$ durante la capacitación.

Al inducir la capacitación espermática con EGF (como se explicará con más detalle en el siguiente apartado) la melatonina a concentración 1 μ M disminuyó, aunque no de manera significativa ($p = 0,07$), los niveles de $\text{NO}\cdot$ disparados por la L-arginina hasta niveles similares a los de las muestras control (artículo 4). Del mismo modo, **la melatonina a concentración micromolar fue capaz de inhibir el efecto de la L-arginina sobre el estado de capacitación y la reacción acrosómica**. Por el contrario, la combinación de melatonina 100 pM con L-arginina

no mostró ese leve papel antioxidante, y además promovió la reacción acrosómica al mismo nivel que la L-arginina por sí sola, sin potenciar su efecto, pero dando lugar a un leve descenso de la viabilidad. Estos efectos opuestos de la melatonina sobre los niveles de óxido nítrico podrían ser una consecuencia, una vez más, del efecto bimodal de esta hormona sobre la capacitación espermática en el morueco. Por otro lado, cuando se combinó melatonina 100 pM con el inhibidor de las NOS, el L-NAME, en los espermatozoides ovinos capacitados con EGF, el efecto descapacitante de este último (explicado en 6.2.4) desapareció, y además aumentó el porcentaje de espermatozoides que experimentaron la reacción acrosómica a niveles similares de los de las muestras sin L-NAME. Por otra parte, la melatonina empleada a la concentración descapacitante (1 μ M) no produjo un efecto sinérgico cuando se combinó con el L-NAME.

Teniendo en cuenta estos resultados, parece que **la melatonina también podría participar de alguna manera en la regulación de los niveles de óxido nítrico durante la capacitación *in vitro* con EGF**, ya que provoca el mismo efecto que el inhibidor de las NOS, el L-NAME, manteniendo los espermatozoides en un estado descapacitado. Por el contrario, **la melatonina a bajas concentraciones actúa de manera similar al precursor del NO \cdot , la L-arginina, promoviendo la reacción acrosómica**. El hecho de que no se observara una disminución de los niveles NO \cdot por el efecto de la melatonina durante la capacitación espermática *in vitro*, podría deberse a las limitaciones técnicas para evaluar los niveles de este compuesto, pues es una molécula de corta vida media (Donnelly *et al.*, 1997), y esto dificulta su detección, excepto cuando se forzó su producción con L-arginina. Aun así, **la melatonina a concentración 1 μ M sí que fue capaz de mitigar los efectos de la L-arginina**, reduciendo parcialmente la producción de NO \cdot provocada por este aminoácido, así como la reacción acrosómica.

6.2.6. Implicación del óxido nítrico y la melatonina sobre la apoptosis durante la capacitación *in vitro* inducida por EGF

Hace ya varios años, nuestro grupo de investigación evidenció que, además de la vía clásica mediada por el AMPc (vía AMPc/PKA), la capacitación *in vitro* en los espermatozoides ovinos se podía llevar a tras la unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) a su receptor (EGFR) y la posterior activación de la ruta de las MAPKs (Luna *et al.*, 2012; Luna *et al.*, 2017).

Esto hizo plantearnos si la melatonina, igual que es capaz de regular la capacitación espermática inducida por altos niveles de AMPc (Gimeno-Martos *et al.*, 2019), modularía la capacitación inducida por la unión del EGF a su receptor (vía EGF/EGFR).

Los **resultados obtenidos en la presente tesis doctoral confirmaron el efecto capacitante del EGF a concentración 100 nM** cuando se incubaron *in vitro* los espermatozoides ovinos, como había descrito Luna *et al.* (2012) previamente.

En cuanto a la acción de la melatonina, al igual que ocurre en la vía clásica, a concentración 1 μ M fue capaz de prevenir el efecto capacitante del EGF, mientras que a la concentración picomolar se potenció la reacción acrosómica y se redujo el porcentaje de espermatozoides no capacitados. Así, estos resultados demostraron que **la melatonina también ejerce un efecto bimodal sobre la capacitación espermática ovina inducida por el EGF *in vitro***. La melatonina podría ejercer este papel regulador a través del óxido nítrico, ya que, como se ha mencionado en el apartado anterior (6.2.5), tras la incubación en estas condiciones, disminuye los niveles de óxido nítrico inducidos por la L-arginina (artículo 4).

Uno de los mecanismos de acción del óxido nítrico en los espermatozoides podría ser mediante su interacción con moléculas de señalización como las MAPK (revisado en (Lopez, 2015; Staicu and Matás, 2017)). Entre estas MAPK se encuentran las quinasas JNK y p38, que se activan durante la capacitación *in vitro* de los espermatozoides ovinos mediada por el EGF (Luna *et al.*, 2012). Pero, además, estas quinasas están involucradas en procesos apoptóticos en los espermatozoides (Luna *et al.*, 2017), por lo que capacitación y apoptosis comparten rutas de señalización celular. Este hecho resulta lógico ya que la desestabilización, principalmente a nivel de las membranas plasmática y acrosomal, provocada por el proceso de capacitación, o bien culmina con la fecundación, en el caso de resultar exitosa, o con la muerte celular sin provocar respuesta inflamatoria, en el caso de no serlo. Por otro lado, la capacidad antiapoptótica de la melatonina descrita en estudios previos (Casao *et al.*, 2010b; Balao da Silva *et al.*, 2011), estaría relacionada con su efecto antioxidante a través la ruta las MAPKs (Kimball *et al.*, 2008; Espino *et al.*, 2011). Dada esta relación, resultaría de gran interés estudiar la implicación del óxido nítrico y de la melatonina en el proceso de apoptosis durante la capacitación espermática inducida por EGF (objetivo 2.3).

En el presente trabajo, el análisis de los marcadores apoptóticos tras la capacitación *in vitro* con EGF revelaron un aumento en la activación de caspasas y en la fragmentación del ADN. Así, se podría afirmar que **la capacitación *in vitro* inducida mediante el EGF genera cambios relacionados con la apoptosis en los espermatozoides ovinos**, de igual forma que otros estudios habían demostrado en otras condiciones capacitantes (Marti *et al.*, 2008b; Del Olmo *et al.*, 2016; Luna *et al.*, 2017). Además, esta idea fue reforzada por los resultados obtenidos tras los ensayos de *western blot*, que evidenciaron un aumento en la forma activa (fosforilada) de la MAPK JNK en las muestras capacitadas *in vitro*. Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de la MAPK p38 fosforilada durante el proceso de capacitación.

En cuanto al papel que tendría el óxido nítrico en el proceso de apoptosis, algunos estudios anteriores indicaron efectos contradictorios. Por un lado, se observó un aumento en la activación de las caspasas en presencia de NO· en espermatozoides de verraco (Moran *et al.*, 2008) y de humano (Lampiao *et al.*, 2014), mientras que por otro, Roessner *et al.*, (2010) concluyeron que había una correlación negativa entre la actividad de la NOS con la activación de las caspasas y la fragmentación del ADN en espermatozoides humanos. En esta tesis doctoral, el gran incremento en los niveles de óxido nítrico en los espermatozoides de morueco tras la adición de L-arginina en el medio de capacitación no provocó ningún cambio ni en los marcadores apoptóticos (caspasas y TUNEL) ni en la fosforilación de JNK y p38.

Dado que en esta tesis se ha demostrado que la melatonina regula la capacitación espermática inducida por el EGF, y la relación existente entre esta inducción de la capacitación y el aumento de algunos marcadores apoptóticos y la activación de algunas proteínas relacionadas con la apoptosis, quedaba por estudiar si la melatonina era capaz de inhibir la apoptosis inducida por la capacitación con EGF.

En este trabajo, **la melatonina no provocó ningún efecto significativo en la activación de caspasas ni en la fragmentación del ADN desencadenadas por la inducción de la capacitación con EGF**; sin embargo, a concentración 1 μM fue capaz de reducir la activación de JNK. Estos resultados contrastan con investigaciones previas que confirman el efecto antiapoptótico de la melatonina en células somáticas (Sainz *et al.*, 2003; Jou *et al.*, 2007), testículo de rata (Guneli *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009) y espermatozoides de conejo (Zhu *et al.*, 2019), humano (Zhao *et al.*, 2021) y morueco (Casao *et al.*, 2010b; Pool *et al.*, 2020b; Pool

et al., 2021). Con respecto al efecto sobre los espermatozoides, la aplicación de diferentes tratamientos e incubaciones para inducir la apoptosis en los trabajos mencionados anteriormente (choque térmico por frío y por calor, o distintas condiciones de capacitación), junto con la especificidad de especie, podrían explicar la falta de concordancia con nuestros resultados.

Resumiendo los resultados relacionados con el último objetivo de esta tesis doctoral, **la capacitación con EGF aumentó los niveles de óxido nítrico y el porcentaje de espermatozoides con caspasas activas y con daño en el ADN, además de la activación de la JNK.** Esto podría implicar que el citado aumento de marcadores apoptóticos estaría relacionado con el incremento en los niveles de NO·. A pesar de que el **óxido nítrico** estaría involucrado en la capacitación mediada por el EGF, el aumento de sus niveles por la adición de L-arginina **no dio lugar a ningún cambio importante relacionado con la apoptosis, ni sobre los marcadores apoptóticos ni sobre la activación de proteínas de la ruta de las MAPK.**

Como se ha mencionado anteriormente, la melatonina a altas concentraciones no redujo de manera significativa los niveles de NO· generados por la L-arginina, aunque fue capaz de reducir su efecto sobre la reacción acrosómica. Sin embargo, esto no parece estar relacionado con los eventos apoptóticos ni con la activación de las MAPKs JNK y p38. No obstante, la melatonina a concentración 1 μM sí que redujo la activación de JNK, lo que parece estar más relacionado con su acción descapacitante que con un efecto antiapoptótico, ya que, como se ha mencionado, los marcadores apoptóticos permanecieron invariables.

7 CONCLUSIONES

1. La melatonina a concentración 1 μ M ejerce cierto efecto quimiotáctico *in vitro* sobre los espermatozoides ovinos obtenidos en la época no reproductiva, en base al mayor porcentaje de recuperación obtenido al incluirla en la capa de recogida del *swim-up*, y al mayor índice quimiotáctico observado en las cámaras de quimiotaxis con espermatozoides capacitados con AMPc.
2. La melatonina, a concentración 100 pM, incrementa el porcentaje de espermatozoides recuperados por el método *swim-up*/dextrano, aunque este efecto estaría mediado por su efecto capacitante, más que por la quimioatracción.
3. La NADPH 5 oxidasa (NOX5) está presente en los espermatozoides ovinos de manera activa, y cambia su localización en la célula durante la capacitación espermática *in vitro*. Esta enzima es una fuente de producción de superóxidos en el espermatozoide ovino y está implicada en el proceso de capacitación.
4. Las tres isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) están presentes en los espermatozoides ovinos. El óxido nítrico intracelular generado por esta enzima aumenta durante la capacitación espermática inducida tanto en medio TALP solo, como con agentes elevadores de AMPc y con EGF, al mismo tiempo que algunas isoformas de la NOS cambian su localización.
5. La melatonina modifica la distribución de la NOX5 y previene el aumento en los niveles de superóxidos generados durante la capacitación *in vitro* mediada por alto AMPc en los espermatozoides ovinos.

6. La melatonina es capaz de modificar la redistribución de las NOS durante la capacitación espermática ovina mediada por alto AMPc, pero no modifica los niveles de expresión proteica de las NOS ni los niveles intracelulares de óxido nítrico significativamente.
7. Durante la capacitación *in vitro* con EGF la melatonina no reduce significativamente los niveles de óxido nítrico, pero a concentración micromolar es capaz de inhibir el efecto de la L-arginina sobre la reacción acrosómica.
8. El metabolismo del óxido nítrico no regula los procesos apoptóticos durante la capacitación espermática ovina mediada por el EGF.
9. La melatonina ejerce su efecto bimodal sobre la capacitación espermática ovina inducida por el EGF: a concentración picomolar promueve la reacción acrosómica mientras que a concentración micromolar actúa como descapacitante y limita la activación de la MAPK JNK, pero no es capaz de evitar el incremento de los marcadores apoptóticos.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia, J. A., J. A. Valares, F. Forcada, I. Palacín, S. Martín and A. Martino (2007). "The effect of melatonin on the reproductive performance of three sheep breeds in Spain." *Small Ruminant Research* **69**(1): 10-16.
- Acuña-Castroviejo, D., G. Escames, C. Venegas, M. E. Díaz-Casado, E. Lima-Cabello, L. C. López, S. Rosales-Corral, D. X. Tan and R. J. Reiter (2014). "Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions." *Cell Mol Life Sci* **71**(16): 2997-3025.
- Aitken, R. J. (2011). "The capacitation-apoptosis highway: oxysterols and mammalian sperm function." *Biol Reprod* **85**(1): 9-12.
- Aitken, R. J. and M. A. Baker (2013). "Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development." *Int J Dev Biol* **57**(2-4): 265-272.
- Aitken, R. J., H. M. Fisher, N. Fulton, E. Gomez, W. Knox, B. Lewis and S. Irvine (1997). "Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine." *Mol Reprod Dev* **47**(4): 468-482.
- Aitken, R. J. and A. J. Koppers (2011). "Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa." *Asian J Androl* **13**(1): 36-42.
- Aitken, R. J., M. Paterson, H. Fisher, D. W. Buckingham and M. van Duin (1995). "Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function." *J Cell Sci* **108** (Pt 5): 2017-2025.
- Alghamdi, A. S., B. J. Lovaas, S. L. Bird, G. C. Lamb, A. K. Rendahl, P. C. Taube and D. N. Foster (2009). "Species-specific interaction of seminal plasma on sperm-neutrophil binding." *Anim Reprod Sci* **114**(4): 331-344.
- Ali, M. A., Y. Wang, Z. Qin, X. Yuan, Y. Zhang and C. Zeng (2021). "Odorant and Taste Receptors in Sperm Chemotaxis and Cryopreservation: Roles and Implications in Sperm Capacitation, Motility and Fertility." *Genes (Basel)* **12**(4).
- Aller, J. F., D. Aguilar, T. Vera, G. P. Almeida and R. H. Alberio (2012). "Seasonal variation in sexual behavior, plasma testosterone and semen characteristics of Argentine Pampinta and Corriedale rams." *Spanish Journal of Agricultural Research* **10**(2).
- Almabhouh, F. A., K. Osman, S. F. Ibrahim, S. Gupalo, J. Gnanou, E. Ibrahim and H. J. Singh (2017). "Melatonin ameliorates the adverse effects of leptin on sperm." *Asian J Androl* **19**(6): 647-654.

- Almeida, C., M. Sousa and A. Barros (2009). "Phosphatidylserine translocation in human spermatozoa from impaired spermatogenesis." Reprod Biomed Online **19**(6): 770-777.
- Almog, T., S. Lazar, N. Reiss, N. Etkovitz, E. Milch, N. Rahamim, M. Dobkin-Bekman, R. Rotem, M. Kalina, J. Ramon, A. Raziell, H. Breitbart, R. Seger and Z. Naor (2008). "Identification of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 MAPK as regulators of human sperm motility and acrosome reaction and as predictors of poor spermatozoan quality." J Biol Chem **283**(21): 14479-14489.
- Almog, T. and Z. Naor (2010). "The role of Mitogen activated protein kinase (MAPK) in sperm functions." Mol Cell Endocrinol **314**(2): 239-243.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong and J. Yuan (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." Cell **87**(2): 171.
- Alquezar-Baeta, C., S. Gimeno-Martos, S. Miguel-Jimenez, P. Santolaria, J. Yaniz, I. Palacin, A. Casao, J. A. Cebrian-Perez, T. Muino-Blanco and R. Perez-Pe (2019). "OpenCASA: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis." PLoS Comput Biol **15**(1): e1006691.
- Altenhofer, S., K. A. Radermacher, P. W. Kleikers, K. Wingler and H. H. Schmidt (2015). "Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement." Antioxid Redox Signal **23**(5): 406-427.
- Alvarez, J. G., J. L. Lasso, L. Blasco, R. C. Nunez, S. Heyner, P. P. Caballero and B. T. Storey (1993). "Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime." Hum Reprod **8**(7): 1087-1092.
- Anzar, M., L. He, M. M. Buhr, T. G. Kroetsch and K. P. Pauls (2002). "Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility." Biol Reprod **66**(2): 354-360.
- Appiah, M. O., B. He, W. Lu and J. Wang (2019). "Antioxidative effect of melatonin on cryopreserved chicken semen." Cryobiology **89**: 90-95.
- Aquila, S., F. Giordano, C. Guido, V. Rago and A. Carpino (2011). "Nitric oxide involvement in the acrosome reaction triggered by leptin in pig sperm." Reprod Biol Endocrinol **9**: 133.
- Arends, M. J., R. G. Morris and A. H. Wyllie (1990). "Apoptosis. The role of the endonuclease." Am J Pathol **136**(3): 593-608.

- Asadi, A., R. Ghahremani, A. Abdolmaleki and F. Rajaei (2021). "Role of sperm apoptosis and oxidative stress in male infertility: A narrative review." International journal of reproductive biomedicine **19**(6): 493-504.
- Ashrafi, I., H. Kohram and F. F. Ardabili (2013). "Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa." Anim Reprod Sci **139**(1-4): 25-30.
- Austin, C. R. (1951). "Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg." Aust J Sci Res B **4**(4): 581-596.
- Austin, C. R. (1952). "The capacitation of the mammalian sperm." Nature **170**(4321): 326.
- Austin, C. R. and M. W. Bishop (1958). "Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization." Proc R Soc Lond B Biol Sci **149**(935): 241-248.
- Avdi, M., G. Banos, K. Stefos and P. Chemineau (2004). "Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams." Theriogenology **62**(1): 275-282.
- Awad, H., F. Halawa, T. Mostafa and H. Atta (2006). "Melatonin hormone profile in infertile males." Int J Androl **29**(3): 409-413.
- Awda, B. J. and M. M. Buhr (2010). "Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) pathway and reactive oxygen species regulate tyrosine phosphorylation in capacitating boar spermatozoa." Biol Reprod **83**(5): 750-758.
- Ayoub, M. A., A. Levoe, P. Delagrange and R. Jockers (2004). "Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers." Mol Pharmacol **66**(2): 312-321.
- Bahat, A., I. Tur-Kaspa, A. Gakamsky, L. C. Giojalas, H. Breitbart and M. Eisenbach (2003). "Thermotaxis of mammalian sperm cells: a potential navigation mechanism in the female genital tract." Nat Med **9**(2): 149-150.
- Bailey, J. L. (2010). "Factors regulating sperm capacitation." Syst Biol Reprod Med **56**(5): 334-348.
- Baker, M. A., L. Hetherington, H. Ecroyd, S. D. Roman and R. J. Aitken (2004). "Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation." J Cell Sci **117**(Pt 2): 211-222.
- Balao da Silva, C. M., B. Macías-García, A. Miró-Morán, L. González-Fernández, A. Morillo-Rodríguez, C. Ortega-Ferrusola, J. M. Gallardo-Bolaños, G. Stilwell, J. A. Tapia and F. J.

- Peña (2011). "Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa." Journal of Pineal Research **51**(2): 172-179.
- Balbach, M., H. Hamzeh, J. F. Jikeli, C. Brenker, C. Schiffer, J. N. Hansen, P. Neugebauer, C. Trotschel, L. Jovine, L. Han, H. M. Florman, U. B. Kaupp, T. Strunker and D. Wachten (2020). "Molecular Mechanism Underlying the Action of Zona-pellucida Glycoproteins on Mouse Sperm." Front Cell Dev Biol **8**: 572735.
- Baldi, E., M. Luconi, M. Muratori, S. Marchiani, L. Tamburrino and G. Forti (2009). "Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions." Mol Cell Endocrinol **308**(1-2): 39-46.
- Balercia, G., T. Armeni, F. Mantero, G. Principato and F. Regoli (2003). "Total oxyradical scavenging capacity toward different reactive oxygen species in seminal plasma and sperm cells." Clin Chem Lab Med **41**(1): 13-19.
- Ball, B. A., V. Medina, C. G. Gravance and J. Baumbe (2001). "Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C." Theriogenology **56**(4): 577-589.
- Banfi, B., G. Molnar, A. Maturana, K. Steger, B. Hegedus, N. Demaurex and K. H. Krause (2001). "A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes." J Biol Chem **276**(40): 37594-37601.
- Banfi, B., F. Tirone, I. Durussel, J. Knisz, P. Moskwa, G. Z. Molnar, K. H. Krause and J. A. Cox (2004). "Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5)." J Biol Chem **279**(18): 18583-18591.
- Barratt, C. L. and I. D. Cooke (1991). "Sperm transport in the human female reproductive tract-a dynamic interaction." Int J Androl **14**(6): 394-411.
- Barroso, G., M. Morshedi and S. Oehninger (2000). "Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa." Hum Reprod **15**(6): 1338-1344.
- Battistone, M. A., V. G. Da Ros, A. M. Salicioni, F. A. Navarrete, D. Krapf, P. E. Visconti and P. S. Cuasnicu (2013). "Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases." Mol Hum Reprod **19**(9): 570-580.
- Bedard, K. and K. H. Krause (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." Physiol Rev **87**(1): 245-313.

- Benítez-King, G. (2006). "Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease." J Pineal Res **40**(1): 1-9.
- Benítez-King, G., M. E. Hernández, R. Tovar and G. Ramírez (2001). "Melatonin activates PKC-alpha but not PKC-epsilon in N1E-115 cells." Neurochem Int **39**(2): 95-102.
- Bhagwat, S., S. Sontakke, S. Desai, D. Panchal, S. Jadhav and P. Parte (2021). "N-formyl-l-aspartate: A novel sperm chemoattractant identified in ovulatory phase oviductal fluid using a microfluidic chip." Andrology **9**(4): 1214-1226.
- Bhalothia, S. K., J. S. Mehta, T. Kumar, C. Prakash, T. R. Talluri, R. S. Pal and A. Kumar (2022). "Melatonin and canthaxanthin enhances sperm viability and protect ram spermatozoa from oxidative stress during liquid storage at 4°C." Andrologia **54**(1): e14304.
- Bian, F., G. Mao, M. Guo, G. Mao, J. Wang, J. Li, Y. Han, X. Chen, M. Zhang and G. Xia (2012). "Gradients of natriuretic peptide precursor A (NPPA) in oviduct and of natriuretic peptide receptor 1 (NPR1) in spermatozoon are involved in mouse sperm chemotaxis and fertilization." J Cell Physiol **227**(5): 2230-2239.
- Bilodeau, J. F., S. Blanchette, C. Gagnon and M. A. Sirard (2001). "Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen." Theriogenology **56**(2): 275-286.
- Bittman, E. L., R. J. Dempsey and F. J. Karsch (1983). "Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe." Endocrinology **113**(6): 2276-2283.
- Björkgren, I. and P. Sipilä (2019). "The impact of epididymal proteins on sperm function." Reproduction **158**(5): R155-r167.
- Boerke, A., P. S. Tsai, N. Garcia-Gil, I. A. Brewis and B. M. Gadella (2008). "Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction." Theriogenology **70**(8): 1188-1196.
- Bohmer, M., Q. Van, I. Weyand, V. Hagen, M. Beyermann, M. Matsumoto, M. Hoshi, E. Hildebrand and U. B. Kaupp (2005). "Ca²⁺ spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm." EMBO J **24**(15): 2741-2752.
- Bordt, S. L., R. M. McKeon, P. K. Li, P. A. Witt-Enderby and M. A. Melan (2001). "N1E-115 mouse neuroblastoma cells express MT1 melatonin receptors and produce neurites in response to melatonin." Biochim Biophys Acta **1499**(3): 257-264.
- Boutin, J. A., V. Audinot, G. Ferry and P. Delagrangé (2005). "Molecular tools to study melatonin pathways and actions." Trends Pharmacol Sci **26**(8): 412-419.

- Braun, T. and R. F. Dods (1975). "Development of a Mn-2+-sensitive, "soluble" adenylate cyclase in rat testis." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(3): 1097-1101.
- Breiningger, E., P. D. Cetica and M. T. Beconi (2010). "Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm." Theriogenology **74**(6): 1036-1049.
- Breitbart, H. (2002). "Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction." Molecular and Cellular Endocrinology **187**(1): 139-144.
- Breitbart, H. and N. Etkovitz (2011). "Role and regulation of EGFR in actin remodeling in sperm capacitation and the acrosome reaction." Asian J Androl **13**(1): 106-110.
- Breitbart, H. and M. Finkelstein (2018). "Actin cytoskeleton and sperm function." Biochem Biophys Res Commun **506**(2): 372-377.
- Breitbart, H., J. Lax, R. Rotem and Z. Naor (1992). "Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa." Biochem J **281 (Pt 2)**: 473-476.
- Breitbart, H. and B. Spungin (1997). "The biochemistry of the acrosome reaction." Mol Hum Reprod **3**(3): 195-202.
- Brigelius-Flohe, R. and M. Maiorino (2013). "Glutathione peroxidases." Biochim Biophys Acta **1830**(5): 3289-3303.
- Brooks, D. E. (1983). "Epididymal functions and their hormonal regulation." Aust J Biol Sci **36**(3): 205-221.
- Brzezinski, A., M. M. Seibel, H. J. Lynch, M. H. Deng and R. J. Wurtman (1987). "Melatonin in human preovulatory follicular fluid." J Clin Endocrinol Metab **64**(4): 865-867.
- Buffone, M. G., E. V. Wertheimer, P. E. Visconti and D. Krapf (2014). "Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology." Biochim Biophys Acta **1842**(12 Pt B): 2610-2620.
- Burnaugh, L., K. Sabeur and B. A. Ball (2007). "Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium." Theriogenology **67**(3): 580-589.
- Buzadzic, B., M. Vucetic, A. Jankovic, A. Stancic, A. Korac, B. Korac and V. Otasevic (2015). "New insights into male (in)fertility: the importance of NO." Br J Pharmacol **172**(6): 1455-1467.

- Cardinali, D. P. and J. M. Rosner (1971). "Retinal localization of the hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the rat." Endocrinology **89**(1): 301-303.
- Cardozo, J. A., M. Fernandez-Juan, F. Forcada, A. Abecia, T. Muino-Blanco and J. A. Cebrian-Perez (2006). "Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis." Theriogenology **66**(4): 841-850.
- Carlson, A. E., R. E. Westenbroek, T. Quill, D. Ren, D. E. Clapham, B. Hille, D. L. Garbers and D. F. Babcock (2003). "CatSper1 required for evoked Ca²⁺ entry and control of flagellar function in sperm." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 14864-14868.
- Carrillo-Vico, A., R. J. Reiter, P. J. Lardone, J. L. Herrera, R. Fernandez-Montesinos, J. M. Guerrero and D. Pozo (2006). "The modulatory role of melatonin on immune responsiveness." Curr Opin Investig Drugs **7**(5): 423-431.
- Carvajal-Serna, M., M. Fatnassi, F. Torres-Ruda, J. A. Cardozo, H. Grajales-Lombana, M. Hammadi, J. A. Abecia, T. Muino-Blanco, R. Perez-Pe, J. A. Cebrian-Perez and A. Casao (2020a). "Vasectomy and Photoperiodic Regimen Modify the Protein Profile, Hormonal Content and Antioxidant Enzymes Activity of Ram Seminal Plasma." Int J Mol Sci **21**(21).
- Carvajal-Serna, M., E. Neira-Rivera, J. A. Cardozo, H. Grajales-Lombana, J. A. Cebrian-Perez, T. Muino-Blanco, R. Perez-Pe and A. Casao (2020b). "Melatonin membrane receptors MT1 and MT2 are expressed in ram spermatozoa from non-seasonal breeds." Trop Anim Health Prod **52**(5): 2549-2557.
- Carvajal-Serna, M., M. Paesa, J. Barale, S. Gimeno-Martos, V. Peña-Delgado, S. Miguel-Jiménez, A. Casao and R. Pérez-Pe (2020c). Effect of melatonin on actin and α -tubulin distribution related to in vitro capacitation in ram sperm. Proceedings of the 12th Biennial Conference of the Association for Applied Animal Andrology (AAAA), Animal Reproduction Science. **220**: 106363.
- Casao, A., I. Cebrian, M. E. Asumpcao, R. Perez-Pe, J. A. Abecia, F. Forcada, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (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., M. Gallego, J. A. Abecia, F. Forcada, R. Perez-Pe, T. Muino-Blanco and J. A. Cebrian-Perez (2012). "Identification and immunolocalisation of melatonin MT(1) and MT(2) receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa." Reprod Fertil Dev **24**(7): 953-961.
- Casao, A., N. Mendoza, R. Perez-Pe, P. Grasa, J. A. Abecia, F. Forcada, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2010b). "Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate." J Pineal Res **48**(1): 39-46.

- Caswell, A. H. and J. D. Hutchison (1971). "Selectivity of cation chelation to tetracyclines: evidence for special conformation of calcium chelate." Biochem Biophys Res Commun **43**(3): 625-630.
- Cebrián-Pérez, J., A. Casao, M. González-Arto, T. dos Santos Hamilton, R. Pérez-Pé and T. Muiño-Blanco (2014). "Melatonin in Sperm Biology: Breaking Paradigms." Reproduction in Domestic Animals **49**(s4): 11-21.
- Chaki, S. P. and M. M. Misro (2002). "Assessment of human sperm function after hydrogen peroxide exposure. development of a vaginal contraceptive." Contraception **66**(3): 187-192.
- Chan, A. S., F. P. Lai, R. K. Lo, T. A. Voyno-Yasenetskaya, E. J. Stanbridge and Y. H. Wong (2002). "Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins." Cell Signal **14**(3): 249-257.
- Chang, M. C. (1951). "Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes." Nature **168**(4277): 697-698.
- Chang, M. C. (1955). "Development of Fertilizing Capacity of Rabbit Spermatozoa in the Uterus." Nature **175**(4467): 1036-1037.
- Chaudhry, P. S. and E. R. Casillas (1988). "Calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases in plasma membranes of bovine epididymal spermatozoa." Arch Biochem Biophys **262**(2): 439-444.
- Cheeseman, K. H. and T. F. Slater (1993). "An introduction to free radical biochemistry." Br Med Bull **49**(3): 481-493.
- Chemineau, P., D. Guillaume, M. Migaud, J. C. Thiery, M. T. Pellicer-Rubio and B. Malpoux (2008). "Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications." Reprod Domest Anim **43** Suppl 2: 40-47.
- Chen, H., P. H. Chow, S. K. Cheng, A. L. Cheung, L. Y. Cheng and W. S. O (2003). "Male genital tract antioxidant enzymes: their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster." J Androl **24**(5): 704-711.
- Chen, X. J., Y. Zhang, G. X. Jia, Q. G. Meng, T. D. Bunch, G. S. Liu, S. E. Zhu and G. B. Xhou (2016). "Effect of melatonin supplementation on cryopreserved sperm quality in mouse." Cryo Letters **37**(2): 115-122.
- Cheng, G., Z. Cao, X. Xu, E. G. van Meir and J. D. Lambeth (2001). "Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5." Gene **269**(1-2): 131-140.

- Cho, C.-L. and A. Agarwal (2018). "Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review." Arab Journal of Urology **16**(1): 21-34.
- Clarke, I. J. and J. T. Cummins (1985). "GnRH pulse frequency determines LH pulse amplitude by altering the amount of releasable LH in the pituitary glands of ewes." J Reprod Fertil **73**(2): 425-431.
- Claustrat, B., J. Brun and G. Chazot (2005). "The basic physiology and pathophysiology of melatonin." Sleep Med Rev **9**(1): 11-24.
- Cohen-Dayag, A., I. Tur-Kaspa, J. Dor, S. Mashiach and M. Eisenbach (1995). "Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11039-11043.
- Colas, C., P. James, L. Howes, R. Jones, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2008). "Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation." Reprod Fertil Dev **20**(6): 649-658.
- Collins, J. A., C. A. Schandi, K. K. Young, J. Vesely and M. C. Willingham (1997). "Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis." J Histochem Cytochem **45**(7): 923-934.
- Cooper, T. G. (1998). "Interactions between epididymal secretions and spermatozoa." J Reprod Fertil Suppl **53**: 119-136.
- Costello, S., F. Michelangeli, K. Nash, L. Lefievre, J. Morris, G. Machado-Oliveira, C. Barratt, J. Kirkman-Brown and S. Publicover (2009). "Ca²⁺-stores in sperm: their identities and functions." Reproduction **138**(3): 425-437.
- Cowan, K. J. and K. B. Storey (2003). "Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress." J Exp Biol **206**(Pt 7): 1107-1115.
- Crepieux, P., S. Marion, N. Martinat, V. Fafeur, Y. L. Vern, D. Kerboeuf, F. Guillou and E. Reiter (2001). "The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation." Oncogene **20**(34): 4696-4709.
- Cross, N. L. (1998). "Role of cholesterol in sperm capacitation." Biol Reprod **59**(1): 7-11.
- Cummins, J. M., S. M. Pember, A. M. Jequier, J. L. Yovich and P. E. Hartmann (1991). "A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other seminal parameters." J Androl **12**(2): 98-103.
- D'Alessandro, A. G. and G. Martemucci (2003). "Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram." Anim Reprod Sci **79**(1-2): 93-102.

- D'Occhio, M. J., B. D. Schanbacher and J. E. Kinder (1984). "Profiles of Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone, Testosterone and Prolactin in Rams of Diverse Breeds: Effects of Contrasting Short (8L:16D) and Long (16L:8D) Photoperiods1." Biology of Reproduction **30**(5): 1039-1054.
- Damjanov, I., D. Solter and B. Knowles (1993). "Functional epidermal growth factor receptor localizes to the postacrosomal region of human spermatozoa." Biochemical and biophysical research communications **190**(3): 901-906.
- Daniel, L., N. Etkovitz, S. R. Weiss, S. Rubinstein, D. Ickowicz and H. Breitbart (2010). "Regulation of the sperm EGF receptor by ouabain leads to initiation of the acrosome reaction." Dev Biol **344**(2): 650-657.
- Davis, B. K. (1981). "Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7560-7564.
- Davis, B. K., R. Byrne and B. Hungund (1979). "Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro." Biochim Biophys Acta **558**(3): 257-266.
- de Andrade, A. F. C., R. P. Arruda, M. A. Torres, N. C. G. Pieri, T. G. Leite, E. C. C. Celeghini, L. Z. Oliveira, T. P. Gardes, M. C. C. Bussiere and D. F. Silva (2018). "Nitric oxide in frozen-thawed equine sperm: Effects on motility, membrane integrity and sperm capacitation." Anim Reprod Sci **195**: 176-184.
- de Lamirande, E. and C. Gagnon (1993). "Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process." Free Radic Biol Med **14**(2): 157-166.
- de Lamirande, E. and C. Gagnon (1995). "Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects." Hum Reprod **10 Suppl 1**: 15-21.
- de Lamirande, E. and C. Gagnon (2002). "The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion." Mol Hum Reprod **8**(2): 124-135.
- de Lamirande, E. and G. Lamothe (2009). "Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation." Free Radic Biol Med **46**(4): 502-510.
- de Lamirande, E. and C. O'Flaherty (2008). "Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics **1784**(1): 106-115.

- de Vries, K. J., T. Wiedmer, P. J. Sims and B. M. Gadella (2003). "Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells." Biol Reprod **68**(6): 2122-2134.
- Del Olmo, E., O. García-Álvarez, A. Maroto-Morales, M. Ramón, P. Jiménez-Rabadán, M. Iniesta-Cuerda, L. Anel-Lopez, F. Martinez-Pastor, A. J. Soler, J. J. Garde and M. R. Fernández-Santos (2016). "Estrous sheep serum enables in vitro capacitation of ram spermatozoa while preventing caspase activation." Theriogenology **85**(2): 351-360.
- Demarco, I. A., F. Espinosa, J. Edwards, J. Sosnik, J. L. De La Vega-Beltran, J. W. Hockensmith, G. S. Kopf, A. Darszon and P. E. Visconti (2003). "Involvement of a Na⁺/HCO₃ cotransporter in mouse sperm capacitation." J Biol Chem **278**(9): 7001-7009.
- Desnoyers, L. and P. Manjunath (1992). "Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid." J Biol Chem **267**(14): 10149-10155.
- Devitt, A. and L. J. Marshall (2011). "The innate immune system and the clearance of apoptotic cells." J Leukoc Biol **90**(3): 447-457.
- Doherty, C. M., S. M. Tarchala, E. Radwanska and C. J. De Jonge (1995). "Characterization of two second messenger pathways and their interactions in eliciting the human sperm acrosome reaction." J Androl **16**(1): 36-46.
- Dominguez, E. M., A. Moreno-Irusta, H. A. Guidobaldi, H. Tribulo and L. C. Giojalas (2018). "Improved bovine in vitro embryo production with sexed and unsexed sperm selected by chemotaxis." Theriogenology **122**: 1-8.
- Donnelly, E. T., S. E. Lewis, W. Thompson and U. Chakravarthy (1997). "Sperm nitric oxide and motility: the effects of nitric oxide synthase stimulation and inhibition." Mol Hum Reprod **3**(9): 755-762.
- Doolen, S., D. N. Krause, M. L. Dubocovich and S. P. Duckles (1998). "Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle." Eur J Pharmacol **345**(1): 67-69.
- Drevet, J. R. (2006). "The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story." Mol Cell Endocrinol **250**(1-2): 70-79.
- Druart, X., J. P. Rickard, S. Mactier, P. L. Kohnke, C. M. Kershaw-Young, R. Bathgate, Z. Gibb, B. Crossett, G. Tsikis, V. Labas, G. Harichaux, C. G. Grupen and S. P. de Graaf (2013). "Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma." Journal of Proteomics **91**: 13-22.

- du Plessis, S. S., K. Hagenaar and F. Lampiao (2010). "The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS." Andrologia **42**(2): 112-116.
- Dubocovich, M. L., P. Delagrangé, D. N. Krause, D. Sugden, D. P. Cardinali and J. Olcese (2010). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors." Pharmacol Rev **62**(3): 343-380.
- Dubocovich, M. L. and M. Markowska (2005). "Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals." Endocrine **27**(2): 101-110.
- Dubocovich, M. L., K. Yun, W. M. Al-Ghoul, S. Benloucif and M. I. Masana (1998). "Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms." FASEB J **12**(12): 1211-1220.
- Duru, N. K., M. Morshedi, A. Schuffner and S. Oehninger (2001). "Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine." Fertil Steril **75**(2): 263-268.
- Dutta, S., A. Majzoub and A. Agarwal (2019). "Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management." Arab J Urol **17**(2): 87-97.
- Ebisawa, T., S. Karne, M. R. Lerner and S. M. Reppert (1994). "Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(13): 6133-6137.
- Eddy, E. M. (2006). Chapter 1 - The Spermatozoon. Gamete Biology Section, Laboratory of Reproductive and Developmental Toxicology, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Research Triangle Park, North Carolina. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition). J. D. Neill. St Louis, Academic Press: 3-54.
- Eghbali, M., S. M. Alavi-Shoushtari and S. A. Rezaii (2008). "Effects of copper and superoxide dismutase content of seminal plasma on buffalo semen characteristics." Pak J Biol Sci **11**(15): 1964-1968.
- Eisenbach, M. (1999a). "Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation." Dev Genet **25**(2): 87-94.
- Eisenbach, M. (1999b). "Sperm chemotaxis." Rev Reprod **4**(1): 56-66.
- Eisenbach, M. (2003). "Why are sperm cells phagocytosed by leukocytes in the female genital tract?" Med Hypotheses **60**(4): 590-592.

- El-Raey, M., M. Geshi, T. Somfai, M. Kaneda, M. Hirako, A. E. Abdel-Ghaffar, G. A. Sosa, M. E. El-Roos and T. Nagai (2011). "Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle." Mol Reprod Dev **78**(4): 250-262.
- El-Shalofy, A., M. Hedia and J. Kastelic (2021). "Melatonin improves testicular haemodynamics, echotexture and testosterone production in Ossimi rams during the breeding season." Reprod Domest Anim **56**(11): 1456-1463.
- Ellis, R. E. and H. R. Horvitz (1991). "Two *C. elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx." Development **112**(2): 591-603.
- Espino, J., A. Ortiz, I. Bejarano, G. M. Lozano, F. Monllor, J. F. Garcia, A. B. Rodriguez and J. A. Pariente (2011). "Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor- and extracellular signal-regulated kinase-mediated pathways." Fertil Steril **95**(7): 2290-2296.
- Etkovitz, N., Y. Tirosh, R. Chazan, Y. Jaldety, L. Daniel, S. Rubinstein and H. Breitbart (2009). "Bovine sperm acrosome reaction induced by G-protein-coupled receptor agonists is mediated by epidermal growth factor receptor transactivation." Dev Biol **334**(2): 447-457.
- Fabro, G., R. A. Rovasio, S. Civalero, A. Frenkel, S. R. Caplan, M. Eisenbach and L. C. Giojalas (2002). "Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel directionality-based assay." Biol Reprod **67**(5): 1565-1571.
- Fadok, V. A., J. S. Savill, C. Haslett, D. L. Bratton, D. E. Doherty, P. A. Campbell and P. M. Henson (1992). "Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells." J Immunol **149**(12): 4029-4035.
- Fang, Y., C. Zhao, H. Xiang, X. Zhao and R. Zhong (2019). "Melatonin Inhibits Formation of Mitochondrial Permeability Transition Pores and Improves Oxidative Phosphorylation of Frozen-Thawed Ram Sperm." Front Endocrinol (Lausanne) **10**: 896.
- Finkelstein, M., N. Etkovitz and H. Breitbart (2010). "Role and regulation of sperm gelsolin prior to fertilization." J Biol Chem **285**(51): 39702-39709.
- Flesch, F. M. and B. M. Gadella (2000). "Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization." Biochim Biophys Acta **1469**(3): 197-235.
- Florman, H. M., M. K. Jungnickel and K. A. Sutton (2008). "Regulating the acrosome reaction." Int J Dev Biol **52**(5-6): 503-510.

- FrancaVilla, F., R. Santucci, B. Macerola, G. Ruvolo and R. Romano (2000). "Nitric oxide synthase inhibition in human sperm affects sperm-oocyte fusion but not zona pellucida binding." Biol Reprod **63**(2): 425-429.
- Frungieri, M. B., A. Mayerhofer, K. Zitta, O. P. Pignataro, R. S. Calandra and S. I. Gonzalez-Calvar (2005). "Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system." Endocrinology **146**(3): 1541-1552.
- Funahashi, H. (2002). "Induction of capacitation and the acrosome reaction of boar spermatozoa by L-arginine and nitric oxide synthesis associated with the anion transport system." Reproduction **124**(6): 857-864.
- Furuya, S., Y. Endo, M. Oba, Y. Matsui, S. Suzuki and S. Nozawa (1994). "Effect of epidermal growth factor on mouse sperm acrosome reaction induced by zona pellucida." Am J Reprod Immunol **31**(2-3): 116-122.
- Furuya, S., Y. Endo, M. Oba, S. Suzuki and S. Nozawa (1993). "Effect of epidermal growth factor on human sperm capacitation." Fertil Steril **60**(5): 905-910.
- Gadella, B. M. and R. A. Harrison (2000). "The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane." Development **127**(11): 2407-2420.
- Gadella, B. M. and R. A. Harrison (2002). "Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells." Biol Reprod **67**(1): 340-350.
- Gadella, B. M. and C. Luna (2014). "Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface." Theriogenology **81**(1): 74-84.
- Gakamsky, A., L. Armon and M. Eisenbach (2009). "Behavioral response of human spermatozoa to a concentration jump of chemoattractants or intracellular cyclic nucleotides." Hum Reprod **24**(5): 1152-1163.
- Galano, A., D. X. Tan and R. J. Reiter (2013). "On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK." J Pineal Res **54**(3): 245-257.
- Garbers, D. L., D. J. Tubb and R. V. Hyne (1982). "A requirement of bicarbonate for Ca²⁺-induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa." J Biol Chem **257**(15): 8980-8984.

- García-López, N., M. Ollero, T. Muiño-Blanco and J. A. Cebrián-Pérez (1996). "A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma." Theriogenology **46**(1): 141-151.
- Garg, A., A. Kumaresan and M. R. Ansari (2009). "Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on fresh and cryopreserved buffalo sperm functions during incubation at 37 degrees C in vitro." Reprod Domest Anim **44**(6): 907-912.
- Garrington, T. P. and G. L. Johnson (1999). "Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways." Curr Opin Cell Biol **11**(2): 211-218.
- Gatica, L. V., H. A. Guidobaldi, M. M. Montesinos, M. E. Teves, A. I. Moreno, D. R. Uñates, R. I. Molina and L. C. Giojalas (2013). "Picomolar gradients of progesterone select functional human sperm even in subfertile samples." Mol Hum Reprod **19**(9): 559-569.
- Gautier, C., S.-P. Guenin, I. Riest-Fery, T. J. Perry, C. Legros, O. Nosjean, V. Simonneaux, F. Grützner and J. A. Boutin (2018). "Characterization of the Mel1c melatonergic receptor in platypus (*Ornithorhynchus anatinus*)." PloS one **13**(3): e0191904-e0191904.
- Gerlach, T. and J. E. Aurich (2000). "Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster." Anim Reprod Sci **58**(3-4): 197-213.
- Gerton, G. L. (2002). 8 - Function of the Sperm Acrosome. Fertilization. D. M. Hardy. San Diego, Academic Press: 265-302.
- Ghanbari, H., S. Keshtgar and M. Kazeroni (2018). "Inhibition of the CatSper Channel and NOX5 Enzyme Activity Affects the Functions of the Progesterone-Stimulated Human Sperm." Iran J Med Sci **43**(1): 18-25.
- Ghani, E., S. Keshtgar, M. Habibagahi, A. Ghannadi and M. Kazeroni (2013). "Expression of NOX5 in human teratozoospermia compared to normozoospermia." Andrologia **45**(5): 351-356.
- Gibson, J. F., D. J. Ingram and P. Nicholls (1958). "Free radical produced in the reaction of myoglobin with hydrogen peroxide." Nature **181**(4620): 1398-1399.
- Gil, P. I., H. A. Guidobaldi, M. E. Teves, D. R. Uñates, R. Sanchez and L. C. Giojalas (2008). "Chemotactic response of frozen-thawed bovine spermatozoa towards follicular fluid." Anim Reprod Sci **108**(1-2): 236-246.
- Gillan, L., G. Evans and W. M. Maxwell (1997). "Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa." Reprod Fertil Dev **9**(5): 481-487.

- Gimeno-Martos, S., A. Casao, M. Yeste, J. A. Cebrian-Perez, T. Muino-Blanco and R. Perez-Pe (2019). "Melatonin reduces cAMP-stimulated capacitation of ram spermatozoa." Reprod Fertil Dev **31**(2): 420-431.
- Gimeno-Martos, S., M. Gonzalez-Arto, A. Casao, M. Gallego, J. A. Cebrian-Perez, T. Muino-Blanco and R. Perez-Pe (2017). "Steroid hormone receptors and direct effects of steroid hormones on ram spermatozoa." Reproduction **154**(4): 469-481.
- Giojalas, L., H. Guidobaldi and R. Sanchez (2015). Sperm Chemotaxis in Mammals, In book: Flagellar Mechanics and Sperm Guidance. Flagellar Mechanics and Sperm Guidance. J. J. Cosson, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS: 272-307.
- Giojalas, L. C. and R. A. Rovasio (1998). "Mouse spermatozoa modify their motility parameters and chemotactic response to factors from the oocyte microenvironment." Int J Androl **21**(4): 201-206.
- Gonzalez-Arto, M., D. Aguilar, E. Gaspar-Torruibia, M. Gallego, M. Carvajal-Serna, L. V. Herrera-Marcos, E. Serrano-Blesa, T. R. Hamilton, R. Perez-Pe, T. Muino-Blanco, J. A. Cebrian-Perez and A. Casao (2017). "Melatonin MT(1) and MT(2) Receptors in the Ram Reproductive Tract." Int J Mol Sci **18**(3).
- Gonzalez-Arto, M., T. R. Hamilton, M. Gallego, E. Gaspar-Torruibia, D. Aguilar, E. Serrano-Blesa, J. A. Abecia, R. Perez-Pe, T. Muino-Blanco, J. A. Cebrian-Perez and A. Casao (2016a). "Evidence of melatonin synthesis in the ram reproductive tract." Andrology **4**(1): 163-171.
- Gonzalez-Arto, M., C. Luna, R. Pérez-Pé, T. Muiño-Blanco, J. A. Cebrián-Pérez and A. Casao (2016b). "New evidence of melatonin receptor contribution to ram sperm functionality." Reproduction, Fertility and Development **28**(7): 924-935.
- Gonzalez-Arto, M., A. Vicente-Carrillo, F. Martinez-Pastor, E. Fernandez-Alegre, J. Roca, J. Miro, T. Rigau, J. E. Rodriguez-Gil, R. Perez-Pe, T. Muino-Blanco, J. A. Cebrian-Perez and A. Casao (2016c). "Melatonin receptors MT1 and MT2 are expressed in spermatozoa from several seasonal and nonseasonal breeder species." Theriogenology **86**(8): 1958-1968.
- Gorczyca, W., F. Traganos, H. Jesionowska and Z. Darzynkiewicz (1993). "Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells." Exp Cell Res **207**(1): 202-205.
- Goujon, M., H. McWilliam, W. Li, F. Valentin, S. Squizzato, J. Paern and R. Lopez (2010). "A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI." Nucleic Acids Research **38**(suppl_2): W695-W699.

- Grasa, P., J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2006). "Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation." Reproduction **132**(5): 721-732.
- Grasa, P., R. Perez-Pe, O. Baguena, F. Forcada, A. Abecia, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2004). "Ram sperm selection by a dextran/swim-up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes." J Androl **25**(6): 982-990.
- Griveau, J. F., P. Renard and D. Le Lannou (1995). "Superoxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophore-induced acrosome reaction process." Int J Androl **18**(2): 67-74.
- Gronborg, M., T. Z. Kristiansen, A. Stensballe, J. S. Andersen, O. Ohara, M. Mann, O. N. Jensen and A. Pandey (2002). "A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate." Mol Cell Proteomics **1**(7): 517-527.
- Grunewald, S., R. Sharma, U. Paasch, H. J. Glander and A. Agarwal (2009). "Impact of caspase activation in human spermatozoa." Microsc Res Tech **72**(11): 878-888.
- Guidobaldi, H. A., N. Hirohashi, M. Cubilla, M. G. Buffone and L. C. Giojalas (2017). "An intact acrosome is required for the chemotactic response to progesterone in mouse spermatozoa." Mol Reprod Dev **84**(4): 310-315.
- Guidobaldi, H. A., M. E. Teves, D. R. Uñates, A. Anastasía and L. C. Giojalas (2008). "Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex." PLoS One **3**(8): e3040.
- Guneli, E., K. Tugyan, H. Ozturk, M. Gumustekin, S. Cilaker and N. Uysal (2008). "Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats." Eur Surg Res **40**(4): 354-360.
- Guthrie, H. D. and G. R. Welch (2006). "Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry." J Anim Sci **84**(8): 2089-2100.
- Hall, T. J., C. McQuillan, E. K. Finlay, C. O'Farrelly, S. Fair and K. G. Meade (2017). "Comparative genomic identification and validation of beta-defensin genes in the Ovis aries genome." BMC Genomics **18**(1): 278.
- Halliwell, B. and J. Gutteridge (1989). Free radicals in biology and medicine. Clarendon, Oxford.

- Harper, C. V., C. L. Barratt, S. J. Publicover and J. C. Kirkman-Brown (2006). "Kinetics of the progesterone-induced acrosome reaction and its relation to intracellular calcium responses in individual human spermatozoa." Biol Reprod **75**(6): 933-939.
- Harrison, R. A. (2004). "Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate." Mol Reprod Dev **67**(3): 337-352.
- Harrison, R. A. and B. M. Gadella (2005). "Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation." Theriogenology **63**(2): 342-351.
- Harrison, R. A. and S. E. Vickers (1990). "Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa." J Reprod Fertil **88**(1): 343-352.
- Hassanpour, H., P. Mirshokrai, A. Shirazi and A. Aminian (2007). "Effect of nitric oxide on ram sperm motility in vitro." Pak J Biol Sci **10**(14): 2374-2378.
- Hazlerigg, D. G., P. J. Morgan, W. Lawson and M. H. Hastings (1991). "Melatonin Inhibits the Activation of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase in Cultured Pars Tuberalis Cells from Ovine Pituitary." J Neuroendocrinol **3**(6): 597-603.
- Heeba, G. H. and A. A. Hamza (2015). "Rosuvastatin ameliorates diabetes-induced reproductive damage via suppression of oxidative stress, inflammatory and apoptotic pathways in male rats." Life Sciences **141**: 13-19.
- Hellstrom, W. J. G., M. Bell, R. Wang and S. C. Sikka (1994). "Effects of sodium nitroprusside on sperm motility, viability and lipid peroxidation." Fertility and Sterility **61**: 1117-1122.
- Herrero, M. B., S. Chatterjee, L. Lefièvre, E. de Lamirande and C. Gagnon (2000). "Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa." Free Radic Biol Med **29**(6): 522-536.
- Herrero, M. B., E. de Lamirande and C. Gagnon (1999). "Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro." Biol Reprod **61**(3): 575-581.
- Herrero, M. B., E. de Lamirande and C. Gagnon (2003). "Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa." Curr Pharm Des **9**(5): 419-425.
- Herrero, M. B. and C. Gagnon (2001). "Nitric oxide: a novel mediator of sperm function." J Androl **22**(3): 349-356.
- Herrero, M. B., S. Perez Martinez, J. M. Viggiano, J. M. Polak and M. F. de Gimeno (1996). "Localization by indirect immunofluorescence of nitric oxide synthase in mouse and human spermatozoa." Reprod Fertil Dev **8**(5): 931-934.

- Hess, K. C., B. H. Jones, B. Marquez, Y. Chen, T. S. Ord, M. Kamenetsky, C. Miyamoto, J. H. Zippin, G. S. Kopf, S. S. Suarez, L. R. Levin, C. J. Williams, J. Buck and S. B. Moss (2005). "The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization." Dev Cell **9**(2): 249-259.
- Hirohashi, N. and R. Yanagimachi (2018). "Sperm acrosome reaction: its site and role in fertilization†." Biology of Reproduction **99**(1): 127-133.
- Ho, H. C. and S. S. Suarez (2001). "Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation." Reproduction **122**(4): 519-526.
- Hong, C. Y., B. N. Chiang, J. Ku, Y. H. Wei and J. C. Fong (1985). "Calcium antagonists stimulate sperm motility in ejaculated human semen." Br J Clin Pharmacol **19**(1): 45-49.
- Hou, M.-L., S.-Y. Huang, Y.-K. Lai and W.-C. Lee (2008). "Geldanamycin augments nitric oxide production and promotes capacitation in boar spermatozoa." Animal Reproduction Science **104**(1): 56-68.
- Huang, F., H. Ning, Q. Q. Xin, Y. Huang, H. Wang, Z. H. Zhang, D. X. Xu, G. Ichihara and D. Q. Ye (2009). "Melatonin pretreatment attenuates 2-bromopropane-induced testicular toxicity in rats." Toxicology **256**(1-2): 75-82.
- Hunter, R. H. (2012). "Components of oviduct physiology in eutherian mammals." Biol Rev Camb Philos Soc **87**(1): 244-255.
- Hunter, R. H. and R. Nichol (1983). "Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus." J Exp Zool **228**(1): 121-128.
- Hunter, R. H. and I. Wilmut (1984). "Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct." Reprod Nutr Dev **24**(5A): 597-608.
- Illnerova, H., M. Buresova and J. Presl (1993). "Melatonin rhythm in human milk." J Clin Endocrinol Metab **77**(3): 838-841.
- Inoue, N., M. Ikawa and M. Okabe (2011). "The mechanism of sperm–egg interaction and the involvement of IZUMO1 in fusion." Asian Journal of Andrology **13**: 81-87.
- Jaiswal, B. S., A. Cohen-Dayag, I. Tur-Kaspa and M. Eisenbach (1998). "Sperm capacitation is, after all, a prerequisite for both partial and complete acrosome reaction." FEBS Lett **427**(2): 309-313.
- Jaldety, Y. and H. Breitbart (2015). "ERK1/2 mediates sperm acrosome reaction through elevation of intracellular calcium concentration." Zygote **23**(5): 652-661.

- Jang, H. Y., Y. H. Kim, B. W. Kim, I. C. Park, H. T. Cheong, J. T. Kim, C. K. Park, H. S. Kong, H. K. Lee and B. K. Yang (2010). "Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development." Reprod Domest Anim **45**(6): 943-950.
- Jin, M., E. Fujiwara, Y. Kakiuchi, M. Okabe, Y. Satouh, S. Baba, K. Chiba and N. Hirohashi (2011). "Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization." PNAS **108**: 4892-4896.
- Jockers, R., P. Maurice, J. A. Boutin and P. Delagrangé (2008). "Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new?" Br J Pharmacol **154**(6): 1182-1195.
- Joshi, C. S., S. A. Khan and V. V. Khole (2014). "Regulation of acrosome reaction by Liprin alpha3, LAR and its ligands in mouse spermatozoa." Andrology **2**(2): 165-174.
- Jou, M. J., T. I. Peng, P. Z. Yu, S. B. Jou, R. J. Reiter, J. Y. Chen, H. Y. Wu, C. C. Chen and L. F. Hsu (2007). "Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis." J Pineal Res **43**(4): 389-403.
- Juyena, N. S. and C. Stelletta (2012). "Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa." J Androl **33**(4): 536-551.
- Kafi, M., M. Safdarian and M. Hashemi (2004). "Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams." Small Ruminant Research **53**(1-2): 133-139.
- Kameshwari, D. B., A. B. Siva and S. Shivaji (2003). "Inhibition of in vitro capacitation of hamster spermatozoa by nitric oxide synthase inhibitors." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **49**(3): 421-428.
- Karagiannidis, A., S. Varsakeli, C. Alexopoulos and I. I. Amarantidis (2000). "Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece." Small Rumin Res **37**(1-2): 125-130.
- Karimfar, M. H., F. Niazvand, K. Haghani, S. Ghafourian, R. Shirazi and S. Bakhtiyari (2015). "The protective effects of melatonin against cryopreservation-induced oxidative stress in human sperm." Int J Immunopathol Pharmacol **28**(1): 69-76.
- Kaupp, U. B. (2012). "100 years of sperm chemotaxis." J Gen Physiol **140**(6): 583-586.
- Kaupp, U. B., J. Solzin, E. Hildebrand, J. E. Brown, A. Helbig, V. Hagen, M. Beyermann, F. Pampaloni and I. Weyand (2003). "The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm." Nat Cell Biol **5**(2): 109-117.

- Kaya, A., N. Baspinar, C. Yildiz, F. Kurtoğlu, M. Ataman and S. Haliloglu (2000). "Influence of melatonin implantation on sperm quality, biochemical composition of the seminal plasma and plasma testosterone levels in rams." Revue de Medecine Veterinaire **151**: 1143-1146.
- Kefer, J. C., A. Agarwal and E. Sabanegh (2009). "Role of antioxidants in the treatment of male infertility." Int J Urol **16**(5): 449-457.
- Keller, D. W. and K. L. Polakoski (1975). "L-arginine stimulation of human sperm motility in vitro." Biol Reprod **13**(2): 154-157.
- Kim, K. S., J. A. Foster, K. W. Kvasnicka and G. L. Gerton (2011). "Transitional states of acrosomal exocytosis and proteolytic processing of the acrosomal matrix in guinea pig sperm." Mol Reprod Dev **78**(12): 930-941.
- Kimball, S. R., A. Abbas and L. S. Jefferson (2008). "Melatonin represses oxidative stress-induced activation of the MAP kinase and mTOR signaling pathways in H4IIE hepatoma cells through inhibition of Ras." J Pineal Res **44**(4): 379-386.
- Koppers, A. J., L. A. Mitchell, P. Wang, M. Lin and R. J. Aitken (2011). "Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa." Biochem J **436**(3): 687-698.
- Kothari, S., A. Thompson, A. Agarwal and S. S. du Plessis (2010). "Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function." Indian J Exp Biol **48**(5): 425-435.
- Kurz, A., D. Viertel, A. Herrmann and K. Muller (2005). "Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction." Reproduction **130**(5): 615-626.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2012). "Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update." Physiol Rev **92**(2): 689-737.
- La Spina, F. A., L. C. Puga Molina, A. Romarowski, A. M. Vitale, T. L. Falzone, D. Krapf, N. Hirohashi and M. G. Buffone (2016). "Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct." Dev Biol **411**(2): 172-182.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lampiao, F., J. Huussen and S. D. Plessis (2014). "Effects of Nitric Oxide Exposure on Human Sperm Function and Apoptosis Markers." The Open Reproductive Science Journal **6**(1): 17-20.

- Lampiao, F., H. Strijdom and S. S. du Plessis (2006). "Direct nitric oxide measurement in human spermatozoa: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein." Int J Androl **29**(5): 564-567.
- Langford, G. A., L. Ainsworth, G. J. Marcus and J. N. Shrestha (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**(2): 489-499.
- Langlais, J., F. W. Kan, L. Granger, L. Raymond, G. Bleau and K. D. Roberts (1988). "Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation." Gamete Res **20**(2): 185-201.
- Lanoix, D., H. Beghdadi, J. Lafond and C. Vaillancourt (2008). "Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors." J Pineal Res **45**(1): 50-60.
- Lax, Y., S. Rubinstein and H. Breitbart (1994). "Epidermal growth factor induces acrosomal exocytosis in bovine sperm." FEBS Lett **339**(3): 234-238.
- Leahy, T. and B. M. Gadella (2015). "New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane." Asian J Androl **17**(4): 561-567.
- Leal, A. C., M. C. Caldas-Bussiere, C. S. Carvalho, K. S. Viana and C. R. Quirino (2009). "Role of nitric oxide on quality of freshly ejaculated bull spermatozoa during heparin-induced in vitro capacitation." Anim Reprod Sci **116**(1-2): 38-49.
- Leclerc, P. and G. S. Kopf (1995). "Mouse sperm adenylyl cyclase: general properties and regulation by the zona pellucida." Biol Reprod **52**(6): 1227-1233.
- Lee, M. A. and B. T. Storey (1986). "Bicarbonate is essential for fertilization of mouse eggs: mouse sperm require it to undergo the acrosome reaction." Biol Reprod **34**(2): 349-356.
- Lefievre, L., K. N. Jha, E. de Lamirande, P. E. Visconti and C. Gagnon (2002). "Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction." J Androl **23**(5): 709-716.
- Lehti, M. S. and A. Sironen (2017). "Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects." Biol Reprod **97**(4): 522-536.
- Levoye, A., R. Jockers, M. A. Ayoub, P. Delagrangé, E. Savaskan and J. L. Guillaume (2006). "Are G protein-coupled receptor heterodimers of physiological relevance?--Focus on melatonin receptors." Chronobiol Int **23**(1-2): 419-426.

- Lewis, S. E., E. T. Donnelly, E. S. Sterling, M. S. Kennedy, W. Thompson and U. Chakravarthy (1996). "Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility." Mol Hum Reprod **2**(11): 873-878.
- Li, X. and Z. Darzynkiewicz (1995). "Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation." Cell Prolif **28**(11): 571-579.
- Lindemann, C. B. (1996). "Functional significance of the outer dense fibers of mammalian sperm examined by computer simulations with the geometric clutch model." Cell Motil Cytoskeleton **34**(4): 258-270.
- Litvin, T. N., M. Kamenetsky, A. Zarifyan, J. Buck and L. R. Levin (2003). "Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate." J Biol Chem **278**(18): 15922-15926.
- Liu, C., D. R. Weaver, X. Jin, L. P. Shearman, R. L. Pieschl, V. K. Gribkoff and S. M. Reppert (1997). "Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock." Neuron **19**(1): 91-102.
- Liu, J., S. J. Clough, A. J. Hutchinson, E. B. Adamah-Biassi, M. Popovska-Gorevski and M. L. Dubocovich (2016). "MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective." Annu Rev Pharmacol Toxicol **56**: 361-383.
- Lockshin, R. A. and C. M. Williams (1964). "Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms." Journal of Insect Physiology **10**(4): 643-649.
- Lopez, R. (2015). "An Approach to the Factors Related to Sperm Capacitation Process." Andrology-Open Access **04**(01).
- Luboshitzky, R., Z. Shen-Orr and P. Herer (2002). "Seminal plasma melatonin and gonadal steroids concentrations in normal men." Arch Androl **48**(3): 225-232.
- Luconi, M., T. Barni, G. B. Vannelli, C. Krausz, F. Marra, P. A. Benedetti, V. Evangelista, S. Francavilla, G. Properzi, G. Forti and E. Baldi (1998). "Extracellular signal-regulated kinases modulate capacitation of human spermatozoa." Biol Reprod **58**(6): 1476-1489.
- Luconi, M., C. Krausz, G. Forti and E. Baldi (1996). "Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa." Biol Reprod **55**(1): 207-216.

- Luna, C., C. Colás, R. Pérez-Pé, J. A. Cebrián-Pérez and T. Muiño-Blanco (2012). "A novel epidermal growth factor-dependent extracellular signal-regulated MAP kinase cascade involved in sperm functionality in sheep." Biol Reprod **87**(4): 93.
- Luna, C., N. Mendoza, A. Casao, R. Pérez-Pé, J. A. Cebrián-Pérez and T. Muiño-Blanco (2017). "c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways link capacitation with apoptosis and seminal plasma proteins protect sperm by interfering with both routes†." Biol Reprod **96**(4): 800-815.
- Ma, X., J. R. Idle, K. W. Krausz and F. J. Gonzalez (2005). "Metabolism of melatonin by human cytochromes p450." Drug Metab Dispos **33**(4): 489-494.
- Machado-Oliveira, G., L. Lefièvre, C. Ford, M. B. Herrero, C. Barratt, T. J. Connolly, K. Nash, A. Morales-Garcia, J. Kirkman-Brown and S. Publicover (2008). "Mobilisation of Ca²⁺ stores and flagellar regulation in human sperm by S-nitrosylation: a role for NO synthesised in the female reproductive tract." Development **135**(22): 3677-3686.
- Macias, M., G. Escames, J. Leon, A. Coto, Y. Sbihi, A. Osuna and D. Acuna-Castroviejo (2003). "Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship." Eur J Biochem **270**(5): 832-840.
- Mack, S., A. K. Bhattacharyya, C. Joyce, H. van der Ven and L. J. Zaneveld (1983). "Acrosomal enzymes of human spermatozoa before and after in vitro capacitation." Biol Reprod **28**(5): 1032-1042.
- Malpoux, B., C. Viguie, D. C. Skinner, J. C. Thiery and P. Chemineau (1997). "Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe." Brain Res Bull **44**(4): 431-438.
- Marieb, E. N. (2006). Essentials of human anatomy & physiology. San Francisco, Pearson/Benjamin Cummings.
- Marti, E., L. Mara, J. I. Marti, T. Muino-Blanco and J. A. Cebrian-Perez (2007). "Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma." Theriogenology **67**(9): 1446-1454.
- Marti, E., J. I. Marti, T. Muino-Blanco and J. A. Cebrian-Perez (2008a). "Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa." J Androl **29**(4): 459-467.
- Marti, E., R. Pérez-Pé, C. Colás, T. Muiño-Blanco and J. A. Cebrián-Pérez (2008b). "Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa." Anim Reprod Sci **106**(1-2): 113-132.

- Marti, E., R. Perez-Pe, T. Muino-Blanco and J. A. Cebrian-Perez (2006). "Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa." J Androl **27**(6): 746-753.
- Marti, J. I., J. A. Cebrián-Pérez and T. Muiño-Blanco (2000). "Assessment of the Acrosomal Status of Ram Spermatozoa by RCA Lectin-Binding and Partition in an Aqueous Two-Phase System." Journal of Andrology **21**(4): 541-548.
- Martin, G., O. Sabido, P. Durand and R. Levy (2004). "Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm." Biol Reprod **71**(1): 28-37.
- Martin, G., O. Sabido, P. Durand and R. Levy (2005). "Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction." Hum Reprod **20**(12): 3459-3468.
- Martin, S. J., C. P. Reutelingsperger, A. J. McGahon, J. A. Rader, R. C. van Schie, D. M. LaFace and D. R. Green (1995). "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl." J Exp Med **182**(5): 1545-1556.
- Martínez-Marcos, P., M. Carvajal-Serna, S. Lázaro-Gaspar, R. Pérez-Pé, T. Muiño-Blanco, J. A. Cebrián-Pérez and A. Casao (2019). "Presence of melatonin-catabolizing non-specific enzymes myeloperoxidase and indoleamine 2,3-dioxygenase in the ram reproductive tract." Reprod Domest Anim **54**(12): 1643-1650.
- Martinez-Pastor, F., E. Aisen, M. R. Fernandez-Santos, M. C. Estes, A. Maroto-Morales, O. Garcia-Alvarez and J. J. Garde (2009). "Reactive oxygen species generators affect quality parameters and apoptosis markers differently in red deer spermatozoa." Reproduction **137**(2): 225-235.
- Masana, M. I. and M. L. Dubocovich (2001). "Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark." Sci STKE **2001**(107): pe39.
- Masson-Pevet, M., L. Bianchi and P. Pevet (1996). "Circadian photic regulation of melatonin receptor density in rat suprachiasmatic nuclei: comparison with light induction of fos-related protein." J Neurosci Res **43**(5): 632-637.
- Matassov, D., T. Kagan, J. Leblanc, M. Sikorska and Z. Zakeri (2004). "Measurement of apoptosis by DNA fragmentation." Methods Mol Biol **282**: 1-17.
- Matsumoto, M., J. Solzin, A. Helbig, V. Hagen, S. Ueno, O. Kawase, Y. Maruyama, M. Ogiso, M. Godde, H. Minakata, U. B. Kaupp, M. Hoshi and I. Weyand (2003). "A sperm-activating peptide controls a cGMP-signaling pathway in starfish sperm." Dev Biol **260**(2): 314-324.

- McIntyre, I. M., T. R. Norman, G. D. Burrows and S. M. Armstrong (1987). "Melatonin rhythm in human plasma and saliva." J Pineal Res **4**(2): 177-183.
- McVey, M., J. Hill, A. Howlett and C. Klein (1999). "Adenylyl cyclase, a coincidence detector for nitric oxide." J Biol Chem **274**(27): 18887-18892.
- McWilliam, H., W. Li, M. Uludag, S. Squizzato, Y. M. Park, N. Buso, A. P. Cowley and R. Lopez (2013). "Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI." Nucleic Acids Research **41**(W1): W597-W600.
- Meiser, H. and R. Schulz (2003). "Detection and localization of two constitutive NOS isoforms in bull spermatozoa." Anat Histol Embryol **32**(6): 321-325.
- Mendoza, N., A. Casao, J. Domingo, F. Quintín, A. Laviña, E. Fantova, J. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco and R. Pérez-Pe (2021). "Influence of Non-conventional Sperm Quality Parameters on Field Fertility in Ovine." Front Vet Sci **8**: 650572.
- Mendoza, N., A. Casao, R. Perez-Pe, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2013). "New insights into the mechanisms of ram sperm protection by seminal plasma proteins." Biol Reprod **88**(6): 149.
- Miki, K. and D. E. Clapham (2013). "Rheotaxis guides mammalian sperm." Curr Biol **23**(6): 443-452.
- Miraglia, E., F. De Angelis, E. Gazzano, H. Hassanpour, A. Bertagna, E. Aldieri, A. Revelli and D. Ghigo (2011). "Nitric oxide stimulates human sperm motility via activation of the cyclic GMP/protein kinase G signaling pathway." Reproduction **141**(1): 47-54.
- Miraglia, E., M. L. Rullo, A. Bosia, M. Massobrio, A. Revelli and D. Ghigo (2007). "Stimulation of the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway elicits human sperm chemotaxis in vitro." Fertil Steril **87**(5): 1059-1063.
- Mirnikjoo, B., K. Balasubramanian and A. J. Schroit (2009). "Mobilization of lysosomal calcium regulates the externalization of phosphatidylserine during apoptosis." J Biol Chem **284**(11): 6918-6923.
- Misztal, T., K. Romanowicz and B. Barcikowski (2002). "Melatonin--a modulator of the GnRH/LH axis in sheep." Reprod Biol **2**(3): 267-275.
- Mitchell, M. D., L. Sayers, M. J. Keirse, A. B. Anderson and A. C. Turnbull (1978). "Melatonin in amniotic fluid during human parturition." Br J Obstet Gynaecol **85**(9): 684-686.
- Moran, J. M., L. Madejón, C. Ortega Ferrusola and F. J. Peña (2008). "Nitric oxide induces caspase activity in boar spermatozoa." Theriogenology **70**(1): 91-96.

- Moreno-Irusta, A., E. M. Dominguez, C. I. Marin-Briggiler, A. Matamoros-Volante, O. Lucchesi, C. N. Tomes, C. L. Trevino, M. G. Buffone, R. Lascano, L. Losinno and L. C. Giojalas (2020). "Reactive oxygen species are involved in the signaling of equine sperm chemotaxis." Reproduction **159**(4): 423-436.
- Mortimer, D. (1994). "Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity." Reprod Fertil Dev **6**(1): 25-31.
- Munoz-Garay, C., J. L. De la Vega-Beltran, R. Delgado, P. Labarca, R. Felix and A. Darszon (2001). "Inwardly rectifying K(+) channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation." Dev Biol **234**(1): 261-274.
- Murad, F. (1994). "The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication." Recent Prog Horm Res **49**: 239-248.
- Muratori, M., I. Porazzi, M. Luconi, S. Marchiani, G. Forti and E. Baldi (2004). "AnnexinV binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation." J Androl **25**(5): 797-810.
- Musset, B., R. A. Clark, T. E. DeCoursey, G. L. Petheo, M. Geiszt, Y. Chen, J. E. Cornell, C. A. Eddy, R. G. Brzyski and A. El Jamali (2012). "NOX5 in human spermatozoa: expression, function, and regulation." The Journal of biological chemistry **287**(12): 9376-9388.
- Naranjo, M. C., J. M. Guerrero, A. Rubio, P. J. Lardone, A. Carrillo-Vico, M. P. Carrascosa-Salmoral, S. Jimenez-Jorge, M. V. Arellano, S. R. Leal-Noval, M. Leal, E. Lissen and P. Molinero (2007). "Melatonin biosynthesis in the thymus of humans and rats." Cell Mol Life Sci **64**(6): 781-790.
- Nathan, C. F. and J. B. Hibbs, Jr. (1991). "Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity." Curr Opin Immunol **3**(1): 65-70.
- Navarro, M. C., J. Valencia, C. Vázquez, E. Cózar and C. Villanueva-Diaz (2007). "Crude Mare Follicular Fluid Exerts Chemotactic Effects on Stallion Spermatozoa." Reproduction in Domestic Animals **33**: 331-324.
- Nixon, B., A. Bielanowicz, A. L. Anderson, A. Walsh, T. Hall, A. McCloghry and R. J. Aitken (2010). "Elucidation of the signaling pathways that underpin capacitation-associated surface phosphotyrosine expression in mouse spermatozoa." J Cell Physiol **224**(1): 71-83.
- Nobunaga, T., Y. Tokugawa, K. Hashimoto, Y. Kubota, K. Sawai, T. Kimura, K. Shimoya, M. Takemura, N. Matsuzaki, C. Azuma and F. Saji (1996). "Elevated nitric oxide concentration in the seminal plasma of infertile males: nitric oxide inhibits sperm motility." Am J Reprod Immunol **36**(4): 193-197.

- O'Brien, M. A. and R. Kirby (2008). "Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease." Journal of Veterinary Emergency and Critical Care **18**(6): 572-585.
- O'Flaherty, C. (2015). "Redox regulation of mammalian sperm capacitation." Asian J Androl **17**(4): 583-590.
- O'Flaherty, C., E. de Lamirande and C. Gagnon (2004a). "Phosphorylation of the Arginine-X-X- (Serine/Threonine) motif in human sperm proteins during capacitation: modulation and protein kinase A dependency." Mol Hum Reprod **10**(5): 355-363.
- O'Flaherty, C., E. de Lamirande and C. Gagnon (2005). "Reactive oxygen species and protein kinases modulate the level of phospho-MEK-like proteins during human sperm capacitation." Biol Reprod **73**(1): 94-105.
- O'Flaherty, C., P. Rodriguez and S. Srivastava (2004b). "L-arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa." Biochim Biophys Acta **1674**(2): 215-221.
- O'Bryan, M. K., A. Zini, C. Y. Cheng and P. N. Schlegel (1998). "Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: correlation with sperm motility." Fertility and Sterility **70**(6): 1143-1147.
- Oehninger, S., M. Morshedi, S. L. Weng, S. Taylor, H. Duran and S. Beebe (2003). "Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa." Reprod Biomed Online **7**(4): 469-476.
- Ofosu, J., I. H. Qazi, Y. Fang and G. Zhou (2021). "Use of melatonin in sperm cryopreservation of farm animals: A brief review." Anim Reprod Sci **233**: 106850.
- Oleszczuk, K., L. Augustinsson, N. Bayat, A. Giwercman and M. Bungum (2013). "Prevalence of high DNA fragmentation index in male partners of unexplained infertile couples." Andrology **1**(3): 357-360.
- Oliva-Hernandez, J. and J. F. Perez-Gutierrez (2008). "Localization of the epidermal growth factor (EGF) in the epididymis and accessory genital glands of the boar and functional effects on spermatozoa." Theriogenology **70**(7): 1159-1169.
- Oliveira, R. G., L. Tomasi, R. A. Rovasio and L. C. Giojalas (1999). "Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids." J Reprod Fertil **115**(1): 23-27.

- Ollero, M., T. Muino-Blanco, M. J. Lopez-Perez and J. A. Cebrian-Perez (1996). "Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations." Int J Androl **19**(5): 287-292.
- Ono, K. and J. Han (2000). "The p38 signal transduction pathway: activation and function." Cell Signal **12**(1): 1-13.
- Orihuela, P. A., A. Parada-Bustamante, P. P. Cortes, C. Gatica and H. B. Croxatto (2003). "Estrogen receptor, cyclic adenosine monophosphate, and protein kinase A are involved in the nongenomic pathway by which estradiol accelerates oviductal oocyte transport in cyclic rats." Biol Reprod **68**(4): 1225-1231.
- Ortavant, R. (1956). "[Action of duration of light on spermatogenetic processes in rams]." C R Seances Soc Biol Fil **150**(3): 471-474.
- Ortiz, A., J. Espino, I. Bejarano, G. M. Lozano, F. Monllor, J. F. Garcia, J. A. Pariente and A. B. Rodriguez (2011). "High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility." J Pineal Res **50**(2): 132-139.
- Osheroff, J. E., P. E. Visconti, J. P. Valenzuela, A. J. Travis, J. Alvarez and G. S. Kopf (1999). "Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation." Mol Hum Reprod **5**(11): 1017-1026.
- Osman, R. A., M. L. Andria, A. D. Jones and S. Meizel (1989). "Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction." Biochem Biophys Res Commun **160**(2): 828-833.
- Paasch, U., S. Grunewald, A. Agarwal and H. J. Glandera (2004). "Activation pattern of caspases in human spermatozoa." Fertil Steril **81 Suppl 1**: 802-809.
- Paasch, U., S. Grunewald, G. Fitzl and H. J. Glander (2003). "Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa." J Androl **24**(2): 246-252.
- Palacin, I., J. A. Abecia, F. Forcada, A. Casao, C. José-Álvaro, T. Muiño-Blanco, P. Carlos and J. Pontes (2008). "Effect of exogenous melatonin treatment on out of season ram fertility." Italian Journal of Animal Science **7**: 199-206.
- Panday, A., M. K. Sahoo, D. Osorio and S. Batra (2015). "NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies." Cell Mol Immunol **12**(1): 5-23.

- Pang, Y. W., Y. Q. Sun, X. L. Jiang, Z. Q. Huang, S. J. Zhao, W. H. Du, H. S. Hao, X. M. Zhao and H. B. Zhu (2016). "Protective effects of melatonin on bovine sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development." Mol Reprod Dev **83**(11): 993-1002.
- Paredes, R. M., J. C. Etzler, L. T. Watts, W. Zheng and J. D. Lechleiter (2008). "Chemical calcium indicators." Methods **46**(3): 143-151.
- Parrish, J. J., J. Susko-Parrish, M. A. Winer and N. L. First (1988). "Capacitation of bovine sperm by heparin." Biol Reprod **38**(5): 1171-1180.
- Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. H. Cobb (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-183.
- Pena, C., J. Rincon, A. Pedreanez, N. Viera and J. Mosquera (2007). "Chemotactic effect of melatonin on leukocytes." J Pineal Res **43**(3): 263-269.
- Pentikainen, V., K. Erkkila and L. Dunkel (1999). "Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro." Am J Physiol **276**(2): E310-316.
- Pérez-Pé, R., P. Grasa, M. Fernández-Juan, M. L. Peleato, J. A. Cebrián-Pérez and T. Muiño-Blanco (2002). "Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa." Mol Reprod Dev **61**(2): 226-233.
- Pérez-Pé, R., N. Mendoza, A. Casao, F. Quintin, E. Sevilla, A. Lavina, J. Cebrián-Pérez and T. Muino-Blanco (2010). Relationship between apoptosis-related parameters and in vivo fertility with refrigerated ram semen. REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC COMMERCE PLACE, 350 MAIN ST, MALDEN 02148 **45**: 103-103.
- Peris, S. I., J. F. Bilodeau, M. Dufour and J. L. Bailey (2007). "Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm." Mol Reprod Dev **74**(7): 878-892.
- Petit, L., I. Lacroix, P. de Coppet, A. D. Strosberg and R. Jockers (1999). "Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway." Biochem Pharmacol **58**(4): 633-639.
- Petrunkina, A. M., J. Friedrich, W. Drommer, G. Bicker, D. Waberski and E. Topfer-Petersen (2001). "Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca²⁺ concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells." Reproduction **122**(3): 469-480.

- Pini, T., S. P. de Graaf, X. Druart, G. Tsikis, V. Labas, A. P. Teixeira-Gomes, B. M. Gadella and T. Leahy (2018). "Binder of Sperm Proteins 1 and 5 have contrasting effects on the capacitation of ram spermatozoa." Biol Reprod **98**(6): 765-775.
- Plante, M., E. de Lamirande and C. Gagnon (1994). "Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility." Fertil Steril **62**(2): 387-393.
- Poiani, A. (2006). "Complexity of seminal fluid: a review." Behavioral Ecology and Sociobiology **60**(3): 289-310.
- Pommer, A. C., J. Rutllant and S. A. Meyers (2003). "Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions." Biol Reprod **68**(4): 1208-1214.
- Pool, K. R., J. P. Rickard and S. P. de Graaf (2021). "Melatonin improves the motility and DNA integrity of frozen-thawed ram spermatozoa likely via suppression of mitochondrial superoxide production." Domestic Animal Endocrinology **74**: 106516.
- Pool, K. R., J. P. Rickard, T. Pini and S. P. de Graaf (2020a). "Exogenous melatonin advances the ram breeding season and increases testicular function." Sci Rep **10**(1): 9711.
- Pool, K. R., J. P. Rickard, E. Tumeth and S. P. de Graaf (2020b). "Treatment of rams with melatonin implants in the non-breeding season improves post-thaw sperm progressive motility and DNA integrity." Anim Reprod Sci **221**: 106579.
- Pua, L. J. W., C.-W. Mai, F. F.-L. Chung, A. S.-B. Khoo, C.-O. Leong, W.-M. Lim and L.-W. Hii (2022). "Functional Roles of JNK and p38 MAPK Signaling in Nasopharyngeal Carcinoma." International Journal of Molecular Sciences **23**(3): 1108.
- Puga Molina, L. C., G. M. Luque, P. A. Balestrini, C. I. Marín-Briggiler, A. Romarowski and M. G. Buffone (2018). "Molecular Basis of Human Sperm Capacitation." Frontiers in Cell and Developmental Biology **6**.
- Rahman, M. S., W.-S. Kwon and M.-G. Pang (2014). "Calcium Influx and Male Fertility in the Context of the Sperm Proteome: An Update." BioMed Research International **2014**: 841615.
- Ralt, D., M. Goldenberg, P. Fetterolf, D. Thompson, J. Dor, S. Mashiach, D. L. Garbers and M. Eisenbach (1991). "Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(7): 2840-2844.

- Ralt, D., M. Manor, A. Cohen-Dayag, I. Tur-Kaspa, I. Ben-Shlomo, A. Makler, I. Yuli, J. Dor, S. Blumberg, S. Mashiach and M. Eisenbach (1994). "Chemotaxis and Chemokinesis of Human Spermatozoa to Follicular Factors1." Biology of Reproduction **50**(4): 774-785.
- Raman, M., W. Chen and M. H. Cobb (2007). "Differential regulation and properties of MAPKs." Oncogene **26**(22): 3100-3112.
- Rath, D., H. J. Schuberth, P. Coy and U. Taylor (2008). "Sperm interactions from insemination to fertilization." Reprod Domest Anim **43 Suppl 5**: 2-11.
- Ratnasooriya, W. D. and M. G. Dharmasiri (2001). "L-arginine, the substrate of nitric oxide synthase, inhibits fertility of male rats." Asian J Androl **3**(2): 97-103.
- Reiter, R. J. (1991). "Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions." Endocr Rev **12**(2): 151-180.
- Reiter, R. J., D.-X. Tan, L. C. Manchester, S. D. Paredes, J. C. Mayo and R. M. Sainz (2009). "Melatonin and Reproduction Revisited." Biology of Reproduction **81**(3): 445-456.
- Reiter, R. J., D. X. Tan, S. Rosales-Corral and L. C. Manchester (2013). "The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives." Mini Rev Med Chem **13**(3): 373-384.
- Reppert, S. M. (1997). "Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors." J Biol Rhythms **12**(6): 528-531.
- Reppert, S. M., C. Godson, C. D. Mahle, D. R. Weaver, S. A. Slaugenhaupt and J. F. Gusella (1995). "Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8734-8738.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, T. Ebisawa, C. D. Mahle and L. F. Kolakowski, Jr. (1996). "Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary." FEBS Lett **386**(2-3): 219-224.
- Revelli, A., C. Costamagna, F. Moffa, E. Aldieri, S. Ochetti, A. Bosia, M. Massobrio, B. Lindblom and D. Ghigo (2001). "Signaling pathway of nitric oxide-induced acrosome reaction in human spermatozoa." Biol Reprod **64**(6): 1708-1712.
- Revelli, A., G. Soldati, C. Costamagna, O. Pellerey, E. Aldieri, M. Massobrio, A. Bosia and D. Ghigo (1999). "Follicular fluid proteins stimulate nitric oxide (NO) synthesis in human sperm: a possible role for NO in acrosomal reaction." J Cell Physiol **178**(1): 85-92.
- Rickard, J. P., K. R. Pool, X. Druart and S. P. de Graaf (2019). "The fate of spermatozoa in the female reproductive tract: A comparative review." Theriogenology **137**: 104-112.

- Rodriguez, I., C. Ody, K. Araki, I. Garcia and P. Vassalli (1997). "An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis." EMBO J **16**(9): 2262-2270.
- Rodriguez, P. C., C. M. O'Flaherty, M. T. Beconi and N. B. Beorlegui (2005). "Nitric oxide induces acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa." Andrologia **37**(5): 166-172.
- Roessner, C., U. Paasch, H. J. Glander and S. Grunewald (2010). "Activity of nitric oxide synthase in mature and immature human spermatozoa." Andrologia **42**(2): 132-137.
- Rosa, H. J. D. and M. J. Bryant (2003). "Seasonality of reproduction in sheep." Small Ruminant Research **48**(3): 155-171.
- Rosa, H. J. D., C. C. Silva and M. J. Bryant (2012). "The effect of melatonin treatment in rams on seasonal variation of testicular size and semen production parameters." Small Ruminant Research **102**(2): 197-201.
- Ross, M. and W. Pawlina (2014). Sistema genital masculino. En: Histología. Texto y Atlas en color con Boiología Celular y Molecular. Panamericana.
- Rosselli, M., R. K. Dubey, B. Imthurn, E. Macas and P. J. Keller (1995). "Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity." Hum Reprod **10**(7): 1786-1790.
- Rotfeld, H., P. Hillman, D. Ickowicz and H. Breitbart (2014). "PKA and CaMKII mediate PI3K activation in bovine sperm by inhibition of the PKC/PP1 cascade." Reproduction **147**(3): 347-356.
- Roy, S. C. and S. K. Atreja (2008). "Tyrosine phosphorylation of a 38-kDa capacitation-associated buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm protein is induced by L-arginine and regulated through a cAMP/PKA-independent pathway." Int J Androl **31**(1): 12-24.
- Sabeur, K. and B. A. Ball (2007). "Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa." Reproduction **134**(2): 263-270.
- Said, T. M., A. Agarwal, S. Grunewald, M. Rasch, H. J. Glander and U. Paasch (2006). "Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation." Reprod Biomed Online **13**(3): 336-339.
- Said, T. M., U. Paasch, H. J. Glander and A. Agarwal (2004). "Role of caspases in male infertility." Hum Reprod Update **10**(1): 39-51.

- Sainz, R. M., J. C. Mayo, C. Rodriguez, D. X. Tan, S. Lopez-Burillo and R. J. Reiter (2003). "Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells." Cell Mol Life Sci **60**(7): 1407-1426.
- Sakkas, D., E. Mariethoz, G. Manicardi, D. Bizzaro, P. G. Bianchi and U. Bianchi (1999). "Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa." Rev Reprod **4**(1): 31-37.
- Sakkas, D., E. Seli, G. C. Manicardi, M. Nijs, W. Ombelet and D. Bizzaro (2004). "The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail?" Hum Fertil (Camb) **7**(2): 99-103.
- Salicioni, A. M., M. D. Platt, E. V. Wertheimer, E. Arcelay, A. Allaire, J. Sosnik and P. E. Visconti (2007). "Signalling pathways involved in sperm capacitation." Soc Reprod Fertil Suppl **65**: 245-259.
- Saling, P. M. and B. T. Storey (1979). "Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction." J Cell Biol **83**(3): 544-555.
- Sanchez-Hidalgo, M., C. A. de la Lastra, M. P. Carrascosa-Salmoral, M. C. Naranjo, A. Gomez-Corvera, B. Caballero and J. M. Guerrero (2009). "Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues." Exp Gerontol **44**(5): 328-334.
- Savill, J., I. Dransfield, C. Gregory and C. Haslett (2002). "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses." Nat Rev Immunol **2**(12): 965-975.
- Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer and M. E. Peter (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." Embo j **17**(6): 1675-1687.
- Schaeffer, H. J. and M. J. Weber (1999). "Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers." Mol Cell Biol **19**(4): 2435-2444.
- Schlegel, R. A. and P. Williamson (2007). "P.S. to PS (phosphatidylserine)--pertinent proteins in apoptotic cell clearance." Sci STKE **2007**(408): pe57.
- Seger, R. and E. G. Krebs (1995). "The MAPK signaling cascade." FASEB J **9**(9): 726-735.
- Senger, P. L. (2003). Pathways to pregnancy and parturition, Current Conceptions, Inc., 1615 NE Eastgate Blvd.
- Sengoku, K., K. Tamate, T. Yoshida, Y. Takaoka, T. Miyamoto and M. Ishikawa (1998). "Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa." Fertil Steril **69**(3): 522-527.

- Serrano, H., E. Canchola and M. D. García-Suárez (2001). "Sperm-attracting activity in follicular fluid associated to an 8.6-kDa protein." Biochem Biophys Res Commun **283**(4): 782-784.
- Sette, C., M. Barchi, A. Bianchini, M. Conti, P. Rossi and R. Geremia (1999). "Activation of the mitogen-activated protein kinase ERK1 during meiotic progression of mouse pachytene spermatocytes." J Biol Chem **274**(47): 33571-33579.
- Setyawan, E. M. N., M. J. Kim, H. J. Oh, G. A. Kim, Y. K. Jo, S. H. Lee, Y. B. Choi and B. C. Lee (2016). "Spermine reduces reactive oxygen species levels and decreases cryocapacitation in canine sperm cryopreservation." Biochem Biophys Res Commun **479**(4): 927-932.
- Shadan, S., P. S. James, E. A. Howes and R. Jones (2004). "Cholesterol Efflux Alters Lipid Raft Stability and Distribution During Capacitation of Boar Spermatozoa1." Biology of Reproduction **71**(1): 253-265.
- Shaha, C., R. Tripathi and D. P. Mishra (2010). "Male germ cell apoptosis: regulation and biology." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **365**(1546): 1501-1515.
- Shayestehyekta, M., T. Mohammadi, L. Soltani and M. PooyanMehr (2022). "Effect of Different Concentrations of Melatonin on Ram Epididymal Spermatozoa Recovered Post-mortem under Oxidative Stress Conditions and Storage at 4 °C." Reprod Domest Anim.
- Shi, J. M., X. Z. Tian, G. B. Zhou, L. Wang, C. Gao, S. E. Zhu, S. M. Zeng, J. H. Tian and G. S. Liu (2009). "Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes." J Pineal Res **47**(4): 318-323.
- Shirakawa, H. and N. Ogino (1987). "Novel activity of melatonin. Its chemotactic effect on retinal pigment epithelial cells." Ophthalmic Res **19**(4): 226-229.
- Si, Y. and P. Olds-Clarke (2000). "Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation." Biol Reprod **62**(5): 1231-1239.
- Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J. D. Thompson and D. G. Higgins (2011). "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega." Molecular Systems Biology **7**(1): 539.
- Sikka, S. C., M. Rajasekaran and W. J. Hellstrom (1995). "Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility." Journal of andrology **16**(6): 464-468.

- Simons, J. and L. Fauci (2018). "A Model for the Acrosome Reaction in Mammalian Sperm." Bull Math Biol **80**(9): 2481-2501.
- Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 31-39.
- Singh, A. B. and R. C. Harris (2005). "Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands." Cell Signal **17**(10): 1183-1193.
- Singh, D., M. K. Sharma and R. S. Pandey (1999). "Biochemical and hormonal characterization of follicles from follicular and luteal phase ovaries of goat and sheep." Indian J Exp Biol **37**(5): 434-438.
- Slominski, R. M., R. J. Reiter, N. Schlabritz-Loutsevitch, R. S. Ostrom and A. T. Slominski (2012). "Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions." Mol Cell Endocrinol **351**(2): 152-166.
- Soares, J. M., Jr., M. I. Masana, C. Erşahin and M. L. Dubocovich (2003). "Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle." J Pharmacol Exp Ther **306**(2): 694-702.
- Srinivasan, V., D. W. Spence, S. R. Pandi-Perumal, I. Trakht and D. P. Cardinali (2008). "Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms." Integr Cancer Ther **7**(3): 189-203.
- Staicu, F. D., R. Lopez-Ubeda, J. Romero-Aguirregomez-corta, J. C. Martinez-Soto and C. Matas Parra (2019). "Regulation of boar sperm functionality by the nitric oxide synthase/nitric oxide system." J Assist Reprod Genet **36**(8): 1721-1736.
- Staicu, F. D., J. C. Martínez-Soto, S. Canovas and C. Matás (2021). "Nitric oxide-targeted protein phosphorylation during human sperm capacitation." Sci Rep **11**(1): 20979.
- Staicu, F. D. and C. Matás (2017). Nitric oxide: key features in spermatozoa. Nitric Oxide Synthase - Simple Enzyme-Complex Roles. S. Saravi. Rijeka, Croatia, IntechOpen: p. 137–154.
- Stauss, C. R., T. J. Votta and S. S. Suarez (1995). "Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida." Biol Reprod **53**(6): 1280-1285.
- Suarez, S. S. (1987). "Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ." Biol Reprod **36**(1): 203-210.
- Suarez, S. S., L. Vincenti and M. W. Ceglia (1987). "Hyperactivated motility induced in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible." J Exp Zool **244**(2): 331-336.

- Succu, S., F. Berlinguer, V. Pasciu, V. Satta, G. G. Leoni and S. Naitana (2011). "Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner." Journal of Pineal Research **50**(3): 310-318.
- Sun, F., A. Bahat, A. Gakamsky, E. Girsh, N. Katz, L. C. Giojalas, I. Tur-Kaspa and M. Eisenbach (2005). "Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants." Hum Reprod **20**(3): 761-767.
- Sun, Q. Y., H. Breitbart and H. Schatten (1999). "Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells." Reprod Fertil Dev **11**(7-8): 443-450.
- Tan, D., L. C. Manchester, R. J. Reiter, W. Qi, M. A. Hanes and N. J. Farley (1999). "High physiological levels of melatonin in the bile of mammals." Life Sci **65**(23): 2523-2529.
- Tan, D. X., R. Hardeland, K. Back, L. C. Manchester, M. A. Alatorre-Jimenez and R. J. Reiter (2016). "On the significance of an alternate pathway of melatonin synthesis via 5-methoxytryptamine: comparisons across species." J Pineal Res **61**(1): 27-40.
- Tan, D. X., R. Hardeland, L. C. Manchester, S. D. Paredes, A. Korkmaz, R. M. Sainz, J. C. Mayo, L. Fuentes-Broto and R. J. Reiter (2010). "The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness." Biol Rev Camb Philos Soc **85**(3): 607-623.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, E. Esteban-Zubero, Z. Zhou and R. J. Reiter (2015). "Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism." Molecules **20**(10): 18886-18906.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, M. P. Terron, L. J. Flores and R. J. Reiter (2007). "One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?" J Pineal Res **42**(1): 28-42.
- Tardif, S., C. Dube and J. L. Bailey (2003). "Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium." Biol Reprod **68**(1): 207-213.
- Tash, J. S. (1976). "Investigations on adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase in ram semen and initial characterization of a sperm-specific isoenzyme." J Reprod Fertil **47**(1): 63-72.
- Teves, M. E., F. Barbano, H. A. Guidobaldi, R. Sanchez, W. Miska and L. C. Giojalas (2006). "Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa." Fertil Steril **86**(3): 745-749.

- Tijmes, M., R. Pedraza and L. Valladares (1996). "Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis." Steroids **61**(2): 65-68.
- Tomasova, L., Z. Guttenberg, B. Hoffmann and R. Merkel (2019). "Advanced 2D/3D cell migration assay for faster evaluation of chemotaxis of slow-moving cells." PLOS ONE **14**(7): e0219708.
- Toshimori, K. (2003). "Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue." Microsc Res Tech **61**(1): 1-6.
- Tosic, J. and A. Walton (1946). "Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its inhibitory effect of respiration." Nature **158**: 485.
- Touyz, R. M., A. Anagnostopoulou, F. Rios, A. C. Montezano and L. L. Camargo (2019). "NOX5: Molecular biology and pathophysiology." Exp Physiol **104**(5): 605-616.
- Tripathi, R., D. P. Mishra and C. Shaha (2009). "Male germ cell development: turning on the apoptotic pathways." J Reprod Immunol **83**(1-2): 31-35.
- Trzcińska, M., M. Bryła and Z. Smorąg (2011). "Apoptotic-like changes in the spermatozoa of fresh and stored boar semen and the quality of embryos produced in vivo." Anim Reprod Sci **124**(1-2): 90-97.
- Tsien, R. Y. (1989). Chapter 5 Fluorescent Indicators of Ion Concentrations. Methods in Cell Biology. D. L. Taylor and Y.-L. Wang, Academic Press. **30**: 127-156.
- Turner, R. M. (2003). "Tales from the tail: what do we really know about sperm motility?" J Androl **24**(6): 790-803.
- Unsain, N. and Philip A. Barker (2015). "New Views on the Misconstrued: Executioner Caspases and Their Diverse Non-apoptotic Roles." Neuron **88**(3): 461-474.
- Uñates, D. R., H. A. Guidobaldi, L. V. Gatica, M. A. Cubilla, M. E. Teves, A. Moreno and L. C. Giojalas (2014). "Versatile action of picomolar gradients of progesterone on different sperm subpopulations." PLoS One **9**(3): e91181.
- van Vuuren, R. J., M. J. Pitout, C. H. van Aswegen and J. J. Theron (1992). "Putative melatonin receptor in human spermatozoa." Clin Biochem **25**(2): 125-127.
- Venegas, C., J. A. Garcia, G. Escames, F. Ortiz, A. Lopez, C. Doerrier, L. Garcia-Corzo, L. C. Lopez, R. J. Reiter and D. Acuna-Castroviejo (2012). "Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations." J Pineal Res **52**(2): 217-227.

- Vermes, I. and C. Haanen (1994). "Apoptosis and programmed cell death in health and disease." Adv Clin Chem **31**: 177-246.
- Vieira, L. A., A. Diana, C. Soriano-Úbeda and C. Matás (2021). "Selection of Boar Sperm by Reproductive Biofluids as Chemoattractants." Animals **11**(1): 53.
- Vigil, P., R. F. Orellana and M. E. Cortes (2011). "Modulation of spermatozoon acrosome reaction." Biol Res **44**(2): 151-159.
- Vigil, P., A. Toro and A. Godoy (2008). "Physiological action of oestradiol on the acrosome reaction in human spermatozoa." Andrologia **40**(3): 146-151.
- Villanueva-Diaz, C., F. Vadillo-Ortega, A. Kably-Ambe, M. A. Diaz-Pérez and S. K. Krivitzky (1990). "Evidence that human follicular fluid contains a chemoattractant for spermatozoa." Fertil Steril **54**(6): 1180-1182.
- Visconti, P. E., J. L. Bailey, G. D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke and G. S. Kopf (1995a). "Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation." Development **121**(4): 1129-1137.
- Visconti, P. E., H. Galantino-Homer, X. Ning, G. D. Moore, J. P. Valenzuela, C. J. Jorgez, J. G. Alvarez and G. S. Kopf (1999a). "Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation." J Biol Chem **274**(5): 3235-3242.
- Visconti, P. E. and G. S. Kopf (1998). "Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation." Biol Reprod **59**(1): 1-6.
- Visconti, P. E., G. D. Moore, J. L. Bailey, P. Leclerc, S. A. Connors, D. Pan, P. Olds-Clarke and G. S. Kopf (1995b). "Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway." Development **121**(4): 1139-1150.
- Visconti, P. E., J. Stewart-Savage, A. Blasco, L. Battaglia, P. Miranda, G. S. Kopf and J. G. Tezon (1999b). "Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm." Biol Reprod **61**(1): 76-84.
- Visconti, P. E., V. A. Westbrook, O. Chertihin, I. Demarco, S. Sleight and A. B. Diekman (2002). "Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity." J Reprod Immunol **53**(1-2): 133-150.

- Vishwakarma, P. (1962). "The pH and Bicarbonate-ion Content of the Oviduct and Uterine Fluids." Fertility and Sterility **13**(5): 481-485.
- Ward, C. R. and B. T. Storey (1984). "Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay." Dev Biol **104**(2): 287-296.
- Wei, Z., T. Yu, J. Wang, C. Wang, X. Liu, Z. Han, X. Zhang, Y. Zhang, H. Ouyang and Z. Yang (2020). "Swine sperm induces neutrophil extracellular traps that entangle sperm and embryos." Reproduction **160**(2): 217-225.
- Weinberg, J. B., E. Doty, J. Bonaventura and A. F. Haney (1995). "Nitric oxide inhibition of human sperm motility." Fertil Steril **64**(2): 408-413.
- Weng, S. L., S. L. Taylor, M. Morshedi, A. Schuffner, E. H. Duran, S. Beebe and S. Oehninger (2002). "Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm." Mol Hum Reprod **8**(11): 984-991.
- Whittington, K., S. C. Harrison, K. M. Williams, J. L. Day, E. A. McLaughlin, M. G. Hull and W. C. Ford (1999). "Reactive oxygen species (ROS) production and the outcome of diagnostic tests of sperm function." Int J Androl **22**(4): 236-242.
- Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe and G. L. Johnson (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." Physiol Rev **79**(1): 143-180.
- Williams, M., C. J. Hill, I. Scudamore, B. Dunphy, I. D. Cooke and C. L. Barratt (1993). "Sperm numbers and distribution within the human fallopian tube around ovulation." Hum Reprod **8**(12): 2019-2026.
- Wiser, A., S. Sachar, Y. Ghetler, A. Shulman and H. Breitbart (2014). "Assessment of sperm hyperactivated motility and acrosome reaction can discriminate the use of spermatozoa for conventional in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection: preliminary results." Andrologia **46**(3): 313-315.
- Witt-Enderby, P. A., R. S. MacKenzie, R. M. McKeon, E. A. Carroll, S. L. Bordt and M. A. Melan (2000). "Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of the human mt1 melatonin receptor." Cell Motil Cytoskeleton **46**(1): 28-42.
- Witt-Enderby, P. A., M. I. Masana and M. L. Dubocovich (1998). "Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor." Endocrinology **139**(7): 3064-3071.

- Wlodkowic, D., W. Telford, J. Skommer and Z. Darzynkiewicz (2011). "Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death." Methods Cell Biol **103**: 55-98.
- Wong, C. H. and C. Y. Cheng (2005). "Mitogen-activated protein kinases, adherens junction dynamics, and spermatogenesis: a review of recent data." Dev Biol **286**(1): 1-15.
- Xiao, L., J. Hu, L. Song, Y. Zhang, W. Dong, Y. Jiang, Q. Zhang, L. Yuan and X. Zhao (2019). "Profile of melatonin and its receptors and synthesizing enzymes in cumulus-oocyte complexes of the developing sheep antral follicle-a potential estradiol-mediated mechanism." Reprod Biol Endocrinol **17**(1): 1.
- Yanagimachi, R. (1975). "Acceleration of the Acrosome Reaction and Activation of Guinea Pig Spermatozoa by Detergents and Other Reagents." Biology of Reproduction **13**(5): 519-526.
- Yanagimachi, R. (1994a). "Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity." Zygote **2**(4): 371-372.
- Yanagimachi, R. (1994b). "Mammalian fertilization." The physiology of reproduction.
- Yanagimachi, R. and M. C. Chang (1963). "Sperm Ascent through the Oviduct of the Hamster and Rabbit in Relation to the Time of Ovulation." J Reprod Fertil **6**: 413-420.
- Yanagimachi, R. and Y. D. Noda (1970). "Physiological changes in the postnuclear cap region of mammalian spermatozoa: a necessary preliminary to the membrane fusion between sperm and egg cells." J Ultrastruct Res **31**(5-6): 486-493.
- Yeoman, R. R., W. D. Jones and B. M. Rizk (1998). "Evidence for Nitric Oxide Regulation of Hamster Sperm Hyperactivation." Journal of Andrology **19**(1): 58-64.
- Yoon, S. and R. Seger (2006). "The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions." Growth Factors **24**(1): 21-44.
- Young, S. N., S. Gauthier, M. E. Kiely, S. Lal and G. M. Brown (1984). "Effect of oral melatonin administration on melatonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, indoleacetic acid, and cyclic nucleotides in human cerebrospinal fluid." Neuroendocrinology **39**(1): 87-92.
- Yuksel Egrilmez, M., S. Kocturk, S. Aktan, G. Oktay, H. Resmi, H. Simsek Keskin, G. Guner Akdogan and S. Ozkan (2022). "Melatonin Prevents UVB-Induced Skin Photoaging by Inhibiting Oxidative Damage and MMP Expression through JNK/AP-1 Signaling Pathway in Human Dermal Fibroblasts." Life (Basel) **12**(7).
- Zaccolo, M. and T. Pozzan (2003). "CAMP and Ca²⁺ interplay: a matter of oscillation patterns." Trends Neurosci **26**(2): 53-55.

- Zhang, H. and R. L. Zheng (1996). "Promotion of human sperm capacitation by superoxide anion." Free Radic Res **24**(4): 261-268.
- Zhang, J. H. and M. Xu (2000). "DNA fragmentation in apoptosis." Cell Research **10**(3): 205-211.
- Zhang, S., W. Li, Q. Gao and T. Wei (2004). "Effect of melatonin on the generation of nitric oxide in murine macrophages." European Journal of Pharmacology **501**(1): 25-30.
- Zhang, W. and H. T. Liu (2002). "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells." Cell Res **12**(1): 9-18.
- Zhao, D., Y. Yu, Y. Shen, Q. Liu, Z. Zhao, R. Sharma and R. J. Reiter (2019). "Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary History in Animals and Plants." Frontiers in endocrinology **10**: 249-249.
- Zhao, F., S. Whiting, S. Lambourne, R. J. Aitken and Y. P. Sun (2021). "Melatonin alleviates heat stress-induced oxidative stress and apoptosis in human spermatozoa." Free Radic Biol Med **164**: 410-416.
- Zhou, Q., J. Zhao, J. G. Stout, R. A. Luhm, T. Wiedmer and P. J. Sims (1997). "Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids." J Biol Chem **272**(29): 18240-18244.
- Zhou, Z. (2007). "New phosphatidylserine receptors: clearance of apoptotic cells and more." Dev Cell **13**(6): 759-760.
- Zhu, Z., R. Li, Y. Lv and W. Zeng (2019). "Melatonin protects rabbit spermatozoa from cryo-damage via decreasing oxidative stress." Cryobiology **88**: 1-8.
- Zini, A., E. De Lamirande and C. Gagnon (1995). "Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro." J Androl **16**(5): 424-431.
- Zini, A., M. A. Fischer, V. Mak, D. Phang and K. Jarvi (2002). "Catalase-like and superoxide dismutase-like activities in human seminal plasma." Urol Res **30**(5): 321-323.

9 LISTA DE ABREVIATURAS

ACs	Adenilato Ciclasa Soluble
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AFMK	1-N ₂ -formil-5-metoxiquinuramina
ALH	<i>Amplitud Lateral Head Displacement</i> ; amplitud media del desplazamiento de cabeza
AMK	N ₁ -acetil-5-metoxiquinuramina
AMPc	Adenosin Monofosfato Cíclico
ANGRA	Asociación Nacional de Ganaderos de la raza Rasa Aragonesa
AANAT	Arilaquilamina N-acetiltransferasa
ANOVA	Análisis de Varianza
AR	Acrosoma Reaccionado
ASMT	N-Acetilserotonina O-Metiltransferasa
ATP	Adenosin 3'-5'-Trifosfato
BCF	Beat Frequency of Flagellum; frecuencia de batida del flagelo
BSA	Albúmina Sérica Bovina
BSP	<i>Binder Sperm Proteins</i>
C	Capacitado
CaM	Calmodulina
Cap-C	Control de capacitación
Cap-CK	Capacitados en <i>cocktail</i>
CASA	<i>Computer-Assisted Sperm Analysis</i> ; Sistema Automatizado de Análisis Espermático
CatSper	<i>Cation Channel Of Sperm</i>
CFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
CTC	Clorotetraciclina
DAF-2	4,5-Diaminofluoresceína
DAG	Diacilglicerol
Db-AMPc	Dibutiril AMPc
DHE	Hidroetidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> ; Factor de Crecimiento Epidérmico

EPO	Eosinofil Peroxidasa
ERK	<i>Extracellular Regulated Kinases</i> ; Quinasas Reguladas por Señales Extracelulares
ESB	<i>Extraction Sample Buffer</i> ; Tampón de extracción de muestras
FD	<i>Fractal Dimension</i> ; Dimensión Fractal
FS	<i>Forward Scatter</i> ; dispersión frontal
FSH	Hormona Foliculoestimulante
GKT	2-(2-clorofenil)-4-metil-5-(piridin-2-il metil)-1H-pirazol-[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona
GMPc	Guanosín Monofosfato Cíclico
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
GPCRs	<i>Protein Coupled-Receptors</i> ; receptores Acoplados a Proteínas G
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i> ; Lipoproteínas de Alta Densida
IDO	Indoleamina 2,3-Dioxigenasa
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IP	Ioduro de Propidio
IP3	Inositol Trifosfato
JNK	<i>Jun N-Terminal Kinases</i> ; Quinasas del Extremo N-Terminal del C-Jun
L-arg	L-arginina
LH	Hormona Luteinizante
LIN	Porcentaje de Linearidad
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil ester
MAD	Ángulo Medio de Desplazamiento
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase; Proteín Quinasa Activada por Mitógenos
M-β-CD	Metil-Beta-Ciclodextrina
MPO	Mieloperoxidasa
MS	Medio de <i>Swim-up</i>
MT₁	Receptor de Melatonina 1
MT₂	Receptor de Melatonina 2
MT₃	Receptor de Melatonina 3
NC	No capacitado

NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i> ; Óxido Nítrico Sintasa
NOX	NADPH Oxidasa
PBS	<i>Phosphate-Buffered-Saline</i> ; tampon fosfato salino
PDEs	<i>Phosphodiesterase</i> ; Fosfodiesterasas
PIP2	<i>Phosphatidylinositol</i> ; Fosfatidil Inositol
PKA	<i>Protein Kinase A</i> ; Proteína Quinasa A
PKC	<i>Protein Kinase C</i> ; Proteína Quinasa C
PLC	<i>Phospholipase C</i> ; Fosfolipasa C
PS	<i>Phosphatidilserine</i> ; Fosfatidilserina
PVDF	Fluoruro de Polivinilideno
RA	Reacción Acrosómica
RNE	Redundant Nuclear Envelope; Envoltura Nuclear Redundante
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> ; Especies Reactivas de Nitrógeno
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> ; Especies Reactivas De Oxígeno
RTK	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i> ; receptores con actividad tirosín quinasa
SAPK	<i>Stress Activated Protein Kinases</i> ; Quinasas Activadas por Estrés
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> ; electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SEA	Servicio de Experimentación Animal
SEM	Error Estándar de la Media
SS	<i>Side Scatter</i> ; dispersión lateral
STR	Straightness; Porcentaje de Rectitud
TA	Temperatura Ambiente
TALP	<i>Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate</i>
TRF	Tracto Reproductor Femenino
TUNEL	<i>Terminal Transferase-Mediated dUTP Nick End-Labeling</i>
VAP	<i>Average Path Velocity</i> ; Velocidad Promedio
VCL	<i>Curvilinear Velocity</i> ; Velocidad Curvilínea
VSL	<i>Straight Line Velocity</i> ; Velocidad Rectilínea
WOB	Índice De Oscilación
ZP	Zona Pelúcida

