

Estudio de la implicación de la calmodulina en el mecanismo de acción de la melatonina sobre los espermatozoides

Trabajo Fin de Máster
Biología Molecular y
Celular

Autor/es: Adrián Millán Laleona

Director/es: Dr. Rosaura Pérez Pé y
Silvia Gimeno Martos

Grupo Biología y Biotecnología de la Reproducción
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y
Celular, Facultad de Veterinaria

Septiembre
2017



Universidad
Zaragoza



La Dra. Rosaura Pérez Pé y Dña. Silvia Gimeno Martos, del
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la
Universidad de Zaragoza

INFORMAN:

Que el alumno Adrián Millán Laleona, ha realizado bajo nuestra dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin de Máster titulado Estudio de la implicación de la calmodulina en el mecanismo de acción de la melatonina sobre los espermatozoides . Este trabajo cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFM, por lo que consideramos procedente su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos la presente en Zaragoza a 13 de septiembre de 2017.

Rosaura Pérez Pé

Silvia Gimeno Martos

Indice

Abstract:	5
Resumen:	6
1. Introducción:	7
1.1 La capacitación espermática:	7
1.1.1 Eventos de la capacitación:	7
1.1.1.1. Incremento en la fluidez de membrana plasmática:	7
1.1.1.2. Fosforilación de proteínas:	8
1.1.1.3. Hiperactivación flagelar:	9
1.1.2. Moléculas y segundos mensajeros implicados en la capacitación:	10
1.1.2.1. Bicarbonato:	10
1.1.2.2. Calcio:	10
1.1.2.3. Aceptores de colesterol:	10
1.1.2.4. Especies reactivas de oxígeno:	11
1.1.2.5. AMPc:	12
1.2 La Melatonina y su papel fisiológico en la reproducción:	12
1.3 La calmodulina:	14
2. Hipótesis y objetivos:	17
3. Materiales y métodos:	18
3.1. Procesado de las muestras espermáticas	18
3.1.1. Recolección del semen:	18
3.1.2. Método Swim up/Dextrano:	18
3.1.3. Capacitación <i>in vitro</i> :	20
3.2. Evaluación de las muestras espermáticas	21
3.2.1. Concentración espermática:	21
3.2.2. Viabilidad celular (integridad de membrana):	22
3.2.3. Motilidad espermática:	23
3.2.5 Evaluación del estado de capacitación:	23
3.2.6 Estudio de la distribución de calcio por citometría de flujo:	25
3.3 Detección de la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas de membrana espermáticas por Western Blotting	26
3.3.1 Extracción de proteínas espermáticas:	26
3.3.2. SDS-PAGE e inmunoblotting:	26
3.4 Análisis estadísticos:	28

4. Resultados y discusión	28
4.1 Efectos de la melatonina sobre sobre la funcionalidad de espermatozoides incubados en condiciones capacitantes	28
4.1.1. Efectos sobre la integridad de membrana:	28
4.1.2. Efectos sobre la motilidad espermática:	30
4.1.3 Efectos sobre la capacitación espermática:.....	32
4.1.4. Efectos sobre la cantidad de calcio intracelular:.....	36
4.2 Efectos de la melatonina y del agonista 8M-PDOT y el antagonista luzindol de sus receptores sobre la fosfocalmodulina en espermatozoides incubados en condiciones capacitantes:.....	38
4.3 Efectos del inhibidor de calmodulina, calmidazolium, sobre muestras de semen capacitado.....	40
4.3.1 Efectos sobre la integridad de membrana:	41
4.3.2 Efectos sobre la motilidad espermática:	41
4.3.3 Efectos sobre la capacitación espermática:.....	43
4.3.4 Efectos sobre los niveles de calcio intracelular:.....	45
5. Conclusiones:	47
Conclusions	47
6. Bibliografía:.....	48

Agradecimientos:

Quiero agradecer a todo el grupo de investigación lo bien que me ha tratado este último año y por la oportunidad que me han brindado al poder trabajar junto a ellos.

En primer lugar agradecer a Silvia Gimeno, mi codirectora del trabajo, quien me ha ayudado continuamente y me ha enseñado no solo biología reproductiva sino también a ser paciente y mantener en todo momento la positividad con los experimentos.

A Rosaura por su atención y tranquilidad pero sobre todo su paciencia en los últimos momentos de elaboración del presente trabajo.

También agradecer al resto del equipo del laboratorio, Sara, Melissa y Carlos por el buen ambiente de trabajo y por todas las veces que se han prestado en colaborar conmigo. Tampoco quiero olvidarme de otras personas como Adriana, Pepín y Tere e incluso gente de otros grupos como Luis por estar siempre dispuestos a echar una mano cuando era necesario. Lo que han unido los moruecos espero que se mantenga como un buen recuerdo para todas aquellas personas con las que he disfrutado de mi pequeño paso por Veterinaria.

Abstract:

Melatonin is a conserved ancient hormone, preserved in several species and it can carry out multiple functions in different cell types. It can make their functions piercing the plasmatic membrane or by specific receptors. In spermatozoa this hormone is believed to act by both ways, mediating in the sperm capacitation, which is the sum of several changes that have to suffer the spermatozoa in order to adquire their fertilising ability. In some cells it has been demonstrated its ability for joining other proteins such as calmodulin or even mediating in phosphorylation processes in this type of proteins, modifying signaling pathways, but it is unknown if the present actions in the spermatozoa are mediated by calmodulin.

Therefore, in the current work it was proposed, as the main objective, to elucidate if the melatonin effects are mediated by its joining to membrane receptors or piercing the plasmatic membrane. So it has been used 100 pM melatonin incubations, with a receptor agonist, 8M-PDOT, with melatonin using at the same time a melatonin receptor antagonist, luzindole, and we analysed the results of membrane integrity, the motility, the capacitation status and the calcium levels. The results suggest that melatonin influences the capacitation process, at least as part, by membrane receptors.

The second objective was the study of the participation of calmodulin in those actions so in one hand, it was measured the P-calmodulin levels in order to determinate if melatonin participates in the process of phosphorylation of calmodulin to regulate their functions, and in the other hand it was tested the effect of a calmodulin inhibitor, calmidazolium, to observe the influence in melatonin actions. The results, although they are preliminary, suggest that melatonin decrease the calmodulin phosphorylation and this action may be mediated by their membrane receptors. Therefore melatonin shows a decrease in the calmodulin posttranslational signals that could affect the action mechanism. On the other hand, the calmodulin inhibition prevents the increase of capacitated spermatozoa and the tyrosine phosphorylation produced by melatonin. In conclusion, the melatonin actions in sperm capacitation might be mediated by calmodulin when the hormone is united with their receptors.

Resumen:

La melatonina es una hormona ancestral muy conservada entre especies y que desempeña una gran variedad de funciones en muchos tipos de células. Es capaz de ejercer sus acciones atravesando la membrana plasmática o uniéndose a receptores específicos. En el espermatozoide esta hormona se cree que puede actuar por ambas vías mediando procesos como la capacitación espermática, una serie de cambios que deben darse en los espermatozoides para adquirir su capacidad fecundante. En algunos tipos celulares se ha demostrado su capacidad de unión con proteínas citosólicas como la calmodulina, o incluso regular procesos de fosforilación en estas proteínas, modificando por tanto rutas de señalización celular, pero se desconoce si las acciones descritas sobre los espermatozoides están mediadas por la calmodulina.

Por todo ello, en el presente trabajo se planteó, como primer objetivo, dilucidar si los efectos que produce la melatonina estaban mediados por su unión a receptores de membrana o los ejercía atravesando directamente la membrana plasmática. Para ello se llevaron a cabo las incubaciones con 100 pM de melatonina, con un agonista de sus receptores, el 8M-PDOT, y con melatonina junto con un antagonista de sus receptores, el luzindol, y se analizaron los efectos sobre la integridad de membrana, la motilidad, el estado de capacitación y los niveles de calcio. Los resultados obtenidos sugieren que la melatonina ejerce su influencia en el proceso de capacitación espermática, al menos en parte, vía receptores de membrana.

El segundo objetivo planteado fue estudiar si las acciones observadas estaban mediadas por la calmodulina, y para ello, por un lado, se analizaron los niveles de fosfocalmodulina (P-Cam) para determinar si la melatonina es capaz de modular la fosforilación de la calmodulina y de esta forma, regular su acción, y por otro, se analizó el efecto de un inhibidor de la calmodulina, el calmidazolium, para observar su influencia en las acciones observadas de la melatonina. Los resultados, aunque preliminares, sugieren que la melatonina disminuye la fosforilación de la calmodulina, y que esta acción también estaría mediada, al menos en parte, por su unión a receptores de membrana. Por tanto la melatonina parece dar lugar a menores modificaciones post-traduccionales de la calmodulina que podrían afectar a su

mecanismo de acción. Por otro lado, la inhibición de la calmodulina evita el incremento en espermatozoides capacitados y la fosforilación de tirosinas producido por la melatonina. En conclusión, las acciones de la melatonina sobre la capacitación espermática parecen estar mediadas por la calmodulina tras la unión de la hormona a sus receptores de membrana.

1. Introducción:

1.1 La capacitación espermática:

En mamíferos es necesario un proceso de maduración funcional de los espermatozoides tras su eyaculación, ya que inicialmente no son capaces de llevar a cabo el proceso de fecundación.

Este proceso se conoce como capacitación espermática y se produce a lo largo del tracto reproductor femenino. La capacitación conlleva cambios tanto bioquímicos como biofísicos no solo en el interior de las células sino también a nivel de membrana. (Ickowicz, Finkelstein, and Breitbart 2012) (Yanagimachi 1994).

Esta serie de modificaciones durante el proceso de capacitación ocurren de forma secuencial y se pueden clasificar. Hay eventos rápidos, como la exposición de los espermatozoides a altas concentraciones de Ca^{2+} y HCO_3^- del plasma seminal, desencadenando a su vez la activación flagelar y la despolarización de la membrana (Wennemuth et al. 2003). Por otro lado los eventos lentos, como la hiperactivación espermática, se producen cuando estas células están en las condiciones adecuadas para llevar a cabo en último término la fecundación del óvulo (Salicioni et al. 2007).

1.1.1 Eventos de la capacitación:

1.1.1.1. Incremento en la fluidez de membrana plasmática:

Durante el proceso de capacitación espermática se lleva a cabo la reorganización de los fosfolípidos de la membrana plasmática del espermatozoide y además la proporción de colesterol disminuye de forma notable (Davis 1981). Estos eventos se producen de forma natural en el tracto reproductor femenino gracias a las secreciones del mismo,

mientras que en el proceso *in vitro* es posible por la presencia en el medio de sustancias como la albúmina (BSA), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y B-ciclodextrinas, descritas como grandes aceptores de colesterol. Se tratan por tanto de sustancias capacitantes, ya que facilitan la eliminación de colesterol y propician la reorganización estructural de la membrana de los espermatozoides (Vadnais et al. 2007).

1.1.1.2. Fosforilación de proteínas:

La fosforilación en tirosinas fue descrita en la célula espermática por primera vez en 1989 (Leyton et al. 1989) identificándose tres proteínas fosforiladas de 52, 75 y 95 KDa gracias al uso de anticuerpos anti-fosfotirosinas. Esta fosforilación aumenta durante la capacitación en diversas especies y parece ser un prerrequisito para que el espermatozoide pueda fecundar al ovocito (P. E. Visconti et al. 1995). Además de en tirosinas, también se produce un incremento de fosforilación en residuos de serinas y treoninas tanto en morueco (Grasa et al. 2009) como en otras especies como humano (Naz 1999) o ratón (Jha et al. 2006).

El incremento en la fosforilación de tirosinas es un evento tardío durante la capacitación y requiere la presencia en el medio de ciertas sustancias como la BSA, Ca^{+2} y HCO_3^- entre otras. La ausencia de alguno de estos constituyentes en el medio hace imposible la fosforilación de proteínas y por tanto no se lleva a cabo el proceso de capacitación espermática (Pablo E. Visconti 2009). Su incremento está ligado en muchas especies a un aumento de la concentración de AMPc (Leclerc and Kopf 1995; P. E. Visconti et al. 1995; Kalab et al. 1998) ya que depende, entre otras, de la vía clásica AMPc/PKA.

En el caso de los espermatozoides ovinos, el incremento en la fosforilación de tirosinas fue descrito por primera vez por nuestro grupo de investigación (Pérez-Pé et al. 2002) que más recientemente demostró la participación de nuevas vías alternativas a la AMPc/PKA de señalización que regulan este proceso (Luna et al. 2012).

1.1.1.3. Hiperactivación flagelar:

Es el cambio en el patrón de motilidad necesario en los espermatozoides de los mamíferos para llevar a cabo la posterior fertilización del óvulo, por tanto es un evento tardío en el proceso de capacitación.

Se produce un aumento en la amplitud curva del movimiento flagelar y un cambio en el propio ritmo con el que se agita el flagelo. Estos cambios en los patrones de movimiento permitirán al espermatozoide atravesar la zona pelúcida del oocito para así fecundarlo.

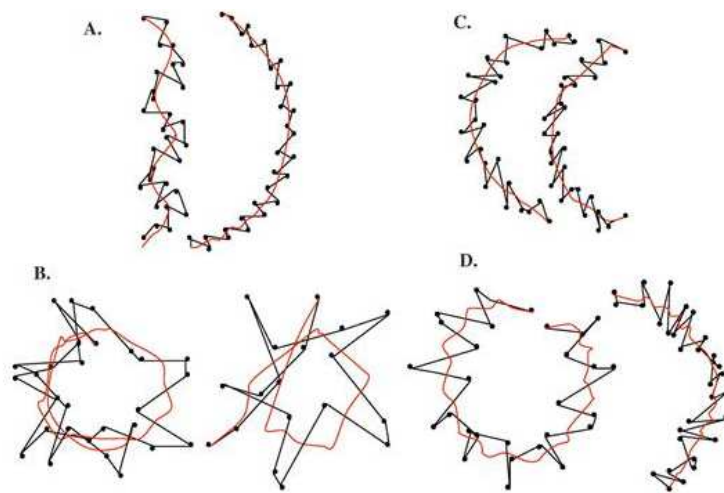


Figura 1.1.1.3. Hiperactivación en espermatozoides de caballo inducida por procaina. A y C representan el control a 0 y 6 horas mientras que B y D han sido tratados con dicha sustancia, induciéndoles a la hiperactivación. Los puntos representan la posición de la cabeza en 30 vídeos sucesivos a 0,5 fotogramas y la línea roja el camino realizado (McPartlin et al. 2009).

La hiperactivación está íntimamente ligada a movimientos de calcio dentro del propio espermatozoide, concretamente los dados en el axonema, que es la estructura de microtúbulos del flagelo, aunque la cascada de señales que lo regula no está totalmente descrita. Además se ha observado que depende de las características físicas del entorno donde se encuentra la célula y que además varía entre especies (Suarez and Ho 2003).

1.1.2. Moléculas y segundos mensajeros implicados en la capacitación:

1.1.2.1. Bicarbonato:

La capacitación es un proceso dependiente del ión HCO_3^- (P. E. Visconti et al. 2002). Este transporte de HCO_3^- a través de la membrana puede ser el responsable del incremento del pH intracelular que se observa durante la capacitación (Zeng, Oberdorf, and Florman 1996).

Los iones HCO_3^- permiten la estimulación de sAC o SACY, una adenilil ciclasa. De esta forma, se incrementan los niveles de cAMP intracelular lo que activa a su vez la PKA y se hace posible la consecuente fosforilación de proteínas (Pablo E. Visconti 2009).

Este incremento de HCO_3^- dará lugar también a una modificación de la asimetría transversal de la membrana plasmática, fenómeno conocido como *scrambling* que implica la externalización de fosfolípidos de membrana junto a la de colesterol de manera dependiente de HCO_3^- .

1.1.2.2. Calcio:

El calcio desempeña un papel importante en el proceso de capacitación espermática, siendo fundamental desde sus inicios para regulación de los niveles de cAMP junto al bicarbonato ya que activa también a la adenilil ciclasa sAC o SACY ya mencionada anteriormente (Pablo E. Visconti 2009).

En muchas especies se ha observado un aumento progresivo de los niveles de calcio durante el proceso de capacitación pero no se ha podido determinar si dicho calcio proviene de reservorios intracelulares o de su entrada desde el exterior. No se conoce tampoco si esta entrada de calcio se produce mediante canales o directamente a través de membrana plasmática debido a las modificaciones tanto en su permeabilidad y fluidez debidas a la reorganización y salida del colesterol. El incremento juega también un papel fundamental en la posterior reacción acrosómica (Snell and White 1996).

1.1.2.3. Aceptores de colesterol:

En el proceso de capacitación *in vitro* se necesita la presencia de BSA en el medio debido a su capacidad para extraer el colesterol de la membrana plasmática (Parrish et

al. 1988) (P. E. Visconti et al. 1999). A pesar de que no se conoce del todo el mecanismo por el cual su retirada de la membrana regula el proceso de capacitación, los cambios tanto en la estructura como en la fluidez de la misma son esenciales.

Sin embargo, la presencia de otros componentes en la membrana del espermatozoide como proteínas, lípidos o ciertos iones hacen que el proceso llevado a cabo por la BSA no sea del todo efectivo. Por ello en los medios de capacitación se suelen añadir también las ciclodextrinas (MbCD) como aceptores alternativos de colesterol. A pesar de su efectividad en este tipo de modificaciones, su mecanismo de acción tampoco está completamente establecido (Zidovetzki and Levitan 2007).

Aunque actúan de forma diferente, la combinación de ambos componentes en el medio hacen posible la correcta modificación de las propiedades de membrana para llevar a cabo el proceso de capacitación espermática (van Gestel et al. 2005).

1.1.2.4. Especies reactivas de oxígeno:

La producción de ROS es uno de los eventos tempranos que se llevan a cabo durante el proceso de capacitación. Conlleva un incremento en las concentraciones del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) u óxido nítrico (NO^{\bullet}) entre otros.

El papel desempeñado por estas especies es múltiple y algo complejo ya que hace posible la activación de todo tipo de cascadas de señalización, siendo de gran importancia, por ejemplo las especies O_2^{\bullet} y NO^{\bullet} para la activación de sAC en la producción de AMPc durante la capacitación espermática (O'Flaherty 2015).

A pesar de estos efectos beneficiosos y necesarios en la célula, su acumulación puede llegar a provocar efectos negativos como la peroxidación de lípidos e incluso daños en el propio DNA (Kothari et al. 2010). Para evitar la pérdida total de su capacidad fecundante, los espermatozoides tienen sistemas de defensa frente al daño oxidativo. Esta protección se da gracias a la presencia de ciertas enzimas y moléculas antioxidantes, entre las que destaca la melatonina presente en el plasma seminal y en el tracto reproductor femenino (Casao et al. 2013).

1.1.2.5. AMPc:

Este nucleótido actúa como segundo mensajero de múltiples procesos biológicos. En los espermatozoides, al igual que ocurre con células somáticas, el incremento de la concentración intracelular de AMPc depende de la activación de la adenilato ciclasa (AC), enzima que cataliza la producción de AMPc a partir de adenosín trifosfato (ATP).

Estudios previos de nuestro grupo de investigación postularon que los elevados niveles intracelulares de fosfodiesterasas (PDEs, enzimas encargadas de la degradación del AMPc) presentes en el espermatozoide ovino, serían los responsables del bajo contenido de AMPc intracelular observado (Colas et al. 2008; Grasa, Cebrián-Pérez, and Muño-Blanco 2006). Asimismo demostraron que era necesaria la adición de un medio específicamente diseñado para mantener niveles intracelulares altos de AMPc (al que en este trabajo nos referiremos como cocktail) para la inducción de la capacitación in vitro en espermatozoides ovinos (Colas et al. 2008).

1.2 La Melatonina y su papel fisiológico en la reproducción:

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina es una indolamina descrita inicialmente por MacCord y Allen (1917), y aislada por primera vez en los pinealocitos bovinos por Lerner (1958). En el año 1959 se identificó su estructura química y se propuso el nombre de melatonina (Lerner et al. 1958). Está presente en muchos organismos, desde animales superiores hasta procariotas y por ello se cree que su existencia data desde los primeros atisbos de vida celular (Reiter et al. 2013).

Se trata una hormona producida mayoritariamente en la glándula pineal, tal y como se muestra en la figura 1.2, a partir de triptófano. En vertebrados la producción de melatonina por la glándula pineal se relaciona directamente con el ritmo circadiano, siendo inhibida por la luz y a su vez estimulada por la oscuridad (Caballero et al. 2012). De esta forma, en plasma sanguíneo, posee un pico máximo de concentración nocturno y unos niveles basales diurnos (Turek, Desjardins, and Menaker 1976).

La melatonina juega un papel fundamental en la regulación de los procesos reproductivos de animales estacionales (Figura 1.2). Sincroniza sus épocas

reproductivas con los cambios ambientales, en concreto con la temperatura y la abundancia de alimentos (Gerlach and Aurich 2000). En el caso de la especie ovina, estimula la reproducción en los días cortos, es decir en las estaciones de otoño e invierno (Malpoux et al. 1997), para que los partos se concentren en primavera-verano. Por el contrario, en épocas de días más largos se disminuye la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Lincoln, Lincoln, and McNeilly 1990) por lo que tiene lugar una menor producción de melatonina en la glándula pineal (Sheikheldin, Howland, and Palmer 1992). En machos ovinos la época no reproductiva está asociada a una peor calidad espermática (Karagiannidis et al. 2000) y menor capacidad fecundante (Palacín et al. 2008).

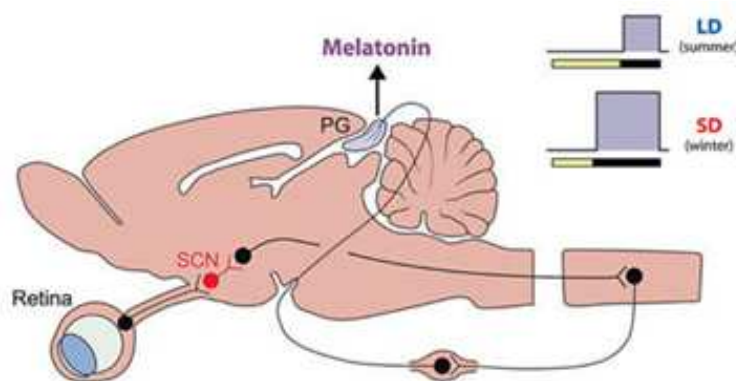


Figura 1.2 Representación del sistema de producción de melatonina en mamíferos. La retina capta la información lumínica hasta llegar al núcleo supraquiasmático del hipotálamo (SNC), encargado de regular los ritmos circadianos. Éste da señales a la glándula pineal para la síntesis de melatonina. En días largos (LD) hay picos cortos de melatonina mientras que en días cortos (SD) se da un incremento en su producción (Revel et al. 2009).

Además, la melatonina también se haya presente en el plasma seminal y tiene efectos directos sobre los espermatozoides, en concreto sobre la capacitación y la supervivencia espermática (Casao et al. 2010). El mecanismo de acción de la melatonina es complejo, ya que puede atravesar directamente la membrana celular y ejercer su acción en el citoplasma, pero además también existen receptores específicos para esta hormona en la membrana plasmática y nuclear y a través de su

unión a ellos, la melatonina desencadenaría diferentes vías de transducción de señales (Liu et al. 1997).

En mamíferos se describieron en 1994 dos receptores de melatonina denominados MT1 y MT2 (Reppert et al. 1995). Además nuestro grupo de investigación identificó la presencia de ambos receptores de melatonina en la membrana plasmática de espermatozoides ovinos (Casao et al. 2012) y demostró que la acción de la melatonina sobre la capacitación espermática podría estar mediada por la unión a estos receptores, concretamente a MT2 (Cebrián-Pérez et al. 2014). Tampoco se puede olvidar la actividad antioxidante de esta hormona, que controlando los niveles de ROS podría regular también la capacitación espermática.

Además, también sería posible que, tras atravesar la membrana plasmática, la melatonina actúe una vez en el citoplasma, uniéndose a la calmodulina (Pozo et al. 1997) ya que esta proteína se encuentra relacionada con diferentes aspectos de la funcionalidad espermática, como la hiperactivación, la capacitación y la reacción acrosómica (Bendahmane, Lynch, and Tulsiani 2001; Colás et al. 2009).

1.3 La calmodulina:

La calmodulina es una proteína abundante en el interior celular y que está altamente conservada. Es capaz de formar complejos con el Ca^{2+} para activar, junto al AMPc, ciertas quinasas como las calcio calmodulina quinasas (CaMKs) por lo que interviene en procesos de transporte de ciertos iones, señalización e incluso muerte celular (Marín-Briggiler et al. 2005). Se caracteriza por tener la capacidad de ligar dos moléculas de Ca^{2+} gracias a dos dominios específicos los cuales están unidos entre sí por una gran alfa hélice como se puede apreciar en la figura 1.3 (RCSB Protein Data Bank).

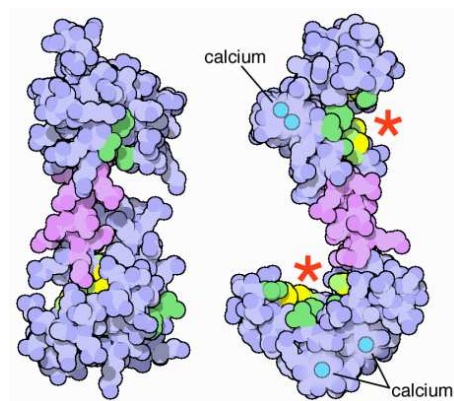


Figura 1.3 Imagen representativa de la proteína calmodulina, sin calcio (izquierda) y con calcio (derecha). Los sitios de unión a proteínas están señalados con estrellas rojas (RCSB Protein Data Bank).

En el espermatozoide, como ya se ha comentado, la reacción acrosómica y el proceso de capacitación cursan con aumentos transitorios de las concentraciones tanto de Ca^{+2} como de AMPc, cuyas acciones vienen reguladas principalmente por quinasas dependientes de AMPc y la calmodulina. Debido a esta dependencia de la concentración de calcio, la calmodulina está también relacionada con modificaciones en los patrones de motilidad espermática durante la capacitación (Pariset et al. 1983). Se localiza principalmente en el flagelo y, dependiendo de las especies, en la región acrosomal o post-acrosomal, aunque su localización puede variar durante la capacitación y la reacción acrosómica (Trejo and Mújica 1990; Schlingmann et al. 2007).

Así en la especie ovina, nuestro grupo evidenció mediante inmunocitoquímica que, además de en el flagelo, algunos espermatozoides también presentan marcaje en el segmento ecuatorial y región post-acrosomal, y la capacitación provoca un incremento de los espermatozoides marcados en esta última región (Grasa et al. 2009).

A pesar de que en otras especies se había descrito que determinados antagonistas de la calmodulina producían una inhibición de la capacitación y la fosforilación de tirosinas, nuestro grupo demostró que, en espermatozoides ovinos, la inhibición de la acción de esta proteína, daba lugar a un incremento en el porcentaje de espermatozoides capacitados (Grasa et al. 2009).

Debido a estas diferencias con otras especies y a su posible implicación en el mecanismo de acción de la melatonina, en este trabajo se planteó el estudio de los cambios en la señal de calmodulina de los espermatozoides debidos a la presencia de melatonina en el medio de incubación.

2. Hipótesis y objetivos:

La melatonina es capaz de ejercer efectos directos sobre la funcionalidad espermática, uniéndose a receptores específicos en la membrana del espermatozoide, o atravesando directamente la membrana. En algunas células somáticas es capaz de unirse a proteínas del citoplasma como la calmodulina, o producir modificaciones post-traduccionales en las mismas. La calmodulina es una proteína con diversas funciones de señalización celular e importante en el proceso de capacitación espermática.

En base a estos antecedentes, la hipótesis planteada en el presente trabajo fue que la melatonina ejerce sus acciones sobre la funcionalidad espermática interaccionando con la calmodulina.

Para comprobar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Dilucidar si los efectos que produce la melatonina sobre los espermatozoides están mediados por su unión a receptores de membrana o los ejerce atravesando directamente la membrana plasmática.
- 2) Estudiar la relación entre la melatonina y la calmodulina en el espermatozoide ovino
 - 2.1) Analizar los efectos de la melatonina sobre la fosforilación de la calmodulina.
 - 2.2) Evaluar los efectos de la inhibición de la calmodulina sobre la acción de la melatonina.

3. Materiales y métodos:

3.1. Procesado de las muestras espermáticas

3.1.1. Recolección del semen:

En los experimentos realizados se utilizó semen ovino obtenido a partir de moruecos adultos (3 y 6 años), pertenecientes a la Asociación Nacional de Ganaderos de la raza *Rasa Aragonesa* (ANGRA), mantenidos en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Zaragoza.

Tanto el mantenimiento de los sementales como la obtención de las muestras corrieron a cargo del personal del SEA. Los animales se mantuvieron con un régimen de tres extracciones semanales, manteniéndose así períodos de abstinencia de dos o máximo tres días. Se obtuvieron dos eyaculados consecutivos por morueco, mediante vagina artificial, y se utilizaron sólo los segundos en base a resultados previos de nuestro equipo de investigación que demostraron que éstos tenían mejores parámetros de calidad seminal (Ollero, Blanco, et al. 1996; Ollero, Muiño-Blanco, et al. 1996; Ollero et al. 1994). Tras la recogida, las muestras se mantuvieron a 37 °C hasta su uso y se trabajó con la mezcla de los segundos eyaculados para minimizar sesgos individuales.

3.1.2. Método Swim up/Dextrano:

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

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

El medio utilizado fue el MS, compuesto por NaCl 50 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 0,4 mM, K₂HPO₄ 0,3 mM, HEPES 21 mM, glucosa 2,8 mM, piruvato sódico 0,33 mM, lactato sódico 18,6 mM, sacarosa 200 mM, pH 6,5. Este medio no contenía ni CaCl₂ ni NaHCO₃ para evitar una capacitación prematura de las células (P. Grasa et al. 2004).

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

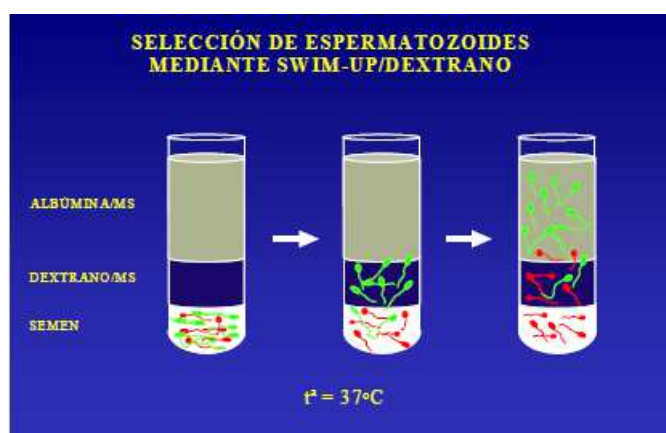


Figura 3.1. Esquema representativo del método de selección de espermatozoides por *swim up/dextrano*.

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

3.1.3. Capacitación *in vitro*:

Para inducir la capacitación espermática *in vitro*, a partir de las muestras previamente seleccionadas mediante *swim-up*, se introdujeron alícuotas de $1,6 \times 10^8$ cels. /ml en una estufa de incubación a 39 °C, con 5% de CO₂ y 100% de humedad, durante 3h o 3h 30 (en función del tipo de experimento realizado). Las incubaciones se llevaron a cabo en medio TALP completo (Parrish *et al.*, 1988), compuesto por NaCl 100 mM, KCl 3,1 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄ 0,3mM, lactato sódico 21,6 mM, CaCl₂ 3 mM, MgCl₂ 0,4 mM, HEPES 10 mM, piruvato sódico 1 mM y glucosa 5 mM; se añadieron 5 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA), y se ajustó su pH a 7,2.

Además, a todas las alícuotas excepto a la muestra control, se les añadió una mezcla de sustancias al medio TALP, con probada capacidad para inducir la capacitación *in vitro* de los espermatozoides ovinos (Colas et al. 2008), y que se denominará **cocktail** a lo largo de la presente memoria. El *cocktail* estaba compuesto por dibutiril-cAMP (db-cAMP, un análogo del AMPc; 1 mM), cafeína y teofilina (ambos inhibidores de fosfodiesterasas; 1 mM, cada uno), ácido okadaico (OA, un inhibidor de fosfatasa de amplio espectro; 0,2 µM) y metil-β-ciclodextrinas (M-β-CD; 2,5 mM). La melatonina utilizada en los experimentos se disolvió en PBS con dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadió a determinadas alícuotas espermáticas a una concentración final 100 pM. La concentración final de DMSO en todas las muestras fue de 0,1 por mil, incluidas las muestras control.

El antagonista de los receptores de membrana para melatonina MT₁/MT₂ propios utilizado fue el luzindol, un inhibidor de carácter competitivo. Por otro lado, el agonista para estos mismos receptores empleado fue el 8-M-PDOT. Ambos fueron disueltos en DMSO y añadidos a una concentración de 1 µM a muestras de espermatozoides ovinos en presencia de medio TALP sólo (control) o junto con los componentes propios del *cocktail*.

En el caso del luzindol, tras su adición a la muestra se dejaba un tiempo de incubación de 30 minutos en condiciones capacitantes para permitir el bloqueo de los receptores

MT1/MT2, y tras este tiempo se añadía melatonina (100 pM) tanto a la tratada con luzindole como a la muestra *cocktail* con melatonina.

Por otro lado, para la segunda parte del trabajo de investigación se empleó calmidazolium (CZ), un inhibidor de la calmodulina (CaM). Se disolvió en DMSO hasta una concentración de 50 mM para luego diluirlo con medio MS hasta la concentración a la que se usó finalmente. Tomando referencias bibliográficas de estudios similares en otras especies animales (Ronquist 1987; Navarrete et al. 2015; Zeng and Tulsiani 2003) se estableció su uso para espermatozoides ovinos a una concentración de 4 μ M.

La nomenclatura que se seguirá a lo largo de la memoria será: ***swim-up*** (muestra libre de plasma seminal sin incubar en condiciones capacitantes), **control** (incubada en medio TALP), **cocktail** (medio TALP + sustancias elevadoras del AMPc), **100 pM** (medio TALP + sustancias elevadoras del AMPc + 100 pM de melatonina), **8-M-PDOT** (medio TALP + sustancias elevadoras del AMPc + 10^{-6} M de agonista), **Luzindol** (medio TALP + sustancias elevadoras del AMPc + 100 pM de melatonina + 10^{-6} M de antagonista de los receptores de melatonina), **Cocktail+CZ** (medio TALP + sustancias elevadoras del AMPc+ calmidazolium) y **100pM+CZ** (medio TALP + sustancias elevadoras del AMPc + 100 pM de melatonina+ calmidazolium)

La cantidad de medio TALP añadido a cada una de las alícuotas dependió de la cantidad de muestra de *swim-up* necesaria para tener la adecuada concentración celular ($1,6 \times 10^8$ cels. /ml), una vez descontado el volumen de los reactivos añadidos en cada caso, hasta alcanzar un volumen final de 500 μ l o 1000 μ l en función del experimento y muestra llevados a cabo.

3.2. Evaluación de las muestras espermáticas

3.2.1. Concentración espermática:

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

se observó con objetivo 10x en un microscopio de contraste de fases. Se contaron las células existentes en 16 cuadrículas de la cámara y se aplicó la fórmula:

$$C = n^{\circ} \text{ espermatozoides contados} \times 10^4 \text{ ml} \times 1/\text{dilución} = \text{espermatozoides/ml}$$

3.2.2. Viabilidad celular (integridad de membrana):

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

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

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

3.2.3. Motilidad espermática:

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

Se analizaron al menos cinco campos por gota y un mínimo de dos gotas por muestra. El programa es capaz de integrar las imágenes captadas mostrando la trayectoria de los espermatozoides y clasificándolos en función de su movimiento en estáticos y mótils (lentos, medios y rápidos) (Figura 3.2.3).

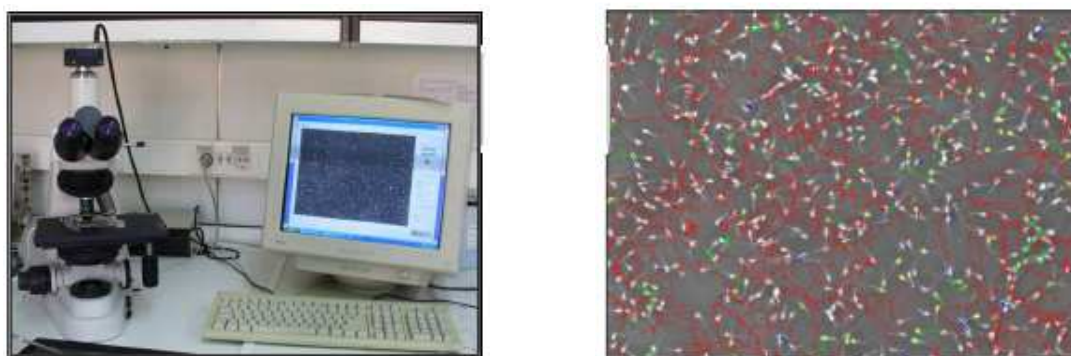


Figura 3.2.3 Imagen del equipo de análisis utilizado para la determinación de la motilidad espermática (B) Análisis de imagen proporcionada por el software ISAS (*Integrated Semen Analysis System*), en este caso con un aumento 10x. Los espermatozoides estáticos aparecen en amarillo, y la trayectoria de los espermatozoides mótils lentos en azul, medios en verde y rápidos en rojo.

3.2.5 Evaluación del estado de capacitación:

La clorotetraciclina (CTC) es un antibiótico que se liga a los cationes asociados a

la membrana, especialmente el Ca^{2+} (Caswell and Hutchison 1971). Al penetrar en la célula espermática, la CTC se une al calcio libre y se vuelve más fluorescente (Ericsson 1967).

La unión de la CTC al calcio (preferentemente en la membrana celular) da lugar a patrones característicos de tinción. Dependiendo de los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide, existen diferentes patrones de fluorescencia que permiten hacer una diferenciación entre células no capacitadas, capacitadas y reaccionadas (Fraser, Abeydeera, and Niwa 1995). En este estudio se utilizó una versión modificada del ensayo descrito por Ward and Storey (Ward and Storey 1984) y validada para semen ovino por nuestro grupo de investigación (Grasa et al. 2006).

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

Para realizar la tinción se mezclaron 20 μl de muestra (las de *swim-up* diluidas 1:10 en medio bifase y las muestras capacitadas sin diluir) y 20 μl de la solución de CTC y se fijó con 5 μl de una solución de paraformaldehído (paraformaldehído al 12,2% (p/v) en tampón Tris-HCl 0,5M, pH 7,4). Se puso una alícuota de 6 μl de cada muestra en un portaobjetos y se le añadieron 4 μl de DABCO (*antifading*, Sigma Chemical Co., Madrid, Spain) para conservar la fluorescencia; se colocó el cubreobjetos y se selló la preparación con esmalte transparente, siempre realizando los procesos protegidos de la luz. Tras dejar enfriar las muestras en el congelador durante 24 horas, se observó con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E-400 equipado con filtro V-2A, se evaluaron unos 100 espermatozoides utilizando un objetivo de inmersión (1000x). Se distinguieron tres tipos de espermatozoides distintos según el patrón de tinción: no capacitados (NC, distribución de la fluorescencia en la cabeza, con o sin una banda ecuatorial brillante), capacitados (C, con fluorescencia en la porción anterior de la cabeza) y con el acrosoma reaccionado (AR, no mostrando fluorescencia en la cabeza) como se observa en la figura 3.2.5

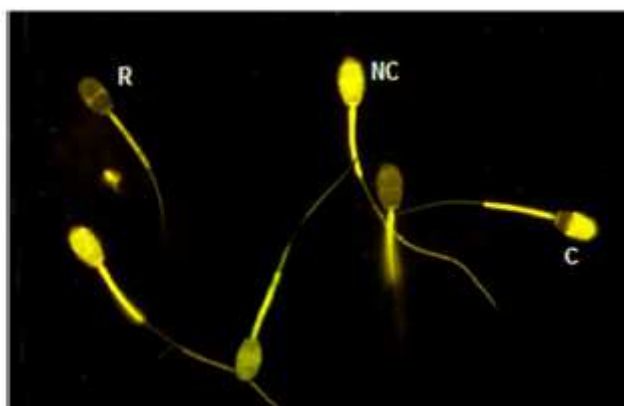


Figura. 3.2.5 Espermatozoides ovinos con tinción de CTC vistos con microscopía de fluorescencia en filtro longitud de onda azul y 1000 x. Se pueden distinguir espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C), y reaccionados (R)

3.2.6 Estudio de la distribución de calcio por citometría de flujo:

El Ca^{2+} intracelular se valoró en las muestras seleccionadas por *swim-up* (diluidas 1:10 en medio de bifase) y muestras capacitadas (diluidas 1:5) a los diez minutos, 1 Hora, 1 hora 30 minutos, 3 horas y 3 horas y 30 minutos de incubación *in vitro* (en función del tipo de experimento llevado a cabo).

Para ello, se tiñieron las muestras con 2 μl de la sonda fluorescente Rhod5N para medir los niveles de calcio intracelular y 2 μl de YO-PRO (*Molecular probes, Thermofisher, USA*; 5 μM en 0,04% de ácido plurónico y 0,25% de DMSO) para evaluar la integridad de membrana (Yeste et al. 2015). Las muestras se fijaron con formaldehído 1,7 mM.

Se analizaron con un citómetro de flujo FC 500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA), que usa un láser de argón a 488 nm. La fluorescencia verde del YO-PRO se detectó usando un filtro de banda a 525 nm (FL-1), mientras que la roja del Rhod5N se detectó con un filtro a 675 nm (FL-4), ambos en escala logarítmica.

Se analizaron un total de 10.000 eventos, con una media de 500-1.000 eventos/segundo. Se excluyeron las células muertas (YO-PRO⁺) y se calculó la intensidad media de la fluorescencia correspondiente a Rhod5N (*X-Mean*) de las células vivas (YO-PRO⁻).

3.3 Detección de la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas de membrana espermáticas y la calmodulina fosforilada por Western Blotting

3.3.1 Extracción de proteínas espermáticas:

Se procedió a extraer las proteínas de membrana, por el método descrito por Colás y col. (Colas *et al.*, 2008). A partir de 200 µl de muestra tanto del *swim-up* como capacitadas *in vitro* (control, *cocktail* y *cocktail* con 100pM de melatonina, cocktail con luzindol, cocktail con 8MPDOT y cocktail con diferentes concentraciones de CZ.

Conteniendo 8 x 10⁷ células/ 500µl se les añadieron 100 µl del medio de extracción (*ESB, Extraction Sample Buffer*), compuesto por 2% de SDS (dodecil sulfato sódico, p/v), TRIS-HCl 0,0626 mM (pH 6,8), 0.002% de azul de bromofenol diluido en glicerol al 10 % (siendo la concentración final de glicerol del 1%), e inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA).

La mezcla se incubó inmediatamente durante 5 minutos a 100 °C en baño de arena. Después se centrifugó a 14000 G, 5 minutos, a temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante, desechando el pellet formado. Finalmente, se añadieron 2-mercaptoetanol y glicerol, a una concentración final del 5% y el 1%, respectivamente, y los lisados se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis por Western Blot.

3.3.2. SDS-PAGE e inmunoblotting:

Las proteínas se separaron en una dimensión siguiendo el método Laemmli (Laemmli, 1970), utilizando patrones de comparación de pesos moleculares, de 10 a 250 kDa (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Se utilizaron geles de acrilamida del 10% y las condiciones de electroforesis fueron 130 V durante 90 min. a 4 °C. Una vez separadas las proteínas, fueron transferidas a una membrana de Immobilon-P

(Millipore, Bedford, MA, USA), utilizando una unidad de transferencia en húmedo, modelo Mini-Protean 3 Cell y el módulo Mini Trans-Blot® de BioRad (BioRad, Hercules, CA).

Una vez realizada la transferencia de las proteínas, los sitios no específicos de las membranas se bloquearon incubándolas 1 hora con 5% BSA (w/v), a temperatura ambiente en un tampón fosfato salino (NaCl 136 mM, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l, KH₂PO₄ 0,24 g/l, y Tween-20 0,5%, pH 7,4).

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

Por otro lado, la detección de la fosforilación de calmodulina se realizó a través de la incubación con el anticuerpo primario monoclonal, en este caso antitubulina de ratón (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), diluido 1/1000 en 0,1 PBS Tween-20 con 1% BSA durante toda la noche a 4 °C. Tras realizar tres lavados de 15 minutos al igual que de la forma anterior, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario de conejo anti-phospho-Calmodulin Tyr138 (Merck KGaA , Darmstadt, Germany) 1/300, durante 1 hora a temperatura ambiente en semioscuridad. Finalmente, las membranas se escanearon utilizando el *Odissey Clx* analizándolas bandas como el mismo software (*Quantity One*) que en el caso anterior.

3.4 Análisis estadísticos:

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

4. Resultados y discusión

4.1 Efectos de la melatonina sobre la funcionalidad de espermatozoides incubados en condiciones capacitantes

Nuestro grupo de investigación describió el efecto dependiente de concentración de la melatonina sobre la capacitación en la especie ovina y demostró que, a concentración de 100 pM, esta hormona tenía un efecto capacitante. Sin embargo, quedaba por determinar el efecto de la adición de melatonina en un medio con agentes elevadores del AMPc, previamente testado como medio capacitante para la especie ovina. Por ello, el primer objetivo del presente trabajo consistió en analizar la acción de la melatonina a concentración de 100 pM en condiciones capacitantes, así como dilucidar si estos efectos eran mediados por la unión de la melatonina a receptores específicos en la membrana espermática. Para ello se llevaron a cabo las incubaciones con melatonina, con un agonista de sus receptores, el 8M-PDOT, y con melatonina junto con un antagonista de sus receptores, el luzindol, y se analizaron los efectos sobre la integridad de membrana, la motilidad, el estado de capacitación y los niveles de calcio.

4.1.1. Efectos sobre la integridad de membrana:

Como se puede observar en la figura 4.1.1.1 la integridad de membrana plasmática no se vio afectada durante el proceso de capacitación, ni tras la primera hora (datos no mostrados), ni al final del mismo (3h), ya que solamente se observó un ligero descenso en el porcentaje de espermatozoides viables con respecto a la muestra de *Swim Up*, pero no significativo.

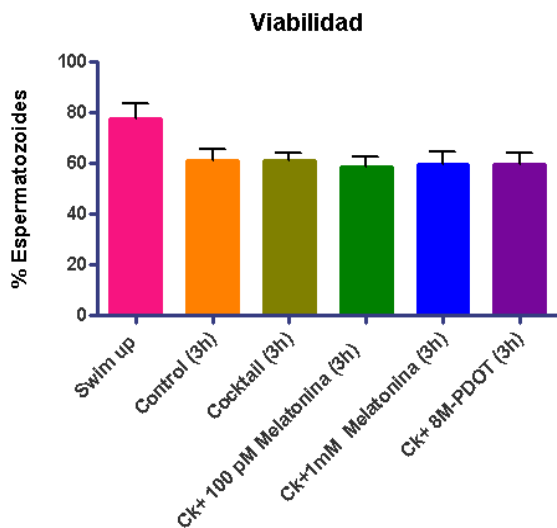


Figura 4.1.1.1 Porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra (CFDA⁺/PI⁻) antes de la capacitación (*swim up*) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad), en medio TALP (control), con alto AMPc (*cocktail*), con melatonina 100pM (Ck+100 pM Melatonina) y con agonista de melatonina 8M-PDOT 1 μM (Ck+8M-PDOT). Los valores fueron se representan como media ± S.E.M. (n=5).

La melatonina no ejerció ningún efecto sobre la viabilidad. Tampoco se observó ningún efecto en la viabilidad en las muestras con el antagonista luzindol (Fig. 4.1.2) incubadas en las mismas condiciones que en anterior caso durante 3horas 30 min ya que estimamos necesario un periodo de 30 minutos para dejar actuar al antagonista antes de añadir la melatonina.

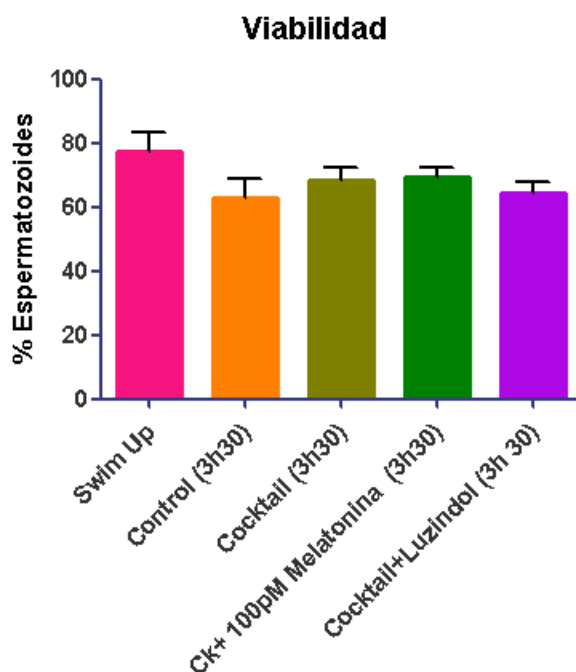


Figura 4.1.2 Porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra (CFDA⁺/PI⁻) antes de la capacitación (*swim up*) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂), en medio TALP (control), con alto AMPc (*cocktail*), con melatonina 100pM (Ck+100Pm Melatonina) y con luzindol, antagonista

de MT1/MT2 (*Cocktail*+Luzindol). Los valores fueron se representan como media \pm S.E.M. (n=5).

4.1.2. Efectos sobre la motilidad espermática:

La incubación con melatonina no dio lugar a cambios significativos en el porcentaje de espermatozoides mótils (datos no mostrados), pero si en el de espermatozoides con motilidad progresiva al final de la incubación (3 h o 3h 30 min). Tras este tiempo de incubación en condiciones capacitantes se apreció un descenso en este parámetro en todas las muestras, pero especialmente en las incubadas con melatonina y su agonista ($12 \pm 2,1$ y $11,75 \pm 1,7$ respectivamente).

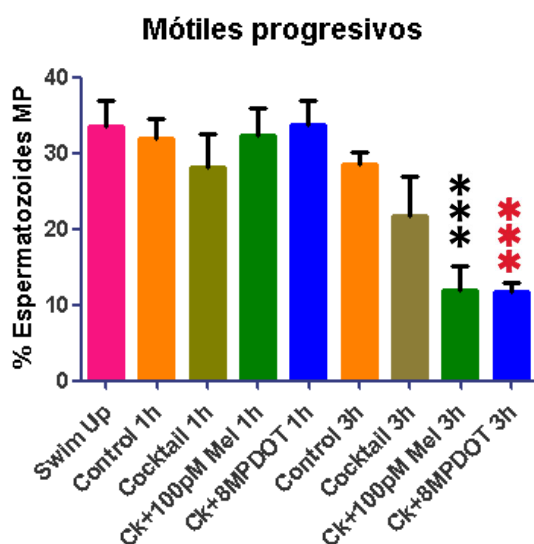


Figura 4.1.2.3 Porcentaje de espermatozoides mótils progresivos antes de la capacitación (*swim up*) y tras 1 y 3 horas de de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂), en medio TALP (control), con alto AMPc (*cocktail*) con melatonina 100pM (Ck+100Pm Melatonina) y con agonista de melatonina 8M-PDOT (Ck+8M-PDOT). Los valores fueron se representan como

media \pm S.E.M. (n=5 *** P < 0.0001 con respecto al control y *** P \leq 0,001 con respecto al *cocktail* a las 3 horas de incubación).

Cuando se incubaron las muestras con el antagonista luzindol, el valor disminuye hasta el 10% en las medidas tomadas a las 3 horas 30 min (figura 4.1.2.4). Estas diferencias fueron significativas con respecto al control (P < 0,001). No se han descrito efectos de luzindol relacionados directamente con cambios en patrones de motilidad espermática, sin embargo para la concentración empleada en este ensayo sí se sugiere su influencia directa. Esta modificación podría estar relacionada con el bloqueo inducido por esta sustancia sobre MT1/MT2 y por tanto afectar de alguna forma a la señalización intracelular que lleva a cabo la melatonina a través de su unión específica.

Dados estos resultados preliminares, sería conveniente una investigación con uso de distintas concentraciones de luzindol y melatonina para estudiar su efecto sobre los patrones de motilidad espermática durante el proceso de capacitación.

Como se ha descrito anteriormente en el presente trabajo, la capacitación cursa con la modificación de los patrones de movimiento en el espermatozoide. Los resultados de este trabajo mostraron un descenso del porcentaje de espermatozoides móviles progresivos. Aunque algunos autores afirman que el tratamiento con melatonina mejora los patrones de motilidad espermática en algunas especies como en toro (Ashrafi, Kohram, and Ardabili 2013) o incluso humano (Konakchieva and Todorov 2011) los resultados de este trabajo señalarían lo contrario ya que al final de la incubación en condiciones capacitantes, las muestras con 100 pM melatonina y con el análogo 8M-PDOT presentaron mucha menor motilidad progresiva que en el control y *cocktail*. El efecto de la melatonina sobre la motilidad en estas condiciones parece estar mediado por la unión de esta hormona a sus receptores, ya que el agonista produjo los mismos efectos.

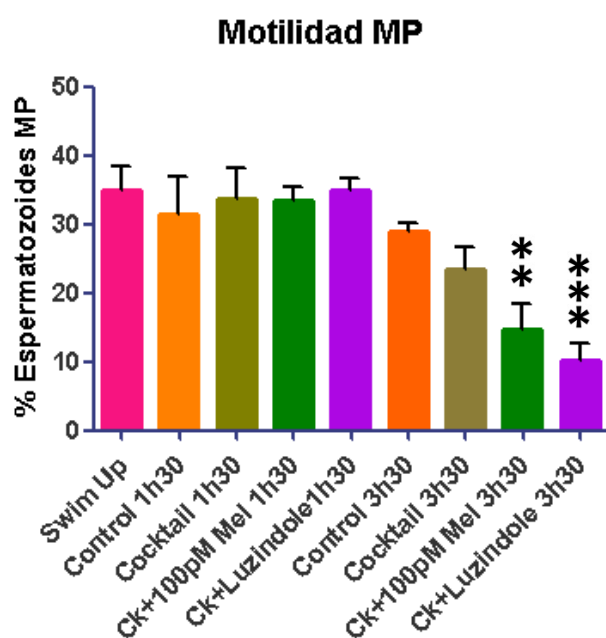


Figura 4.1.2.4 Porcentaje de espermatozoides móviles progresivos antes de la capacitación (*swim up*) y tras 1 y 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂), en medio TALP (control), con alto AMPc (*cocktail*) con melatonina 100pM (Ck+100Pm Melatonina) y con luzindol (Ck+Luzindol). Los valores fueron se representan como media \pm S.E.M. (n=5 *** P < 0,0001

y ** P < 0,001 con respecto al control a las 3 horas 30 min)

4.1.3 Efectos sobre la capacitación espermática:

4.1.3.1 Efectos sobre la distribución de calcio intracelular evaluada por tinción con CTC:

Como se puede observar, la incubación en condiciones capacitantes en el medio TALP no dio lugar a un incremento en el porcentaje de espermatozoides capacitados (figuras 4.1.3.1.1 y figura 4.1.3.1.2)

Sin embargo, cuando se incorporaron agentes elevadores del AMPc en el medio (*cocktail*) se produjo un aumento de los espermatozoides capacitados en todas las muestras con respecto a la muestra control ($P < 0,001$ en todos los casos). La inclusión de melatonina dio lugar a un incremento en este porcentaje con respecto a la muestra sin hormona (*cocktail*), que llegó a ser significativo a partir de las 3 horas de incubación (figura 4.1.3.1.2). En cuanto a la muestra tratada con el agonista de melatonina 8M-PDOT se apreció una disminución del porcentaje de espermatozoides capacitados con respecto al *cocktail* ($P \leq 0,001$) y la melatonina ($P \leq 0,0001$).

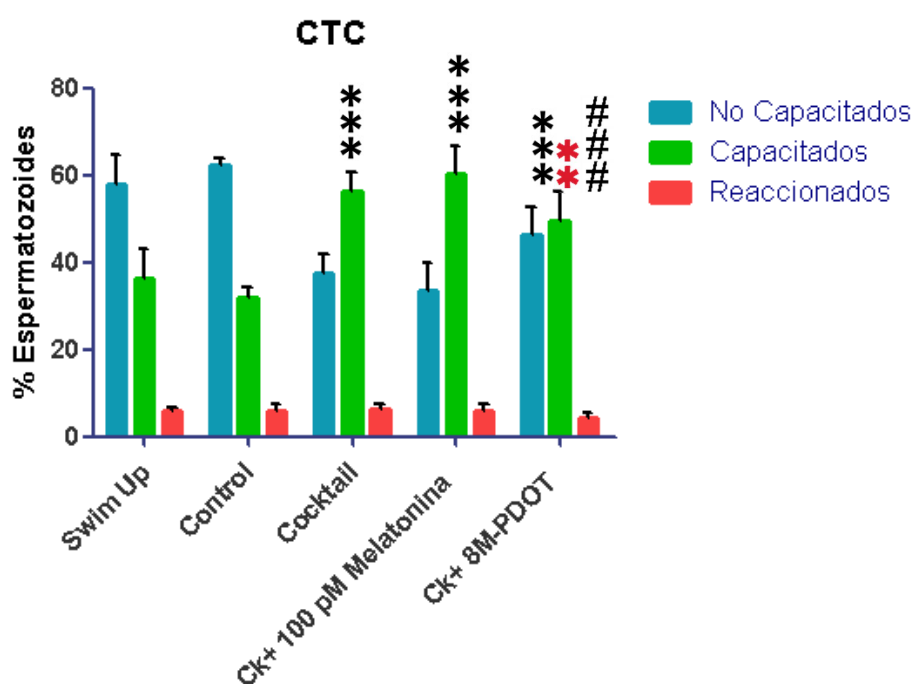


Figura 4.1.3.1.1 Porcentaje de espermatozoides capacitados según la tinción basada en clorotetraciclina (CTC), antes de la propia capacitación (*Swim Up*) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C, 5% de CO₂ y 100% humedad) en medio TALP (Control), con alto AMPc (*Cocktail*), con melatonina 100pM (Ck+100Pm

Melatonina) y con agonista de melatonina 8M-PDOT (Ck+8M-PDOT). Los valores fueron se representan como media \pm S.E.M. ($n=9$ *** $P \leq 0,0001$ con respecto al control, ** $P \leq 0,01$ con respecto al *cocktail* y # $P \leq 0,0001$ con respecto a Ck+ 100 pM melatonina a las 3 horas de incubación).

Este valor parece indicar un efecto descapacitante del agonista a la concentración a la que se ha utilizado (1 μ M). Esto sugiere que esta molécula podría ejercer una acción similar a la melatonina, que presenta una acción capacitante o descapacitante dependiendo de la concentración. Así, la melatonina a concentración 1 μ M presenta una acción descapacitante como demostraron trabajos previos de nuestro grupo (Gonzalez-Arto et al. 2016). De igual modo una concentración elevada de 8M-PDOT podría tener un efecto similar.

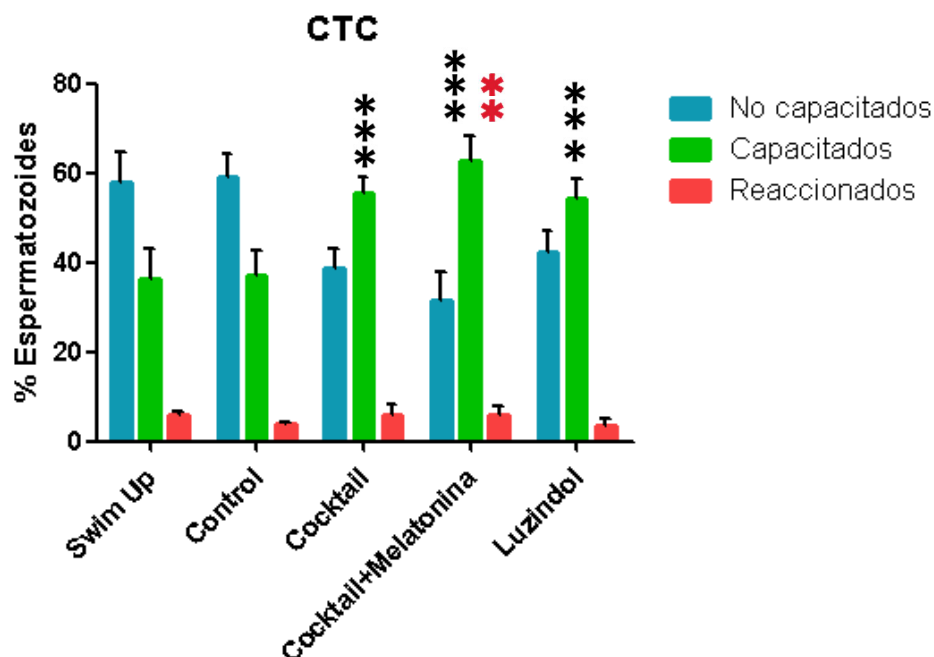


Figura 4.1.3.1.2 Porcentaje de espermatozoides capacitados según la tinción basada en clorotetraciclina (CTC), antes de la propia capacitación (*Swim Up*) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C, 5% de CO₂ y 100% humedad) en medio TALP (Control), con alto AMPc (*Cocktail*), con melatonina 100pM (Ck+100Pm Melatonina) y con luzindole (Ck+luzindole). Los valores fueron se representan como

media \pm S.E.M. (n=9 *** $P < 0,0001$ con respecto al control y ** $P \leq 0,001$ con respecto al *cocktail* a las 3 horas y 30 min de incubación).

Cuando las muestras se trataron con luzindol, se observaron diferencias significativas en la proporción de espermatozoides capacitados con respecto a la tratada solamente con melatonina 100 pM, presentando valores similares a los obtenidos en la muestra *cocktail*. Esto refleja la influencia mediada por los receptores MT1/MT2 sobre el proceso de capacitación, ya que al bloquearlos mediante el uso de 1 μ M luzindol parece omitirse la influencia de las propiedades capacitantes de la melatonina empleada a bajas concentraciones.

4.1.3.2 Análisis de la fosforilación de tirosinas de la membrana espermática:

De forma complementaria al estudio de la distribución de calcio mediante la técnica CTC se realizaron evaluaciones en el patrón de fosforilación en tirosinas de las proteínas de las muestras espermáticas tras el proceso de incubación en condiciones capacitantes. En las membranas analizadas, de las que se muestran algunas representativas (figuras 4.1.3.2.1 A y figura 4.1.3.2.2 A). Se apreciaron a simple vista cambios en los patrones de fosforilación entre las muestras, aunque en la cuantificación por densitometría (figuras 4.1.3.2.1 B y figura 4.1.3.2.2 B) no se encontraron diferencias significativas debidas principalmente a las grandes variaciones en cuanto a la intensidad de señal total de las membranas.

Se observó un aumento en los niveles de fosfotirosinas en todas las muestras incubadas en medio *cocktail*, lo que concuerda con los resultados previamente obtenidos en nuestro grupo de investigación (Grasa *et al.*, 2006), aunque con diferencias entre ellas, destacando el incremento de las incubadas con melatonina. En el caso del agonista 8M-DOT, es capaz de aumentar la señal con respecto a la muestra *cocktail* sin hormona, aunque no al mismo nivel.

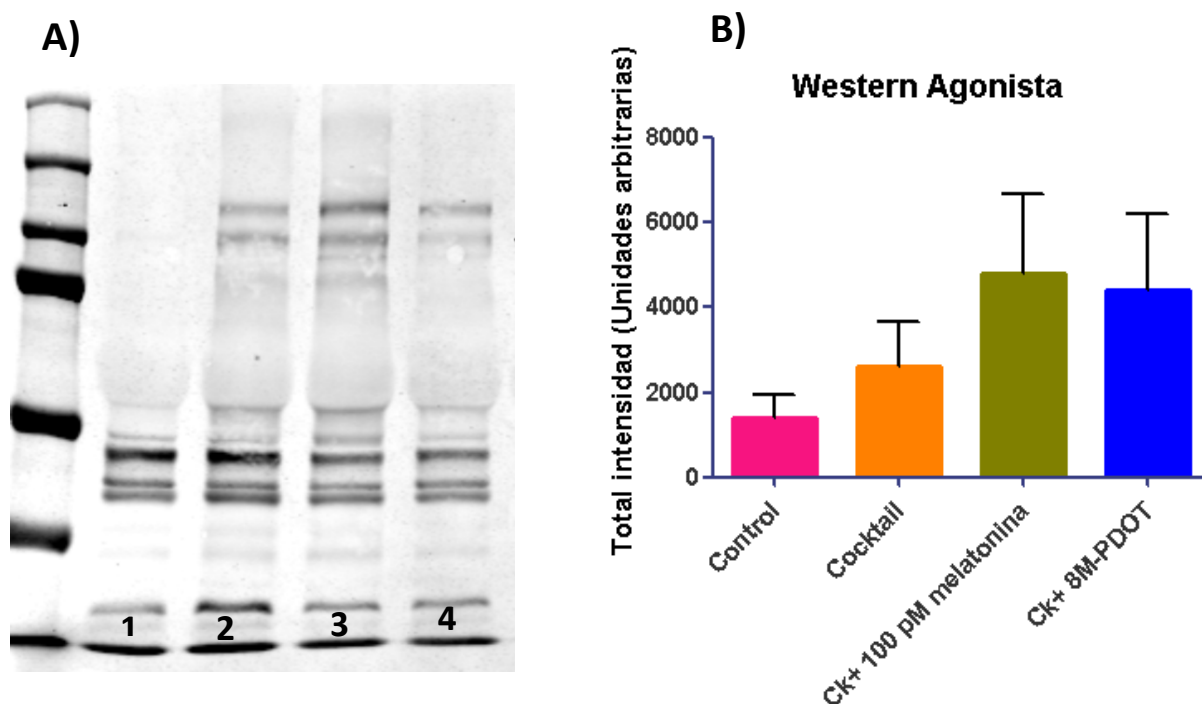


Figura 4.1.3.2.1 A) Western-blot representativo de los obtenidos utilizando anticuerpos antifosfotirosinas en proteínas de muestras tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C ,5% de CO₂ y 100% humedad). (1) Control, (2) *Cocktail*, (3) Ck+ 100 pM Mel y (4) Ck+ 100 pM Mel+ 1 μ 8M-PDOT. B) Cuantificación por densitometría del total de proteínas fosforiladas en tirosinas de las muestras espermáticas tras 3 horas de incubación en condiciones capacitaciones. Los valores se representan como media ± S.E.M. (n=4)

En cuanto a las muestras incubadas con luzindol, su valor es mucho menor al obtenido en el caso de la muestra con melatonina. Esta es una evidencia más del papel como mediadores del proceso de capacitación espermática y de su acción mediada por receptores.

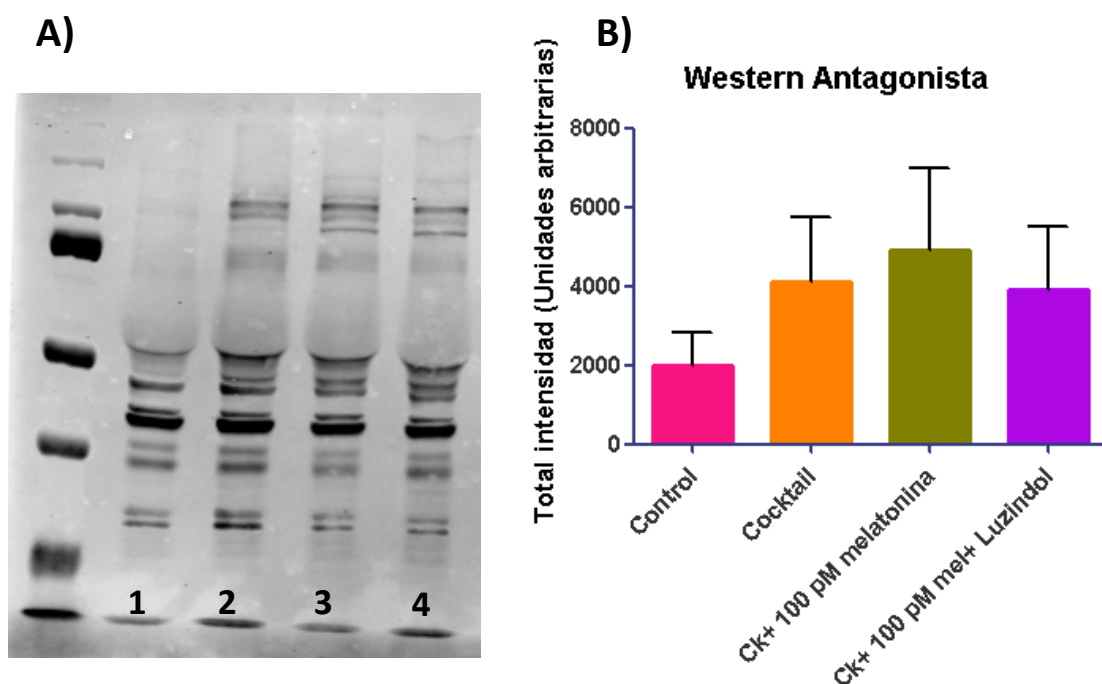


Figura 4.1.3.2.2 A) Western-blot representativo de los obtenidos utilizando anticuerpos antifosfotirosinas en proteínas de muestras tras 3 horas 30 min de incubación en condiciones capacitantes (39 °C ,5% de CO₂ y 100% humedad). (1) Control, (2) *Cocktail*, (3) Ck+ 100 pM Mel y (4) Ck+ 100 pM Mel+ 1 μ Luzindol. B) Cuantificación por densitometría del total de proteínas fosforiladas en tirosinas de las muestras espermáticas tras 3 horas 30 min de incubación en condiciones capacitaciones. Los valores se representan como media ± S.E.M. (n=4)

4.1.4. Efectos sobre la cantidad de calcio intracelular:

Se quiso evaluar las fluctuaciones de los niveles de calcio intracelular de las muestras, y para ello se midió la intensidad media debida a la sonda RhodN5 en células viables (YO PRO-) por citometría de flujo.

Los resultados obtenidos mostraron un aumento en los niveles de calcio desde los primeros momentos del proceso de incubación en condiciones capacitantes como ciertos autores habían descrito (Ho et al., 2003).

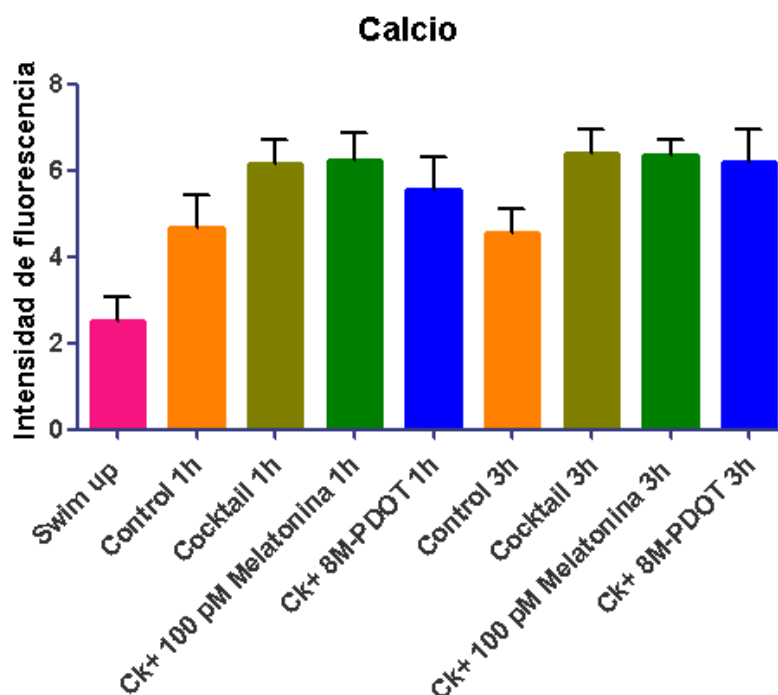


Figura 4.1.4.1 Intensidad media de fluorescencia emitida por la sonda Rhod5N evaluada por citometría de flujo antes de la capacitación (*swim up*) y tras 1 hora y 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂) (n=9).

A pesar de que las diferencias no son significativas, se apreció un descenso en los niveles de calcio en las muestras en medio TALP (Control), que con respecto a las incubadas en medio *cocktail* tanto a 1 hora (Control $4,68 \pm 0,83$ y *cocktail* $5,81 \pm 0,66$) como a las 3 horas (Control $4,92 \pm 0,71$ y *cocktail* $6,1 \pm 0,75$).

La inclusión de melatonina o de su agonista 8M-PDOT no produjo ningún efecto en comparación con la muestra *cocktail* sin hormona (Figura 4.1.4.1) Sorprendentemente, cuando se evaluaron los niveles de calcio para determinar el efecto del antagonista luzindol, sí se observaron diferencias significativas entre las muestras *cocktail* y la muestra del *swim up* tanto a 1 hora 30 min como a 3 horas 30 min ($P \leq 0,01$ en ambos casos)(Figura 4.1.4.2), quizás debida a la determinación de los niveles de calcio en momentos distintos (media hora de diferencia con respecto a las evaluaciones anteriores). En este caso, las muestras con melatonina y con su antagonista no se apreció este incremento en los niveles de calcio.

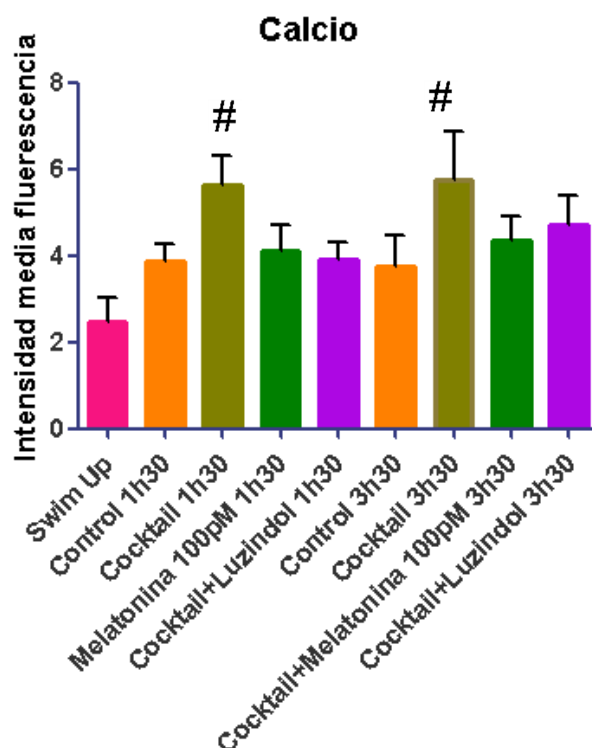


Figura 4.1.4.2 Intensidad media de fluorescencia emitida por la sonda Rhod5N evaluada por citometría de flujo antes de la capacitación (*swim up*) y tras 1 hora 30 min. y 3 horas 30 min. de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5%, de CO₂ y 100% humedad) (n=9 # P≤ 0,01 con respecto al *swim up*).

Estos resultados no permiten establecer una relación directa entre el grado de espermatozoides capacitados con respecto a los niveles intracelulares de calcio. Aunque parece existir una liberación paulatina de este ion durante la capacitación aunque no son suficientes para llegar a establecer un patrón determinado.

4.2 Efectos de la melatonina y del agonista 8M-PDOT y el antagonista luzindol de sus receptores sobre la fosfocalmodulina en espermatozoides incubados en condiciones capacitantes:

El segundo objetivo sería estudiar si las acciones observadas estaban relacionadas con la calmodulina presente en el citoplasma de los espermatozoides, y para ello se analizaron los niveles de fosfocalmodulina (P-Cam) en las muestras, ya que en algunas células somáticas se ha descrito que la melatonina es capaz de modular la fosforilación de la calmodulina y de esta forma, regular su acción.

Para llevarlo a cabo, se realizaron western-blot con un anticuerpo anti P-Cam partir de las muestras de proteínas extraídas de espermatozoides tras su incubación en condiciones capacitantes en presencia de melatonina, del agonista 8M-PDOT, y de melatonina junto con el antagonista luzindol.

Los resultados en este apartado son muy preliminares ya que se tuvo que poner a punto las condiciones específicas para la realización del western teniendo en cuenta el pequeño peso molecular (17 KDa) que presenta esta proteína. Tras numerosos intentos solamente se obtuvieron datos a partir de la membrana presentada (Figura 4.2 A) y actualmente se continúa trabajando para la obtención de resultados más fiables.

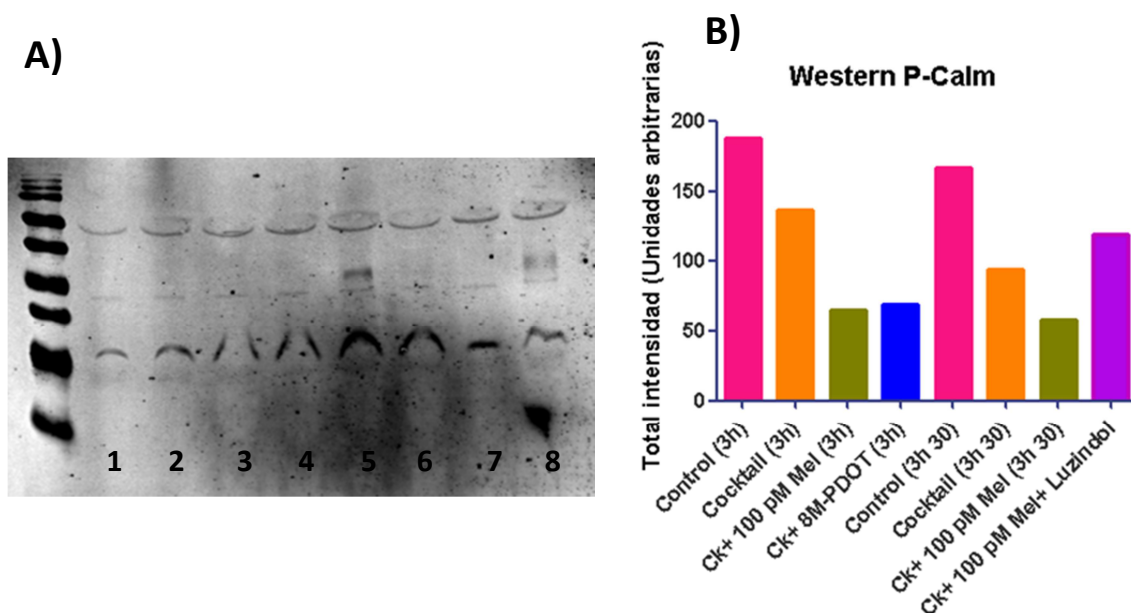


Figura 4.2 A) Western-blot representativo de los obtenidos utilizando anticuerpos antifosfotirosinas en proteínas de muestras tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C ,5% de CO₂ y 100% humedad). (1) Control 3h, (2) *Cocktail* 3h, (3) Ck+ 100 pM Mel 3h, (4) Ck+ 100 pM Mel+ 1 μ 8M-PDOT 3h, (5) Control 3h 30, (6) *Cocktail* 3h 30min, (7) Ck+ 100 pM Mel 3h 30 min y (8) Ck+ 100 pM Mel+ 1 μ Luzindol 3h 30 min.

Tras la cuantificación por densitometría de las bandas observadas correspondientes a P-Cam (figura 4.2), parece que la incubación con melatonina y con su agonista dieron

lugar a un descenso en la señal con respecto al *cocktail*. Por otro lado, cuando se inhibieron los receptores de melatonina mediante el uso de luzindol la señal aumentó notablemente, llegando incluso a superar ligeramente el valor del *cocktail*. Ambos resultados parecen sugerir que el efecto sobre la fosfocalmodulina esta mediado por los receptores MT1/MT2.

En otras células, como en algunos tipos de células epiteliales, se ha descrito la modificación de la calmodulina por la melatonina como una vía de inhibición de la acción de esta proteína debido a que su fosforilación le impide interaccionar correctamente con sus proteínas diana (Soto-Vega et al. 2004). En este caso, en presencia de la concentración de melatonina probada, parece que existe una menor señal de fosforilación de calmodulina, por lo que existiría más calmodulina en la conformación adecuada para ejercer su acción, probablemente estimulando la capacitación espermática. Sin embargo, en la muestra control, donde el porcentaje de espermatozoides capacitados es menor que en el resto, la señal de fosfocalmodulina es mayor.

4.3 Efectos del inhibidor de calmodulina, calmidazolium, sobre muestras de semen capacitado

Para comprobar la relación de la calmodulina con la capacitación en los espermatozoides ovinos, se realizaron una serie de ensayos incubando a los espermatozoides en condiciones capacitantes con un inhibidor de calmodulina, el calmidazolium, en presencia o ausencia de melatonina.

4.3.1 Efectos sobre la integridad de membrana:

La incubación con calmidazolium no dio lugar a diferencias significativas en los porcentajes de espermatozoides viables como se muestra en la imagen 4.3.1.

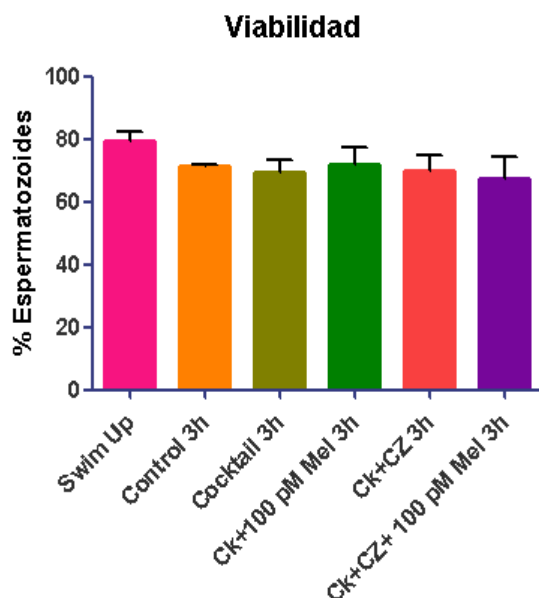


Figura 4.3.1 Porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra (CFDA⁺/PI⁻) antes de la capacitación (*swim up*) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad), en medio TALP (control), con alto AMPc (*cocktail*), con melatonina 100pM (Ck+100 pM Melatonina), *cocktail* con CZ 4 μM (Ck+CZ) y con melatonina 100 pM junto a 4 μM CZ (Ck+CZ+100 pM Mel). Los valores fueron se representan como media ± S.E.M. (n=3).

4.3.2 Efectos sobre la motilidad espermática:

En este caso tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a los valores de motilidad total obtenidos, como se muestra en la figura 4.3.2.1. Se apreciaron fluctuaciones entre muestras y un ligero descenso generalizado en el conjunto de datos obtenido tras la incubación durante 3 horas en condiciones capacitantes, especialmente en la en presencia de calmidazolium con respecto al *cocktail* (P < 0,01).

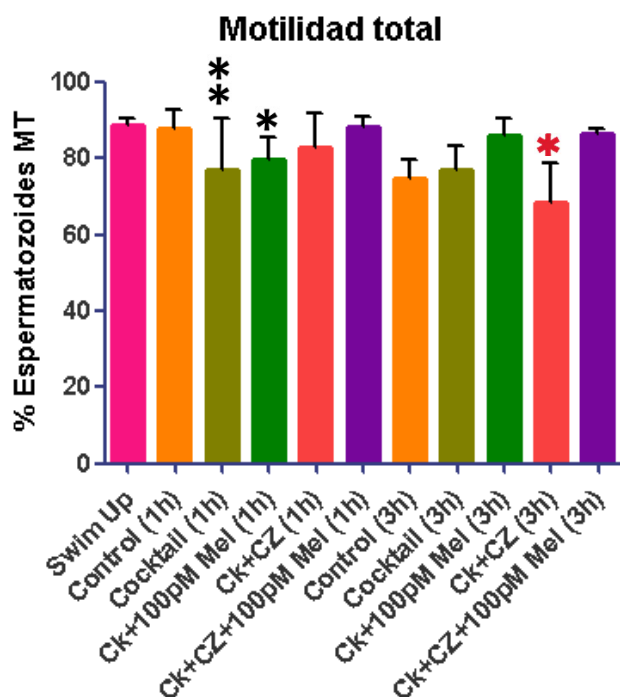


Figura 4.3.2.1 Porcentaje de espermatozoides móviles totales antes de la capacitación (*swim up*) y tras 1 y 3 horas de de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂ y 100% humedad), en medio TALP (control), con alto AMPc (*cocktail*) con melatonina 100pM (Ck+100 pM Melatonina), *cocktail* con 4 μM CZ (Ck+CZ) y *cocktail* con 100 pM Mel y 4 μM

CZ (Ck+CZ+100 pM Mel) . Los valores fueron se representan como media \pm S.E.M. (n=3 ** $P \leq 0,001$ y * $P \leq 0,01$ con respecto al control 1 hora y * $P \leq 0,01$ con respecto al *cocktail* 3 horas de incubación).

En cuanto a los datos de motilidad progresiva medidos también tras 1 y 3 horas de incubación, se apreció un notable descenso ($P \leq 0,01$ en todos los casos) con respecto al valor inicial del *Swim Up* en todas las muestras como se observa en la figura 4.3.2.2.

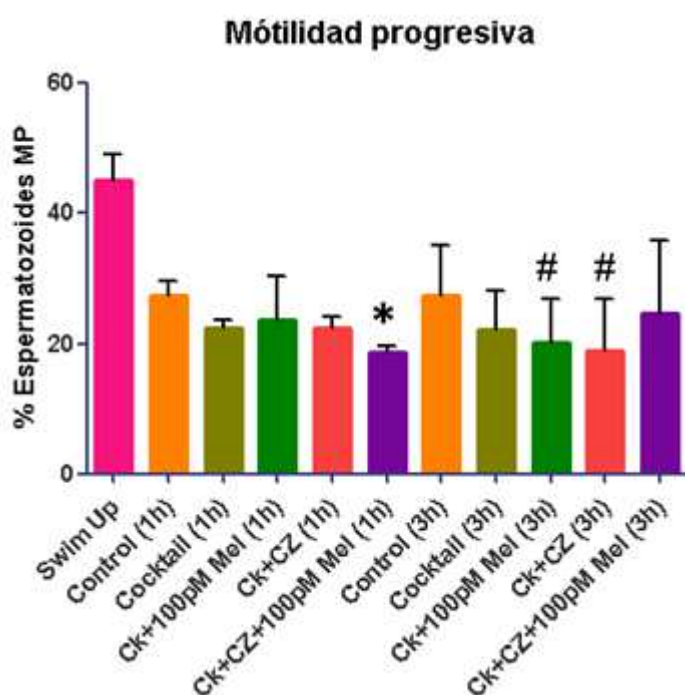


Figura 4.3.2.2 Porcentaje de espermatozoides móviles progresivos antes de la capacitación (*swim up*) y tras 1 y 3 horas de de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO₂ y 100% humedad), en medio TALP (control), con alto AMPc (*cocktail*) con melatonina 100pM (Ck+100 pM Melatonina), *cocktail* con 4 μ M CZ

(Ck+CZ) y *cocktail* con 100 pM Mel y 4 μ M CZ (Ck+CZ+100 pM Mel). Los valores fueron se representan como media \pm S.E.M. (n=3 * $P \leq 0,01$ con respecto al control 1 hora y # $P \leq 0,01$ con respecto a control a las 3 horas).

La incubación con melatonina, como ya se había observado anteriormente, produjo un descenso en la motilidad progresiva, que fue mayor en presencia del inhibidor de calmodulina ($P < 0,01$ con respecto al control a una y tres horas).

4.3.3 Efectos sobre la capacitación espermática:

4.3.3.1 Efectos sobre la distribución de calcio intracelular evaluada por tinción con CTC:

La evaluación del estado de capacitación de muestras tratadas con CZ demuestra la influencia que ejerce este inhibidor sobre el proceso de capacitación, tras 3 horas de incubación, como se muestra en la figura 4.3.3. Como era de esperar y ya habíamos observado en experimentos anteriores de este trabajo, la muestra *cocktail* presentó diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides capacitados ($P \leq 0,0001$) con respecto al control. La presencia de calmidazolium en la muestra cocktail tanto con como sin melatonina, provocó un descenso significativo de este porcentaje ($P < 0,001$).

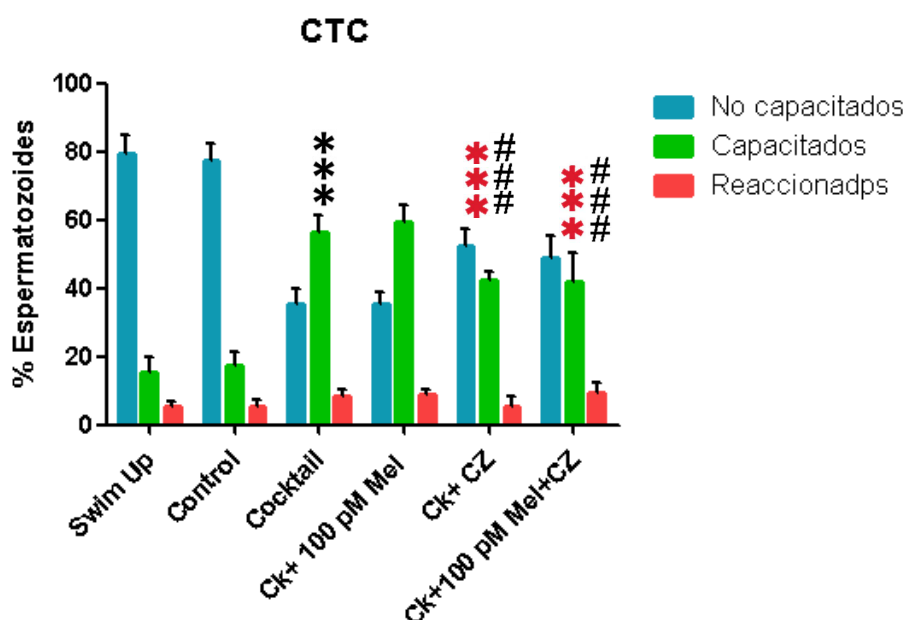


Figura 4.3.3 Porcentaje de espermatozoides capacitados según la tinción basada en clorotetraciclina (CTC), antes de la propia capacitación (*Swim Up*) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C, 5% de CO₂ y 100% humedad) en medio TALP (Control), con alto AMPc (*Cocktail*), con melatonina 100pM (Ck+100 pM Melatonina *cocktail* con 4 μM CZ (Ck+CZ) y *cocktail* con 100 pM Mel y 4 μM CZ (Ck+CZ+100 pM Mel). Los valores fueron se representan como media ± S.E.M. (n=3 *** $P \leq 0,001$ con respecto al control, *** $P \leq 0,0001$ con respecto al *cocktail* y # # # $P \leq 0,001$ con respecto a Ck+ 100 pM melatonina a las 3 horas de incubación).

Estos resultados coinciden con los observados por otros investigadores en diferentes especies tras la inhibición de la calmodulina (Bendahmane et al. 2001; Tulsiani 2007). La inhibición de la calmodulina, inhibe la capacitación (según los patrones de CTC) en un medio capacitante, tanto en presencia como en ausencia de melatonina.

4.3.3.2 Análisis de la fosforilación de tirosinas de la membrana espermática:

Al cuantificar las señales de fosforilación en tirosinas por western-blot tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (figura 4.3.3.1B) de varias membranas de las que se muestra una representativa figura 4.3.3.1 A), se apreciaron diferencias, aunque, como se ha comentado anteriormente, por la propia variación en el revelado de las membranas, no llegaron a ser significativas.

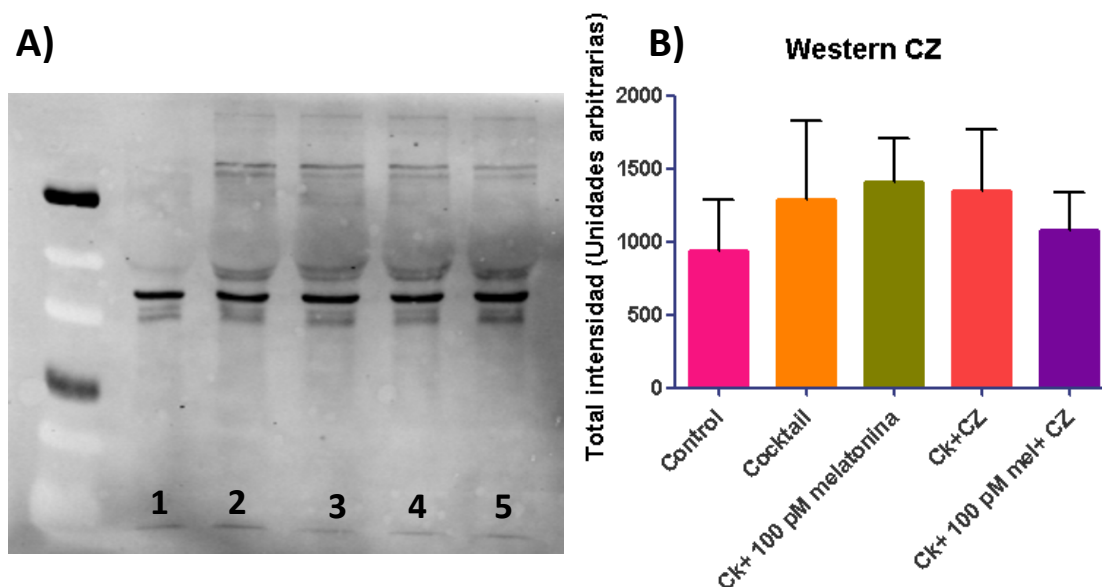


Figura 4.3.3.1 A) Western-blot representativo de los obtenidos utilizando anticuerpos antifosfotirosinas en proteínas de muestras tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C ,5% de CO₂ y 100% humedad). (1) Control, (2) *Cocktail*, (3) Ck+ 100 pM Mel y (4) Ck+ 4 μM CZ y (5) Ck+ 100 pM Mel+ 4 μM CZ. B)

Se observó un aumento de señal en todos los casos con respecto al control debido a la acción capacitante del medio *cocktail* ya comentada en el presente trabajo. La presencia de calmidazolium en el medio, no produjo un descenso en la señal en comparación con la muestra cocktail, pero sí en la muestra cocktail con melatonina. Es

decir, la inhibición de la calmodulina inhibe el incremento en la fosforilación de tirosinas producido por la melatonina, por lo que evidentemente esta proteína juega un papel fundamental en la acción de la melatonina sobre la capacitación espermática, como también reflejan los resultados obtenidos en el apartado anterior tras la tinción con clorotetraclina (apartado 4.3.3.1).

4.3.4 Efectos sobre los niveles de calcio intracelular:

El estudio de los niveles de calcio intracelular no evidenció diferencias significativas en ninguno de los casos, tal y como muestra la figura 4.3.4. En este caso se realizaron mediciones tras 10 min, 1 hora y 3 horas de incubación de las muestras en condiciones capacitantes, para poder poner de manifiesto cambios inmediatos o a corto plazo en los niveles de calcio, como describen algunos autores (Colas et al., 2010), pero en este caso no se observó ningún cambio significativo tampoco a los 10 minutos de incubación.

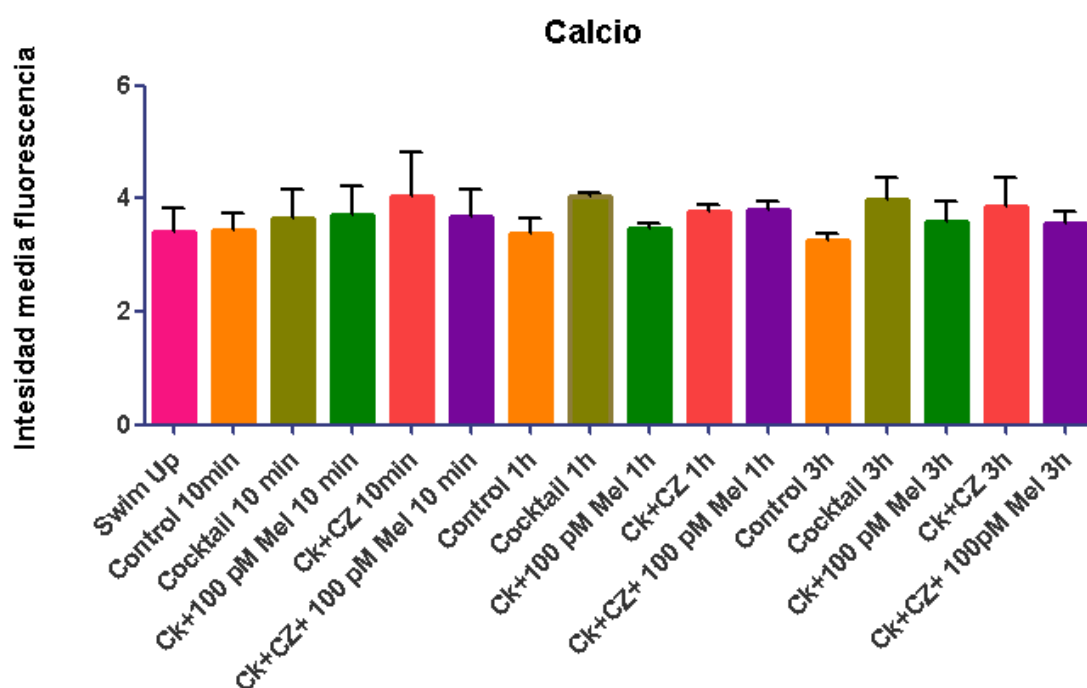


Figura 4.3.4 Intensidad media de fluorescencia emitida por la sonda Rhod5N evaluada por citometría de flujo antes de la capacitación (*swim up*) y tras 10 min, 1 hora y 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad), en medio TALP (control), con alto AMPc (*cocktail*), con melatonina 100pM

(Ck+100 pM Melatonina), *cocktail* con CZ 4 μ M (Ck+CZ) y con melatonina 100 pM junto a 4 μ M CZ (Ck+CZ+100 pM Mel) (n=3).

En estos experimentos tampoco se evidenciaron cambios en los niveles de calcio en ninguna de las muestras, lo que no coincide con los resultados mostrados en apartados anteriores. Para obtener resultados concluyentes de este estudio se debería aumentar el número de muestras analizadas ya que podría ser uno de las principales causas de esta falta de concordancia. Otra de las posibles causas podría ser que estos experimentos se realizaron durante la época no reproductiva (primavera-verano) del ganado ovino, caracterizada por una peor calidad espermática (Karagiannidis et al., 2000), y a veces, por diferente comportamiento tras la capacitación con respecto a los espermatozoides obtenidos en época reproductiva.

5. Conclusiones:

1. La melatonina ejerce su influencia en la capacitación espermática tanto en la distribución de calcio, según la evaluación por CTC, como en la fosforilación en tirosinas, mediada, al menos en parte, por la unión a sus receptores en la membrana espermática.
2. A pesar de ser preliminares, los resultados de este trabajo apuntan a que la melatonina, a la concentración testada de 100 pM, disminuye la cantidad de calmodulina fosforilada permitiendo una mayor capacitación espermática. Además este efecto parece estar mediado por receptores de membrana.
3. La calmodulina es una proteína importante en la capacitación de los espermatozoides ovinos ya que al inhibirla el tanto el porcentaje de espermatozoides capacitados como la fosforilación en tirosinas disminuyen.
4. Las acciones de la melatonina sobre la capacitación espermática parecen estar mediadas por la calmodulina tras la unión de la hormona a sus receptores de membrana.

Conclusions

1. Melatonin influences the calcium sperm capacitation, in the calcium levels evaluated by CTC and in the tyrosine phosphorylation, both mediated, at least as part, by the joining to their membrane receptors.
2. In spite of being preliminaries, those results indicate that melatonin, at 100 pM, decrease the quantity of phosphorylated calmodulin allowing an increment in the sperm capacitation. Thus, this effect should be mediated by membrane receptors.

3. Calmodulin is an important protein during the ovine sperm capacitation because of the decrease in the percentage of ram sperm and the tyrosine phosphorylation when it is inhibited.
4. The melatonin actions in sperm capacitation seem to be mediated by calmodulin after the joining of the hormone with the membrane receptors.

6. Bibliografía:

- Bendahmane, M., C. Lynch, and D. R. Tulsiani. 2001. 'Calmodulin Signals Capacitation and Triggers the Agonist-Induced Acrosome Reaction in Mouse Spermatozoa'. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 390 (1): 1–8. doi:10.1006/abbi.2001.2364.
- Caballero, I., I. Parrilla, C. Almiñana, D. del Olmo, J. Roca, E. A. Martínez, and J. M. Vázquez. 2012. 'Seminal Plasma Proteins as Modulators of the Sperm Function and Their Application in Sperm Biotechnologies'. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 47 Suppl 3 (June): 12–21. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02028.x.
- Casao, Adriana, Margarita Gallego, José Alfonso Abecia, Fernando Forcada, Rosaura Pérez-Pé, Teresa Muiño-Blanco, and José Álvaro Cebrián-Pérez. 2012. 'Identification and Immunolocalisation of Melatonin MT(1) and MT(2) Receptors in Rasa Aragonesa Ram Spermatozoa'. *Reproduction, Fertility, and Development* 24 (7): 953–61. doi:10.1071/RD11242.
- Casao, Adriana, Noelia Mendoza, Rosaura Pérez-Pé, Patricia Grasa, José-Alfonso Abecia, Fernando Forcada, José A. Cebrián-Pérez, and Teresa Muino-Blanco. 2010. 'Melatonin Prevents Capacitation and Apoptotic-like Changes of Ram Spermatozoa and Increases Fertility Rate'. *Journal of Pineal Research* 48 (1): 39–46. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00722.x.
- Casao, Adriana, Rosaura Pérez-Pé, José Alfonso Abecia, Fernando Forcada, Teresa Muiño-Blanco, and José Álvaro Cebrián-Pérez. 2013. 'The Effect of Exogenous Melatonin during the Non-Reproductive Season on the Seminal Plasma Hormonal Profile and the Antioxidant Defence System of Rasa Aragonesa Rams'. *Animal Reproduction Science* 138 (3–4): 168–74. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.02.002.
- Cebrián-Pérez, J. A., A. Casao, M. González-Arto, T. R. dos Santos Hamilton, R. Pérez-Pé, and T. Muiño-Blanco. 2014. 'Melatonin in Sperm Biology: Breaking

Paradigms'. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 49 Suppl 4 (October): 11–21. doi:10.1111/rda.12378.

- Colás, C., P. Grasa, A. Casao, M. Gallego, J. A. Abecia, F. Forcada, J. A. Cebrián-Pérez, and T. Muiño-Blanco. 2009. 'Changes in Calmodulin Immunocytochemical Localization Associated with Capacitation and Acrosomal Exocytosis of Ram Spermatozoa'. *Theriogenology* 71 (5): 789–800. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.10.003.
- Colas, Carmen, Peter James, Liz Howes, Roy Jones, José A. Cebrian-Perez, and Teresa Muiño-Blanco. 2008. 'Cyclic-AMP Initiates Protein Tyrosine Phosphorylation Independent of Cholesterol Efflux during Ram Sperm Capacitation'. *Reproduction, Fertility, and Development* 20 (6): 649–58.
- Davis, B K. 1981. 'Timing of Fertilization in Mammals: Sperm Cholesterol/Phospholipid Ratio as a Determinant of the Capacitation Interval.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (12): 7560–64.
- Gerlach, T., and J. E. Aurich. 2000. 'Regulation of Seasonal Reproductive Activity in the Stallion, Ram and Hamster'. *Animal Reproduction Science* 58 (3–4): 197–213.
- Gestel, R. A. van, J. B. Helms, J. F. H. M. Brouwers, and B. M. Gadella. 2005. 'Effects of Methyl-Beta-Cyclodextrin-Mediated Cholesterol Depletion in Porcine Sperm Compared to Somatic Cells'. *Molecular Reproduction and Development* 72 (3): 386–95. doi:10.1002/mrd.20351.
- Grasa, Patricia, José Alvaro Cebrián-Pérez, and Teresa Muiño-Blanco. 2006. 'Signal Transduction Mechanisms Involved in in Vitro Ram Sperm Capacitation'. *Reproduction (Cambridge, England)* 132 (5): 721–32. doi:10.1530/rep.1.00770.
- Grasa, Patricia, Carmen Colas, Margarita Gallego, Luís Monteagudo, Teresa Muiño-Blanco, and José Alvaro Cebrián-Pérez. 2009. 'Changes in Content and Localization of Proteins Phosphorylated at Tyrosine, Serine and Threonine Residues during Ram Sperm Capacitation and Acrosome Reaction'. *Reproduction (Cambridge, England)* 137 (4): 655–67. doi:10.1530/REP-08-0280.
- Ickowicz, Debby, Maya Finkelstein, and Haim Breitbart. 2012. 'Mechanism of Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction: Role of Protein Kinases'. *Asian Journal of Andrology* 14 (6): 816–21. doi:10.1038/aja.2012.81.
- Jha, K. N., A. M. Salicioni, E. Arcelay, O. Chertihin, S. Kumari, J. C. Herr, and P. E. Visconti. 2006. 'Evidence for the Involvement of Proline-Directed Serine/Threonine Phosphorylation in Sperm Capacitation'. *Molecular Human Reproduction* 12 (12): 781–89. doi:10.1093/molehr/gal085.
- Kalab, P., J. Peknicová, G. Geussová, and J. Moos. 1998. 'Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation in Boar Sperm through a CAMP-Dependent Pathway'.

Molecular Reproduction and Development 51 (3): 304–14.
doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199811)51:3<304::AID-MRD10>3.0.CO;2-2.

- Karagiannidis, null, null Varsakeli, null Alexopoulos, and null Amarantidis. 2000. 'Seasonal Variation in Semen Characteristics of Chios and Friesian Rams in Greece'. *Small Ruminant Research: The Journal of the International Goat Association* 37 (1–2): 125–30.
- Kothari, Shiva, Aaron Thompson, Ashok Agarwal, and Stefan S. du Plessis. 2010. 'Free Radicals: Their Beneficial and Detrimental Effects on Sperm Function'. *Indian Journal of Experimental Biology* 48 (5): 425–35.
- Leclerc, P., and G. S. Kopf. 1995. 'Mouse Sperm Adenylyl Cyclase: General Properties and Regulation by the Zona Pellucida'. *Biology of Reproduction* 52 (6): 1227–33.
- Lerner, Aaron B., James D. Case, Yoshiyata Takahashi, Teh H. Lee, and Wataru Mori. 1958. 'ISOLATION OF MELATONIN, THE PINEAL GLAND FACTOR THAT LIGHTENS MELANOCYTES1'. *Journal of the American Chemical Society* 80 (10): 2587–2587. doi:10.1021/ja01543a060.
- Leyton, L., and P. Saling. 1989. '95 Kd Sperm Proteins Bind ZP3 and Serve as Tyrosine Kinase Substrates in Response to Zona Binding'. *Cell* 57 (7): 1123–30.
- Lincoln, G. A., C. E. Lincoln, and A. S. McNeilly. 1990. 'Seasonal Cycles in the Blood Plasma Concentration of FSH, Inhibin and Testosterone, and Testicular Size in Rams of Wild, Feral and Domesticated Breeds of Sheep'. *Journal of Reproduction and Fertility* 88 (2): 623–33.
- 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.
- Luna, Carolina, Carmen Colás, Rosaura Pérez-Pé, José A. Cebrián-Pérez, and Teresa Muiño-Blanco. 2012. 'A Novel Epidermal Growth Factor-Dependent Extracellular Signal-Regulated MAP Kinase Cascade Involved in Sperm Functionality in Sheep'. *Biology of Reproduction* 87 (4): 93. doi:10.1095/biolreprod.112.100073.
- Malpoux, B., C. Viguié, D. C. Skinner, J. C. Thiéry, and P. Chemineau. 1997. 'Control of the Circannual Rhythm of Reproduction by Melatonin in the Ewe'. *Brain Research Bulletin* 44 (4): 431–38.
- Marín-Briggiler, Clara I., Kula N. Jha, Olga Chertihin, Mariano G. Buffone, John C. Herr, Mónica H. Vazquez-Levin, and Pablo E. Visconti. 2005. 'Evidence of the Presence of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase IV in Human Sperm and Its Involvement in Motility Regulation'. *Journal of Cell Science* 118 (Pt 9): 2013–22. doi:10.1242/jcs.02326.

- McPartlin, L. A., S. S. Suarez, C. A. Czaya, K. Hinrichs, and S. J. Bedford-Guaus. 2009. 'Hyperactivation of Stallion Sperm Is Required for Successful In Vitro Fertilization of Equine Oocytes'. *Biology of Reproduction* 81 (1): 199–206. doi:10.1095/biolreprod.108.074880.
- Naz, R. K. 1999. 'Involvement of Protein Serine and Threonine Phosphorylation in Human Sperm Capacitation'. *Biology of Reproduction* 60 (6): 1402–9.
- O'Flaherty, Cristian. 2015. 'Redox Regulation of Mammalian Sperm Capacitation'. *Asian Journal of Andrology* 17 (4): 583–90. doi:10.4103/1008-682X.153303.
- Palacín, Inmaculada, José-Alfonso Abecia, Fernando Forcada, Adriana Casao, José-Álvaro Cebrián, Teresa Muiño, Carlos Palacios, and Juan Miguel Pontes. 2008. 'Effects of Exogenous Melatonin Treatment on Out-of-Season Ram Fertility'. *Italian Journal of Animal Science* 7 (2): 199–206. doi:10.4081/ijas.2008.199.
- Pariset, Claude C., Claude Roussel, Serge J. Weinman, and Jacques G. Demaille. 1983. 'Calmodulin Intracellular Concentration and CAMP-Dependent Protein Kinase Activity in Human Sperm Samples in Relation to Sperm Motphlogy and Motlity'. *Gamete Research* 8 (2): 171–82. doi:10.1002/mrd.1120080206.
- Parrish, J. J., J. Susko-Parrish, M. A. Winer, and N. L. First. 1988. 'Capacitation of Bovine Sperm by Heparin'. *Biology of Reproduction* 38 (5): 1171–80.
- Pérez-Pé, Rosaura, Patricia Grasa, Marta Fernández-Juan, Maria Luisa Peleato, José Alvaro Cebrián-Pérez, and Teresa Muiño-Blanco. 2002. 'Seminal Plasma Proteins Reduce Protein Tyrosine Phosphorylation in the Plasma Membrane of Cold-Shocked Ram Spermatozoa'. *Molecular Reproduction and Development* 61 (2): 226–33. doi:10.1002/mrd.1152.
- Pozo, D., R. J. Reiter, J. R. Calvo, and J. M. Guerrero. 1997. 'Inhibition of Cerebellar Nitric Oxide Synthase and Cyclic GMP Production by Melatonin via Complex Formation with Calmodulin'. *Journal of Cellular Biochemistry* 65 (3): 430–42.
- Reiter, Russel J., Dun-Xian Tan, Sergio Rosales-Corral, and Lucien C. Manchester. 2013. 'The Universal Nature, Unequal Distribution and Antioxidant Functions of Melatonin and Its Derivatives'. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 13 (3): 373–84.
- 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'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (19): 8734–38.
- Revel, Florent G., Mireille Masson-Pévet, Paul Pévet, Jens D. Mikkelsen, and Valérie Simonneaux. 2009. 'Melatonin Controls Seasonal Breeding by a Network of

- Hypothalamic Targets'. *Neuroendocrinology* 90 (1): 1–14.
doi:10.1159/000219588.
- Salicioni, Ana M., Mark D. Platt, Eva V. Wertheimer, Enid Arcelay, Alicia Allaire, Julian Sosnik, and Pablo E. Visconti. 2007. 'Signalling Pathways Involved in Sperm Capacitation'. *Society of Reproduction and Fertility Supplement* 65: 245–59.
- Schlingmann, Karen, Marcela A. Michaut, John L. McElwee, Collin A. Wolff, Alexander J. Travis, and Regina M. Turner. 2007. 'Calmodulin and CaMKII in the Sperm Principal Piece: Evidence for a Motility-Related Calcium/Calmodulin Pathway'. *Journal of Andrology* 28 (5): 706–16. doi:10.2164/jandrol.106.001669.
- Sheikheldin, M. A., B. E. Howland, and W. M. Palmer. 1992. 'Seasonal Profiles of Melatonin in Adult Rams'. *Journal of Pineal Research* 12 (2): 58–63.
- Snell, William J., and Judith M. White. 1996. 'The Molecules of Mammalian Fertilization'. *Cell* 85 (5): 629–37. doi:10.1016/S0092-8674(00)81230-1.
- Suarez, S. S., and H.-C. Ho. 2003. 'Hyperactivated Motility in Sperm'. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 38 (2): 119–24.
- Trejo, R., and A. Mújica. 1990. 'Changes in Calmodulin Compartmentalization throughout Capacitation and Acrosome Reaction in Guinea Pig Spermatozoa'. *Molecular Reproduction and Development* 26 (4): 366–76.
doi:10.1002/mrd.1080260412.
- Turek, F. W., C. Desjardins, and M. Menaker. 1976. 'Melatonin-Induced Inhibition of Testicular Function in Adult Golden Hamsters'. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 151 (3): 502–6.
- Vadnais, Melissa L., Hannah L. Galantino-Homer, and Gary C. Althouse. 2007. 'Current Concepts of Molecular Events during Bovine and Porcine Spermatozoa Capacitation'. *Archives of Andrology* 53 (3): 109–23.
doi:10.1080/01485010701329386.
- Visconti, P. E., J. L. Bailey, G. D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke, and G. S. Kopf. 1995. 'Capacitation of Mouse Spermatozoa. I. Correlation between the Capacitation State and Protein Tyrosine Phosphorylation'. *Development (Cambridge, England)* 121 (4): 1129–37.
- Visconti, P. E., X. Ning, M. W. Fornés, J. G. Alvarez, P. Stein, S. A. Connors, and G. S. Kopf. 1999. 'Cholesterol Efflux-Mediated Signal Transduction in Mammalian Sperm: Cholesterol Release Signals an Increase in Protein Tyrosine Phosphorylation during Mouse Sperm Capacitation'. *Developmental Biology* 214 (2): 429–43. doi:10.1006/dbio.1999.9428.

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'. *Journal of Reproductive Immunology* 53 (1–2): 133–50.

Visconti, Pablo E. 2009. 'Understanding the Molecular Basis of Sperm Capacitation through Kinase Design'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (3): 667–68. doi:10.1073/pnas.0811895106.

Wennemuth, Gunther, Anne E. Carlson, Andrew J. Harper, and Donner F. Babcock. 2003. 'Bicarbonate Actions on Flagellar and Ca²⁺-Channel Responses: Initial Events in Sperm Activation'. *Development (Cambridge, England)* 130 (7): 1317–26.

Yanagimachi, R. 1994. 'Fertility of Mammalian Spermatozoa: Its Development and Relativity'. *Zygote (Cambridge, England)* 2 (4): 371–72.

Zeng, Y., J. A. Oberdorf, and H. M. Florman. 1996. 'PH Regulation in Mouse Sperm: Identification of Na(+)-, Cl(-)-, and HCO₃(-)-Dependent and Arylamino benzoate-Dependent Regulatory Mechanisms and Characterization of Their Roles in Sperm Capacitation'. *Developmental Biology* 173 (2): 510–20.

Zidovetzki, Raphael, and Irena Levitan. 2007. 'Use of Cyclodextrins to Manipulate Plasma Membrane Cholesterol Content: Evidence, Misconceptions and Control Strategies'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1768 (6): 1311–24. doi:10.1016/j.bbamem.2007.03.026.

RCSB PDB (Protein Data Bank)

Alvarez, J. G., J. L. Lasso, L. Blasco, R. C. Nuñez, 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'. *Human Reproduction (Oxford, England)* 8 (7): 1087–92.

Caswell, A. H., and J. D. Hutchison. 1971. 'Visualization of Membrane Bound Cations by a Fluorescent Technique'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 42 (1): 43–49.

Colas, Carmen, Peter James, Liz Howes, Roy Jones, José A. Cebrian-Perez, and Teresa Muiño-Blanco. 2008. 'Cyclic-AMP Initiates Protein Tyrosine Phosphorylation Independent of Cholesterol Efflux during Ram Sperm Capacitation'. *Reproduction, Fertility, and Development* 20 (6): 649–58.

Ericsson, R. J. 1967. 'A Fluorometric Method for Measurement of Sperm Capacitation'. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 125 (4): 1115–18.

- Fraser, L. R., L. R. Abeydeera, and K. Niwa. 1995. 'Ca(2+)-Regulating Mechanisms That Modulate Bull Sperm Capacitation and Acrosomal Exocytosis as Determined by Chlortetracycline Analysis'. *Molecular Reproduction and Development* 40 (2): 233–41. doi:10.1002/mrd.1080400213.
- García-López, N., M. Ollero, J. A. Cebrián-Pérez, and T. Muiño-Blanco. 1996. 'Reversion of Thermic-Shock Effect on Ram Spermatozoa by Adsorption of Seminal Plasma Proteins Revealed by Partition in Aqueous Two-Phase Systems'. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Applications* 680 (1–2): 137–43.
- Grasa, P., R. Pérez-Pé, O. Báguena, F. Forcada, A. Abecia, J. A. Cebrián-Pérez, and T. Muiño-Blanco. 2004. 'Ram Sperm Selection by a Dextran/Swim-up Procedure Increases Fertilization Rates Following Intrauterine Insemination in Superovulated Ewes'. *Journal of Andrology* 25 (6): 982–90.
- Mortimer, D. 1994. 'Sperm Recovery Techniques to Maximize Fertilizing Capacity'. *Reproduction, Fertility, and Development* 6 (1): 25–31.
- Navarrete, Felipe A., Francisco A. García-Vázquez, Antonio Alvau, Jessica Escoffier, Dario Krapf, Claudia Sánchez-Cárdenas, Ana M. Salicioni, Alberto Darszon, and Pablo E. Visconti. 2015. 'Biphasic Role of Calcium in Mouse Sperm Capacitation Signaling Pathways'. *Journal of Cellular Physiology* 230 (8): 1758–69. doi:10.1002/jcp.24873.
- Ollero, M., T. M. Blanco, M. J. López-Pérez, and J. A. Cebrian Pérez. 1996. 'Surface Changes Associated with Ram Sperm Cryopreservation Revealed by Counter-Current Distribution in an Aqueous Two-Phase System. Effect of Different Cryoprotectants'. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Applications* 680 (1–2): 157–64.
- Ollero, M., T. Muiño-Blanco, M. J. López-Pérez, and J. A. Cebrián-Pérez. 1996. 'Viability of Ram Spermatozoa in Relation to the Abstinence Period and Successive Ejaculations'. *International Journal of Andrology* 19 (5): 287–92.
- Ollero, M., M. L. Pascual, T. Muiño-Blanco, J. A. Cebrián-Pérez, and M. J. López-Pérez. 1994. 'Revealing Surface Changes Associated with Maturation of Ram Spermatozoa by Centrifugal Counter-Current Distribution in an Aqueous Two-Phase System'. *Journal of Chromatography. A* 668 (1): 173–78.
- Ronquist, G. 1987. 'Effect of Modulators on Prostate Membrane-Bound ATPase in Human Seminal Plasma'. *European Journal of Clinical Investigation* 17 (3): 231–36.
- Ward, C. R., and B. T. Storey. 1984. 'Determination of the Time Course of Capacitation in Mouse Spermatozoa Using a Chlortetracycline Fluorescence Assay'. *Developmental Biology* 104 (2): 287–96.

- Yeste, M., J. M. Fernández-Novell, L. Ramió-Lluch, E. Estrada, L. G. Rocha, J. A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, I. I. Concha, A. Ramírez, and J. E. Rodríguez-Gil. 2015. 'Intracellular Calcium Movements of Boar Spermatozoa during "in Vitro" Capacitation and Subsequent Acrosome Exocytosis Follow a Multiple-Storage Place, Extracellular Calcium-Dependent Model'. *Andrology* 3 (4): 729–47. doi:10.1111/andr.12054.
- Zeng, Hai-Tao, and Daulat R. P. Tulsiani. 2003. 'Calmodulin Antagonists Differentially Affect Capacitation-Associated Protein Tyrosine Phosphorylation of Mouse Sperm Components'. *Journal of Cell Science* 116 (Pt 10): 1981–89. doi:10.1242/jcs.00396.
- Ashrafi, Iraj, Hamid Kohram, and Farhad Farrokhi Ardabili. 2013. 'Antioxidative Effects of Melatonin on Kinetics, Microscopic and Oxidative Parameters of Cryopreserved Bull Spermatozoa'. *Animal Reproduction Science* 139 (1–4): 25–30. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.03.016.
- Bendahmane, M., C. Lynch, and D. R. Tulsiani. 2001. 'Calmodulin Signals Capacitation and Triggers the Agonist-Induced Acrosome Reaction in Mouse Spermatozoa'. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 390 (1): 1–8. doi:10.1006/abbi.2001.2364.
- Casao, A., S. Vega, I. Palacín, R. Pérez-Pe, A. Laviña, F. J. Quintín, E. Sevilla, et al. 2010. 'Effects of Melatonin Implants during Non-Breeding Season on Sperm Motility and Reproductive Parameters in Rasa Aragonesa Rams'. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 45 (3): 425–32. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01215.x.
- Gonzalez-Arto, Marta, Caorlina Luna, Rosaura Pérez-Pé, Teresa Muiño-Blanco, José A. Cebrián-Pérez, and Adriana Casao. 2016. 'New Evidence of Melatonin Receptor Contribution to Ram Sperm Functionality'. *Reproduction, Fertility, and Development* 28 (7): 924–35. doi:10.1071/RD14302.
- Karagiannidis, null, null Varsakeli, null Alexopoulos, and null Amarantidis. 2000. 'Seasonal Variation in Semen Characteristics of Chios and Friesian Rams in Greece'. *Small Ruminant Research: The Journal of the International Goat Association* 37 (1–2): 125–30.
- Konakchieva, Rossitza, and Plamen Todorov. 2011. 'Melatonin Protects Human Spermatozoa from Apoptosis via Melatonin Receptor- and Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mediated Pathways'. *Fertility and Sterility* 96 (4): e159. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.08.013.
- Soto-Vega, Elena, Isaura Meza, Gerardo Ramírez-Rodríguez, and Gloria Benitez-King. 2004. 'Melatonin Stimulates Calmodulin Phosphorylation by Protein Kinase C'. *Journal of Pineal Research* 37 (2): 98–106. doi:10.1111/j.1600-079X.2004.00141.x.

Tulsiani, Daulat R. P., Hai-Tao Zeng, and Aida Abou-Haila. 2007. 'Biology of Sperm Capacitation: Evidence for Multiple Signalling Pathways'. *Society of Reproduction and Fertility Supplement* 63: 257–72.