



**Universidad**  
Zaragoza



Facultad de Ciencias  
**Universidad Zaragoza**

## Trabajo Fin de Máster

Estudio de las rutas moleculares implicadas en la acción de la melatonina sobre la calcio-calmodulina kinasa II de los espermatozoides

Study of molecular pathways involved in the action of melatonin on calcium-calmodulin kinase II of sperm

Autora:

Victoria Peña Delgado

Directoras:

Adriana Casao Gascón  
Rosaura Pérez Pe

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.  
Grupo de investigación: Biología, Fisiología y Tecnologías de la Reproducción (BIOFITER).

2019



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

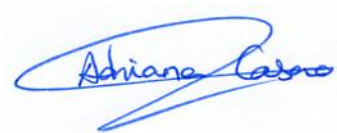
**INFORMAN:**

Que la alumna Victoria Peña Delgado, ha realizado bajo nuestra dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin de Master titulado "ESTUDIO DE LAS RUTAS MOLECULARES IMPLICADAS EN LA ACCIÓN DE LA MELATONINA SOBRE LA CALCIO CALMODULINA KINASA II DE 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 12 de septiembre de 2019.



**Rosaura Pérez Pe**



**Adriana Casao Gascón**



## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
ABSTRACT.....	2
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
2.1 MELATONINA: LA HORMONA DE LA OSCURIDAD .....	3
2.1.1 Biosíntesis de la melatonina.....	3
2.1.2 Mecanismo de acción de la melatonina.....	4
2.2 PAPEL DE LA MELATONINA EN LA REPRODUCCIÓN.....	6
2.2.1 Influencia de la melatonina en la estacionalidad reproductiva .....	6
2.2.2 Efecto de la melatonina sobre los espermatozoides ovinos y la capacitación espermática .....	7
2.3 LA ENZIMA CALCIO-CALMODULINA PROTEÍN-KINASA II Y SU RELACIÓN CON LA MELATONINA ..	8
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
4.1 PROCESADO DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS .....	12
4.1.1 Obtención de muestras seminales .....	12
4.1.2 Selección espermática por el método de <i>swim-up</i> /dextrano .....	12
4.1.3 Capacitación <i>in vitro</i> .....	13
4.2 EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS .....	15
4.2.1 Análisis de la motilidad espermática.....	15
4.2.2 Estudio de la viabilidad celular (integridad de la membrana plasmática) .....	15
4.2.3 Evaluación del estado de capacitación.....	16
4.2.3.1 Estudio de la distribución del calcio mediante tinción con clorotetraciclina (CTC).....	16
4.2.3.2 Estudio de la fosforilación de tirosinas mediante western-blot.....	17
4.2.3.2.a Extracción de proteínas espermáticas .....	17
4.2.3.2.b SDS-PAGE e Inmunoblotting.....	18
4.3 INMUNOENSAYO DE TIPO ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CAMKII Y CAMKII $\alpha$ .....	18
4.4 DETECCIÓN DE LA ENZIMA CALCIO-CALMODULINA KINASA II EN SUS FORMAS FOSFORILADA Y OXIDADA MEDIANTE WESTERN-BLOT .....	19
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	20

<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>21</b>
5.1 EFECTO DE LA MELATONINA Y DE UN AGONISTA Y UN ANTAGONISTA DE RECEPTORES DE LA MISMA SOBRE LOS ESPERMATOZOIDES OVINOS INCUBADOS EN CONDICIONES CAPACITANTES ..	21
5.2 IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES DE MELATONINA EN EL EFECTO DESCAPACITANTE DE LA MISMA EN ESPERMATOZOIDES OVINOS INCUBADOS EN CONDICIONES CAPACITANTES .....	23
5.2.1 Efecto sobre la distribución de calcio .....	23
5.2.2 Efecto sobre la fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas de membrana espermáticas.....	25
5.3 IMPLICACIÓN DE LA CaMKII EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA MELATONINA.....	27
5.3.1 Efecto de la melatonina, y de agonistas y antagonistas de receptores de melatonina sobre los niveles de CaMKII y CaMKII $\alpha$ en el espermatozoide ovino evaluado por inmunoensayo .....	27
5.3.2 Identificación de modificaciones post-traduccionales de la calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII) en el espermatozoide ovino .....	28
5.3.2.1 Identificación de la enzima CaMKII en su forma oxidada.....	28
5.3.2.2 Identificación de la enzima CaMKII en su forma fosforilada y de cambios en los niveles de la misma .....	32
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>35</b>
CONCLUSIONS.....	35
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>37</b>

## **1. RESUMEN**

La melatonina es una hormona sintetizada principalmente en la glándula pineal que está implicada en la regulación de muchos procesos biológicos, entre los que se encuentra la reproducción estacional en algunos mamíferos. A nivel celular, la melatonina puede llevar a cabo sus efectos regulatorios a través de dos vías: bien por la unión a receptores específicos de membrana, denominados MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>, o bien atravesando directamente la membrana plasmática.

En el espermatozoide ovino se ha descrito que la melatonina modula la capacitación espermática (conjunto de cambios bioquímicos y biofísicos que necesita sufrir un espermatozoide para adquirir capacidad fecundante), de forma que añadida a concentraciones altas (1 μM) tiene un efecto descapacitante. Dado que la enzima calcio-calmodulina proteín-kinasa II (CaMKII) también está implicada en la capacitación espermática, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto de la melatonina, y de un agonista y un antagonista de los receptores de la misma, sobre la capacitación espermática y sobre los niveles y la activación por modificaciones postraduccionales de la CaMKII en espermatozoides ovinos.

Para ello, espermatozoides ovinos seleccionados por *swim-up* se incubaron durante 3 horas en condiciones capacitantes (39 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 100 % humedad) en medio TALP (control), en un medio con agentes elevadores del AMPc (*cocktail*), en medio *cocktail* con melatonina a una concentración 1 μM, y con un agonista (8M-PDOT) o un antagonista (4P-PDOT) de los receptores de melatonina añadidos a diferentes concentraciones (1 μM y 10 nM). Tras la incubación se evaluó la motilidad, viabilidad y estado de capacitación mediante tinción con clorotetraciclina y fosforilación en residuos de tirosina evaluados por western-blot. El análisis de los cambios en los niveles de CaMKII y su isoforma CaMKIIα se realizaron mediante un inmunoensayo ELISA y la identificación y cuantificación de las modificaciones post-traduccionales en CaMKII se realizó mediante western-blot.

Los resultados obtenidos mostraron que la incubación con melatonina o su agonista a una concentración 1 μM aumentó el porcentaje de espermatozoides no capacitados (P<0,05), mientras que la incubación con el antagonista a ambas concentraciones aumentó el porcentaje de espermatozoides capacitados (P<0,05). Estos resultados sugieren que la melatonina ejercería su efecto descapacitante sobre los espermatozoides ovinos a través de su unión a sus receptores. No obstante, la incubación con melatonina, o con agonistas o antagonistas de sus receptores no tuvo efecto sobre los niveles de CaMKII ni de CaMKIIα. En este trabajo se identificó, por primera vez, la forma fosforilada de la CaMKII en el espermatozoide ovino, una de las formas activas de la enzima, pero no se evidenció de forma concluyente la presencia de la forma oxidada, otra de las posibles vías de activación de la misma. Sin embargo, la melatonina tampoco parece ejercer efecto sobre los niveles de la CaMKII fosforilada.

En conclusión, este trabajo sugiere que la melatonina ejercería su acción descapacitante a través de la unión a sus receptores de membrana, pero no modificaría los niveles o la activación de la enzima CaMKII por medio de modificaciones post-traduccionales, al menos mediante fosforilación.

## **ABSTRACT**

Melatonin is a hormone synthesized principally by the pineal gland which is involved in the regulation of many biological processes, such as seasonal reproduction in some mammals. At the cellular level, melatonin can exert its regulatory effects through two pathways: by binding to specific membrane receptors called MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub>, or by crossing plasma membrane directly.

It has been described that in ram sperm melatonin modulates sperm capacitation (set of biochemical and biophysical changes that sperm require to gain fertilizing capacity) so that when it is added at high concentrations (1 μM), it has a decapacitating effect. Since the enzyme calcium-calmodulin protein-kinase II (CaMKII) is also involved in sperm capacitation, the main aim of this work was to evaluate the effect of melatonin, and the effect of melatonin receptor agonist and antagonist over sperm capacitation and the levels and activation by post-translational modifications of CaMKII in ovine sperm.

For this purpose, ram spermatozoa selected by swim-up were incubated for 3 hours under capacitating conditions (39 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> and 100 % humidity) in TALP medium (control), in a medium containing cAMP-elevating agents (*cocktail*), in *cocktail* medium with melatonin at a concentration of 1 μM, and with an melatonin receptor agonist (8M-PDOT) or an antagonist (4P-PDOT) added at different concentrations (1 μM and 10 nM). After incubation, motility and viability were evaluated, and capacitation state was assessed by chlortetracycline staining and by western-blot of phosphorylated tyrosine residues. The analysis of changes in CaMKII and CaMKIIα isoform levels were carried out by an ELISA immunoassay and the identification and quantification of post-translational modifications in CaMKII were evaluated by western-blot.

The obtained results showed that incubation with melatonin or its agonist at a concentration of 1 μM increased the percentage of non-capacitated sperm (P<0,05) while incubation with the antagonist at both concentrations increased the percentage of capacitated sperm (P<0,05). These results suggest that melatonin would exert its decapacitating effect on ram sperm by binding to its receptors. However, the incubation with melatonin, or with melatonin receptor agonists or antagonists had no effect on the levels of CaMKII or CaMKIIα. In this work, the phosphorylated form of CaMKII in sheep sperm was identified for the first time. This is one of the active forms of the enzyme, but the presence of the oxidized form, another of the possible types of activation, was not conclusively evidenced. Nevertheless, it does not seem that melatonin has an effect on the levels of phosphorylated CaMKII either.

In conclusion, this work suggests that melatonin would exert its decapacitating action by binding to its membrane receptors, but it would not modify the levels or the activation of the CaMKII enzyme by post-translational modifications, at least by phosphorylation.

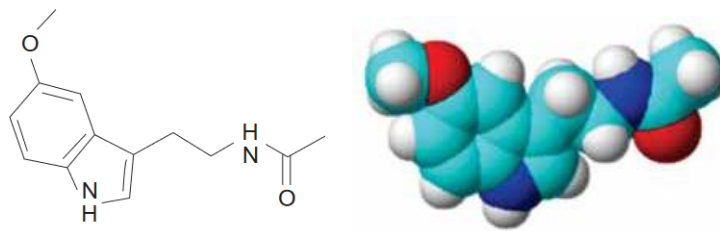


## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. MELATONINA: LA HORMONA DE LA OSCURIDAD

#### 2.1.1. Biosíntesis de la melatonina

La melatonina (figura 1) es un derivado del indol que en vertebrados se produce principalmente en la glándula pineal a partir del aminoácido triptófano, en una cascada de reacciones de cuatro pasos (Boutin *et al.*, 2005). Se trata de una molécula poco soluble en agua, pero soluble en solventes orgánicos como el etanol o el dimetilsulfóxido, por lo que es capaz de atravesar las membranas celulares por difusión pasiva (Yu *et al.*, 2016).



**Figura 1:** Estructura química y modelo espacial de la melatonina (Imagen de Martínez *et al.*, 2012)

A la melatonina se la conoce como la hormona de la oscuridad (Martínez *et al.*, 2012) debido a que su producción en la glándula pineal se relaciona con el ritmo circadiano, ya que su síntesis se ve estimulada por la oscuridad e inhibida por la luz. Fueron Ebling y Hastings (1992) los primeros en identificar las bases de este mecanismo de liberación: cuando la luz incide sobre la retina, ésta envía la información a la glándula pineal, a través del núcleo supraquiasmático del hipotálamo y una vez llega, se suprime la liberación de melatonina. De esta forma, la melatonina sólo se secreta en periodos de oscuridad, lo que regula los ritmos circadianos, y además, esta secreción es proporcional a la duración de la noche, regulando los ritmos circanuales. Así, la secreción de melatonina nocturna varía a lo largo del año en función de la duración de las noches, siendo más elevada durante los días cortos de otoño e invierno, y menor en los días largos de primavera y verano. Una vez sintetizada, la melatonina se libera rápidamente al sistema vascular, pues dada su naturaleza lipofílica escapa fácilmente de los pinealocitos encargados de su producción (Reiter, 1991), y de este modo accede a todos los tejidos, fluidos y compartimentos celulares para ejercer sus funciones.

No obstante, además de su producción nocturna en la glándula pineal, la melatonina también puede producirse durante el día en otros tejidos extrapineales, como el ojo (Smith and Baker, 1974), la piel (Slominski *et al.*, 2008), el tracto gastrointestinal (Huether, 1993), el tracto reproductor femenino (Brzezinski *et al.*, 1987), y, tal y como demostró hace unos años nuestro grupo de investigación, en el tracto reproductor masculino (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016). Resulta curioso que, en muchos de estos tejidos, apenas se producen variaciones en la síntesis de melatonina extrapineal entre el día y la noche, lo cual sugiere que han de existir otros mecanismos de regulación de la síntesis de esta hormona, además del eje retino-hipotálamico ya comentado.

### 2.1.2. Mecanismo de acción de la melatonina

La melatonina está implicada en la regulación de muchos procesos fisiológicos y presenta un mecanismo de acción muy complejo. Así, participa en la regulación de los ritmos circadianos y circanuales, como se ha comentado, y también en la reproducción en mamíferos de reproducción estacional, como se comentará en el apartado siguiente. Esta molécula también destaca por su papel antioxidante, ya que evita el daño oxidativo en macromoléculas, células y tejidos (Tan *et al.*, 2010), se le ha asignado un importante papel como molécula quimioatrayente en células del epitelio pigmentario retinal (Shirakawa and Ogino, 1987) y en leucocitos (Peña *et al.*, 2007), y también actúa como moduladora del citoesqueleto (Benítez-King, 2006).

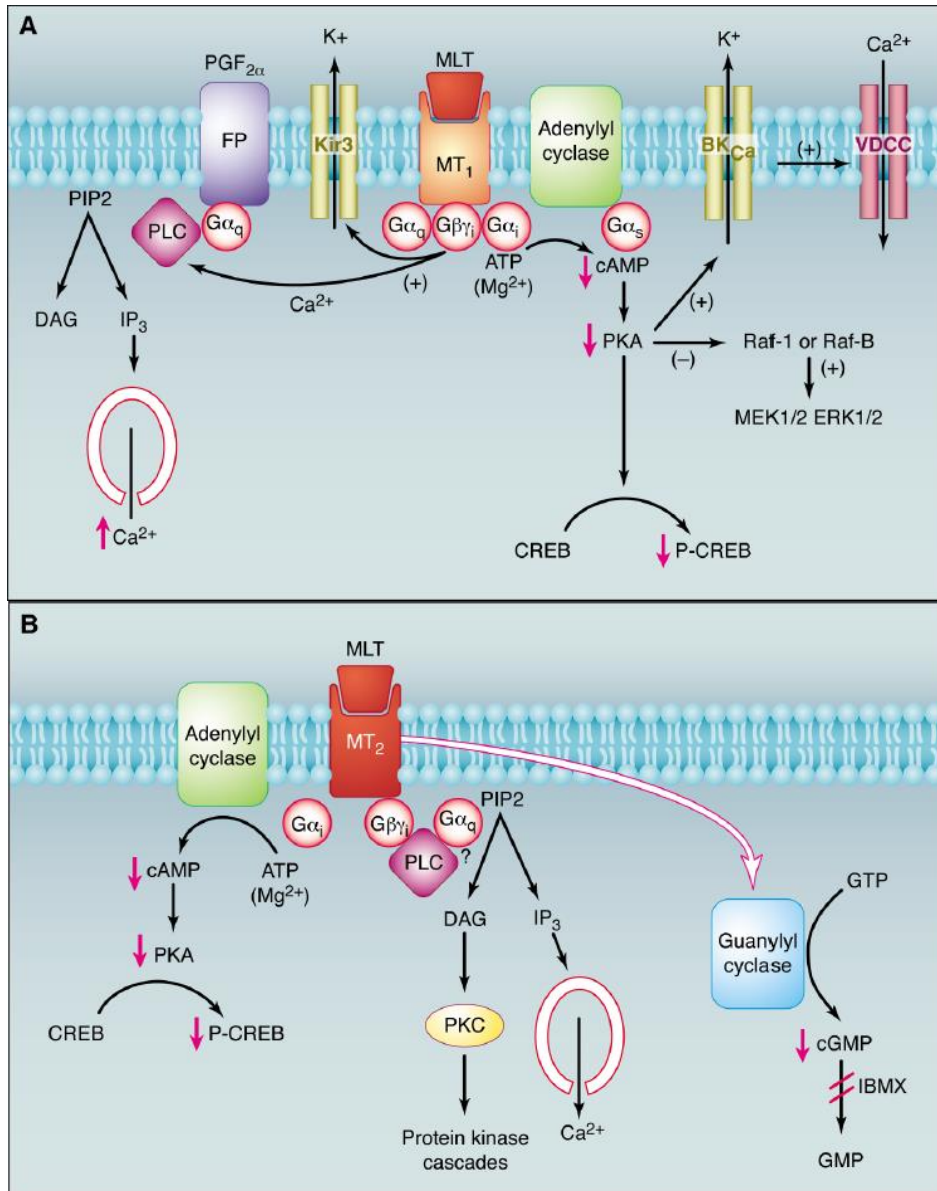
La melatonina puede ejercer muchas de estas funciones, exceptuando su actividad antioxidante, a través de su interacción con receptores específicos de membrana que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, del inglés *G-protein coupled receptors*, Reppert, 1997). Actualmente se han descrito dos receptores de melatonina en mamíferos, que reciben el nombre de MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> y que están relacionados con la regulación de AMP cíclico (AMPc) en células somáticas (Yung *et al.*, 1995). También se ha identificado un tercer receptor de baja afinidad por la melatonina, el receptor MT<sub>3</sub>, que está presente en aves, anfibios, peces (Ebisawa *et al.*, 1994) y en algunos mamíferos, pues se ha descrito también en hámster (Nosjean *et al.*, 2000).

En células somáticas, la unión de melatonina a estos receptores provoca una cascada de señalización mediada por segundos mensajeros que puede variar en función del tejido y la especie estudiados (Luchetti *et al.*, 2010). Algunas de esas vías son (figura 2):

- La vía de la adenilato ciclasa (AC): La unión de melatonina a sus receptores inhibe la actividad de la AC, lo que provoca una disminución de los niveles de AMPc, y la consecuente reducción de la actividad de la enzima proteína kinasa dependiente de AMPc o PKA (Hazlerigg *et al.*, 1991).
- La ruta de la fosfolipasa C (PLC), que al activarse, convierte el fosfatidilinositol (PIP<sub>2</sub>) en diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5,-trifosfato (IP<sub>3</sub>). Por un lado, el IP<sub>3</sub> generado podría unirse a receptores específicos localizados en depósitos intracelulares de calcio, y ello provocaría la salida de este ión hacia el citoplasma, y por otro lado, el aumento de DAG provocaría la activación de la proteína kinasa C (PKC), que a su vez activaría a otras kinasas, como la calcio-calmodulina kinasa II (CaMKII) de la que se hablará posteriormente.

En ambos receptores, la unión de melatonina desencadena algunas de estas vías de transducción de señal, mediadas en su mayoría por diversas proteínas G. En el caso del receptor MT<sub>1</sub> (figura 2.A), la disminución de la producción de AMPc y la actividad de la PKA hace que disminuya la fosforilación de la proteína CREB (del inglés, *cAMP response element-binding*) y que por el contrario, aumente la fosforilación de las kinasas MEK1, MEK 2, ERK1 y ERK 2. Además, la activación del receptor MT<sub>1</sub> puede modular los niveles de calcio y potasio intracelulares activando o bloqueando canales iónicos, y también puede activar a la PLC (Masana and Dubocovich, 2001), con el aumento de los niveles de DAG y PIP<sub>2</sub> que ello conlleva.

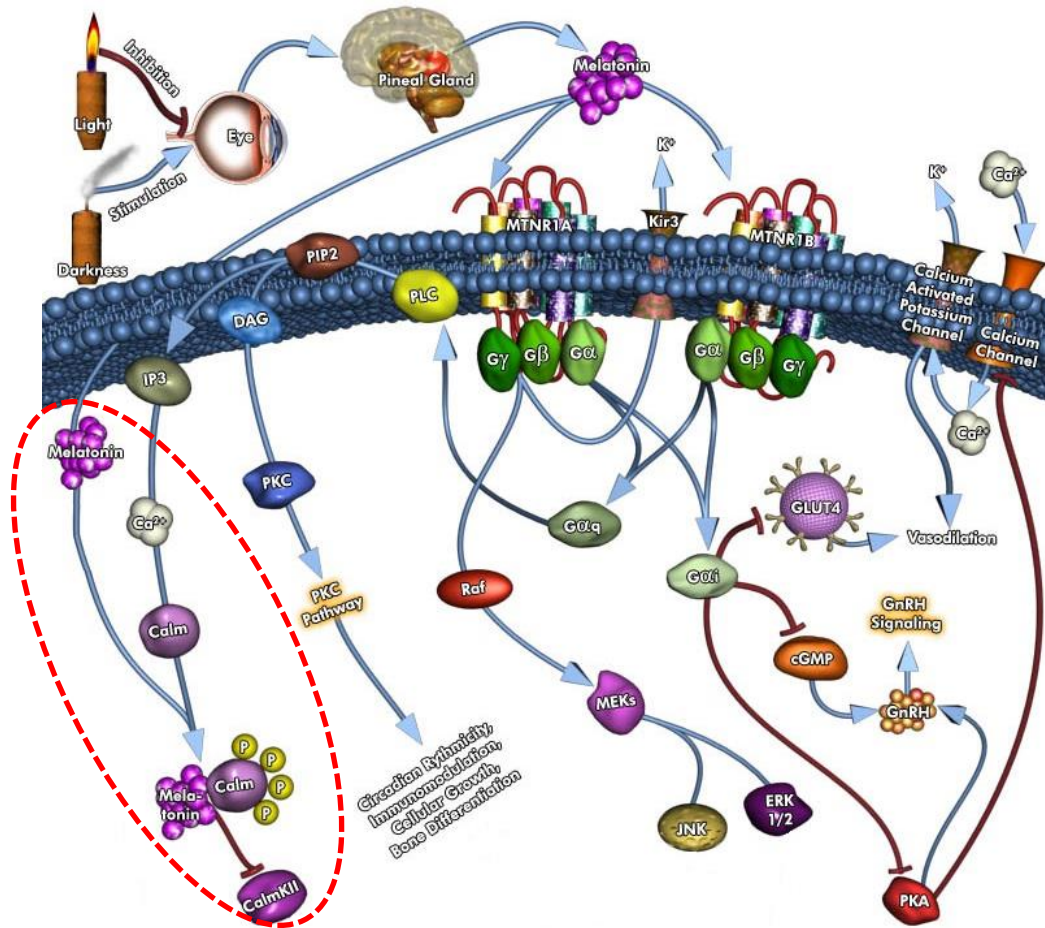
Por su parte, la unión de melatonina al receptor  $MT_2$  (figura 2.B) provoca una cascada de transducción similar a la del receptor  $MT_1$ , si bien existen algunas diferencias entre ambas, pues la activación del receptor  $MT_2$  puede impedir la formación de GMPc y no solo de AMPc, como ocurre con el receptor  $MT_1$  (Masana and Dubocovich, 2001).



**Figura 2:** Representación de las principales vías de transducción de señal reguladas por el receptor  $MT_1$  (panel A) y por el receptor  $MT_2$  (panel B). Imagen tomada de Masana and Dubocovich, 2001.

Por otro lado, dada su naturaleza anfipática, la melatonina también puede atravesar la membrana plasmática (figura 3), y una vez en el interior de la célula, puede unirse a proteínas de unión a calcio, como la calreticulina (Macías *et al.*, 2003) y la calmodulina (Benítez-King *et al.*, 1993). Su unión a calreticulina se ha asociado a efectos sobre el núcleo celular (Macías *et al.*, 2003), mientras que su unión a calmodulina se relaciona con la regulación del citoesqueleto (Benítez-King *et al.*, 1993). La unión de la melatonina a la

calmodulina puede impedir la unión de la calmodulina al calcio y evitar así la formación del complejo calcio-calmodulina, necesario para activar algunas enzimas, como la calcio-calmodulina proteína kinasa II o CaMKII (Benítez-King *et al.*, 1996), de la que se hablará más adelante.



**Figura 3:** Ruta de señalización de la hormona melatonina, donde puede verse la interacción con CaMKII (CaMKII en la imagen) remarcada en color rojo. Imagen tomada y modificada de: “QIAGEN - GeneGlobe Pathways - Melatonin Signaling,” n.d.

## 2.2. PAPEL DE LA MELATONINA EN LA REPRODUCCIÓN

### 2.2.1. Influencia de la melatonina en la estacionalidad reproductiva

En lo que concierne a la participación de la melatonina en los procesos reproductivos, esta regula la estacionalidad reproductiva mediante el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (McGuire *et al.*, 2011). En el caso de la especie ovina, que presenta una reproducción estacional muy marcada en latitudes elevadas, con un período reproductivo en otoño e invierno y otro no reproductivo en primavera y verano, la melatonina actúa, en concreto, como estimuladora de la reproducción. La secreción de melatonina nocturna

regula la liberación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el hipotálamo, lo que a su vez regula la liberación de hormona luteinizante (LH), responsable de la actividad ovárica en la hembra y de la producción de espermatozoides en el macho (Malpoux *et al.*, 1999; Misztal *et al.*, 2002).

Así, en la especie ovina, al ser una especie estacional de días cortos, el aumento de las horas nocturnas en otoño e invierno se traduce por tanto en un aumento de la secreción de melatonina y en un efecto estimulador de la reproducción, aunque esta también puede verse afectada por factores ambientales, la nutrición, o incluso las relaciones sociales entre individuos (Rosa and Bryant, 2003). En el morueco, pese a que la producción de semen es continua a lo largo de todo el año, la calidad espermática sí que resulta ser menor en la época no reproductiva (Rosa and Bryant, 2003), y además, también se ha descrito una disminución de la libido y una reducción del volumen y del peso testicular de estos machos durante este periodo (Avdi *et al.*, 2004).

### **2.2.2. Efecto de la melatonina sobre los espermatozoides ovinos y la capacitación espermática**

Además de actuar sobre el eje hipotálamo-hipofisario-testicular, en los machos de algunas especies de mamíferos, como el morueco, se ha descrito la presencia de melatonina en el plasma seminal, donde ejerce un efecto directo sobre los espermatozoides (Casao *et al.*, 2010a). Además, esta hormona también se ha encontrado en el tracto reproductor femenino (Brzezinski *et al.*, 1987), donde posiblemente regularía la funcionalidad espermática durante el tránsito de los espermatozoides por el mismo. Durante este tránsito, el espermatozoide sufre un conjunto de cambios bioquímicos y biofísicos que le confieren capacidad fecundante, conocido como capacitación. Entre los cambios que ocurren durante la capacitación destacan:

- Cambios en la fluidez de la membrana plasmática debido a la eliminación de colesterol, que es captado por proteínas presentes en el tracto reproductor femenino, como la albúmina, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y las beta-ciclodextrinas (Iborra *et al.*, 2000; Vadnais *et al.*, 2007).
- La fosforilación de proteínas principalmente en residuos de tirosina (Visconti *et al.*, 1995), pero también de serina y treonina (Grasa *et al.*, 2009).
- La hiperactivación flagelar, que es un cambio en el patrón de motilidad de los espermatozoides que les permite maximizar las probabilidades de encontrar al ovocito y atravesar las envueltas que lo rodean, a fin de fecundarlo (Yanagimachi, 1994a).
- Otros cambios, como el aumento de los niveles de calcio (Baldi *et al.*, 1991), AMPc (Galantino-Homer *et al.*, 1997) y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Kothari *et al.*, 2010) que les prepararán para sufrir la reacción acrosómica, una excitosis controlada que le permite atravesar la zona pelúcida que rodea al ovocito.

A este respecto, se ha descrito que la incubación con melatonina puede ejercer efectos directos sobre los espermatozoides, mejorando la motilidad en muestras seminales humanas (Ortiz *et al.*, 2011) y promoviendo la capacitación en búfalo (Di Francesco *et al.*, 2010) y la hiperactivación en hámster (Fujinoki, 2008). En la especie ovina, nuestro grupo de investigación ha demostrado que esta hormona provoca la disminución de marcadores apoptóticos, el aumento de la tasa de fertilidad, y además, es capaz de regular el proceso de

capacitación, teniendo un efecto capacitante o descapacitante en función de su concentración (Casao *et al.*, 2010b).

En cuanto al mecanismo por el cual la melatonina ejerce estos efectos sobre los espermatozoides, nuestro grupo de investigación ha demostrado la presencia de los receptores de melatonina MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> en la membrana de los espermatozoides ovinos (Casao *et al.*, 2012), así como un posible papel del receptor MT<sub>2</sub> en la regulación de la capacitación espermática (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016). Como ya se ha comentado, la unión de la melatonina a estos receptores en células somáticas provoca una serie de cascadas de transducción de señal mediadas por segundos mensajeros, y algunas de esas vías son las mismas que participan en los procesos que sufren los espermatozoides en el tracto reproductor femenino, como la capacitación, la hiperactivación y la reacción acrosómica (Grasa *et al.*, 2006). En células somáticas, la melatonina es capaz de aumentar los niveles de calcio citosólico como consecuencia de la unión del IP<sub>3</sub> a receptores específicos localizados en depósitos intracelulares de calcio. En espermatozoides, el aumento del calcio intracelular es un fenómeno crucial para algunos procesos ya comentados, como la capacitación y la reacción acrosómica (Wassarman, 1999), y también para la actividad del flagelo (Bedu-Addo *et al.*, 2008). En los espermatozoides, el ión calcio puede proceder del exterior (por la apertura de canales de calcio presentes en la membrana plasmática) o bien de reservorios intracelulares como la envoltura nuclear redundante (ENR), una estructura compuesta por cisternas membranosas y localizada en la base del flagelo que presenta, precisamente, receptores para IP<sub>3</sub> (Ho and Suarez, 2003). Esta estructura, además, presenta receptores para calreticulina (Ho and Suarez, 2003), una de las proteínas con capacidad de unión con la melatonina.

Además, hay que recordar también que la melatonina, atravesando la membrana plasmática puede no solo unirse a la calreticulina, sino que sería capaz de unirse también a la calmodulina citoplásmica. Esta proteína, tras su unión al calcio, puede regular la actividad de la enzima calcio-calmodulina proteín-quinasa II (CaMKII), una enzima implicada en la capacitación (Schlingmann *et al.*, 2007) y en la hiperactivación espermática (Ignatz and Suarez, 2005).

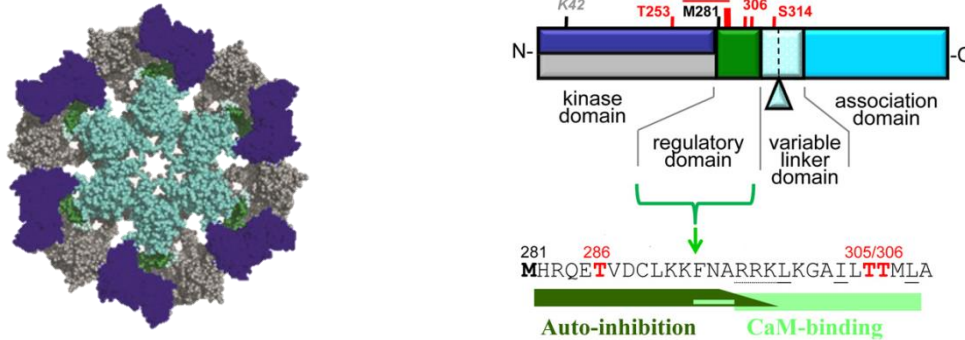
### **2.3. LA ENZIMA CALCIO-CALMODULINA PROTEÍN-KINASA II Y SU RELACIÓN CON LA MELATONINA**

La denominada calcio-calmodulina proteín-quinasa II (CaMKII o CAMK2) es una serín/treonina kinasa que participa en importantes procesos neuronales relacionados con la memoria y el aprendizaje, y en otros como la regulación de la expresión de enzimas oxidativas, de la biogénesis mitocondrial y de la expresión de algunas proteínas miofibrilares (Chin, 2004).

Esta kinasa es en realidad una familia de isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) derivadas de cuatro genes altamente relacionados: CAMK2A, CAMK2B, CAMK2D y CAMK2G (Hudmon and Schulman, 2002a). Cada RNA mensajero producido a partir de estos cuatro genes puede sufrir procesos de *splicing* alternativo, lo que hace que existan muchas isozimas para cada gen, aunque por lo general, la mayoría de holoenzimas CaMKII son multímeros formados

por la asociación de unas 12 subunidades (Ma *et al.*, 2015) teniendo cada una de ellas la siguiente estructura (figura 4):

- Un dominio catalítico
- Un dominio regulador, que presenta el sitio de unión para la calmodulina y una región de autoinhibición.
- Un segmento de asociación para la formación de multímeros
- Un segmento que une el dominio regulador con el de asociación.



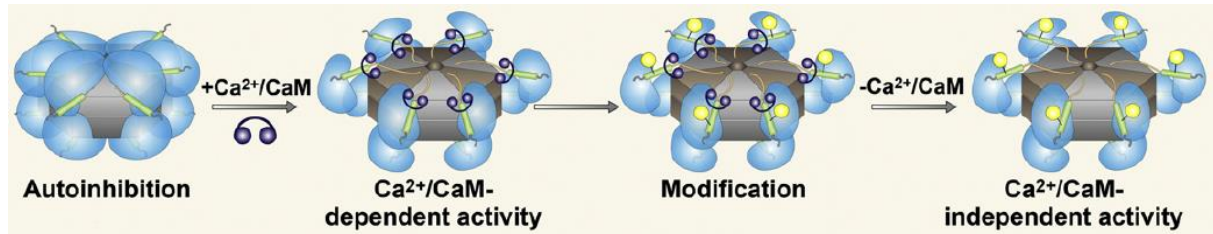
**Figura 4:** Modelo de un multímero de 12 subunidades de CaMKII, y estructura primaria de CaMKII donde pueden observarse sus tres segmentos. En el dominio regulador, se destacan la secuencia de la región de unión al complejo calcio-calmodulina y la secuencia de la región de inhibición. Imágenes tomadas y modificadas de Coultrap and Bayer, 2012.

Algunas de estas isoformas se han encontrado en el testículo de ratón (Hudmon and Schulman, 2002b) y de toro (Ignatz and Suarez, 2005), y para la especie ovina se han identificado los cuatro genes de CaMKII, aunque las secuencias de aminoácidos de las diferentes isoformas de CaMKII que se pueden obtener a partir de estos genes están solo predichas, y muchas de ellas sin revisar.

En cuanto a su función en las células espermáticas, esta kinasa juega un papel relevante en la motilidad (Schlingmann *et al.*, 2007), hiperactivación (Ignatz and Suarez, 2005) y en la fosforilación de proteínas (González-Fernández *et al.*, 2013), procesos claves para la capacitación espermática. En espermatozoides de ratón se ha comprobado que la proteína CaMKII $\beta$  es diana del complejo calcio-calmodulina y que co-localiza con él en la pieza principal del flagelo del espermatozoide (Schlingmann *et al.*, 2007). En bovino también se ha visto que previene la reacción acrosómica mediante la polimerización de la actina (Rotfeld *et al.*, 2014), y en espermatozoides humanos se ha demostrado que la CaMKII que participa en la regulación de la reacción acrosómica es, en concreto, la isoforma  $\alpha$  (CaMKII $\alpha$ ) (Zhang *et al.*, 2016).

Para poder llevar a cabo estas funciones, la CaMKII debe activarse mediante procesos de fosforilación y/o oxidación en algunos de sus residuos (Hudmon and Schulman, 2002b; Luczak and Anderson, 2014). En un principio, este proceso requiere de la unión al complejo calcio-calmodulina, pero se ha demostrado que, cuando se cumplen determinadas circunstancias, la enzima puede liberarse de este complejo y se mantiene activa sin

necesidad de estar unida al complejo calcio-calmodulina, tal y como puede apreciarse en la figura 5. Por ejemplo, se ha visto que con un aumento del nivel de calcio intracelular, CaMKII puede autofosforilarse en su residuo Thr287, y de esta manera mantiene su actividad (Lai et al., 1987) una vez queda libre, y también ha observado que pueden oxidarse los residuos Met281 y Met282, y que estas modificaciones parecen evitar que la CaMKII se desactive una vez se ha liberado del complejo calcio-calmodulina (Erickson *et al.*, 2011a).



**Figura 5:** Mecanismo de regulación de la actividad de CaMKII. Los monómeros de CaMKII se unen entre sí para formar la holoenzima a través del dominio de asociación (en gris). Por su parte, el dominio regulador (en verde) presenta sitios de unión para el complejo calcio-calmodulina y regiones en las que se pueden sufrir modificaciones post-traduccionales (representadas por círculos amarillos). Imagen tomada de Luczak and Anderson, 2014.

Además, se ha demostrado que en el espermatozoide bovino la activación de esta kinasa depende a su vez de otras, como la PKA, que recordemos que podría ver su actividad disminuida como consecuencia de la unión de melatonina a sus receptores, y también las SFK (familia de las Src kinasas) (Rotfeld *et al.*, 2014). En estos procesos, la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) parece ser determinante, ya que se ha sugerido que niveles altos de ROS podrían activar la adenilato ciclasa para aumentar los niveles de AMPc y con ello aumentar la actividad de la PKA y de la CaMKII, además de que niveles altos de ROS permitirían también la oxidación de CaMKII (Shabtay and Breitbart, 2016).

En lo referente a la relación de melatonina con CaMKII, parece que la acción inhibitoria o activadora de la hormona sobre esta proteína depende del tipo celular y de la especie que se esté estudiando. Por ejemplo, en células somáticas se ha visto que la melatonina es capaz de inhibir *in vitro* la actividad de CaMKII y también su autofosforilación, al unirse con gran afinidad a la calmodulina, lo que impide la unión de esta al calcio y la consiguiente formación del complejo calcio-calmodulina, necesario para activar la CaMKII (Benítez-King *et al.*, 1996). Sin embargo, esta acción solo se ha observado en tratamientos conjuntos con melatonina y otras sustancias que aumentan los niveles de AMPc, como la foskolina o la IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) (Bazwinsky-Wutschke *et al.*, 2014). *In vivo*, esta inhibición se ha visto en células de cáncer colorrectal humano (Wei *et al.*, 2015) y en células del músculo liso de rata (Han *et al.*, 2012).

Hasta la fecha se desconoce si la de melatonina, atravesando la membrana plasmática, podría unirse a la calmodulina y así inhibir la activación de la CaMKII en espermatozoides por un mecanismo competitivo, o si por el contrario mediante su unión a receptores y a través de la ruta de la PLC aumentaría los niveles de calcio para regular la actividad de esta enzima. Por todo esto, el mecanismo de acción de la melatonina sobre la CaMKII en espermatozoides resulta bastante complejo, y hasta el momento, desconocido.



### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La melatonina es una hormona sintetizada principalmente en la glándula pineal que está implicada en la regulación de muchos procesos fisiológicos, como la reproducción estacional en algunos mamíferos. Esta regulación la puede llevar a cabo a través del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (McGuire *et al.*, 2011), pero también puede hacerlo actuando directamente sobre los gametos (Casao *et al.*, 2010a).

En la especie ovina se ha demostrado que esta hormona puede regular la capacitación espermática, es decir, el conjunto de cambios que debe sufrir un espermatozoide para adquirir capacidad fecundante (Yanagimachi, 1994b), con un efecto descapacitante cuando se añade a una concentración 1  $\mu\text{M}$  (Casao *et al.*, 2010b). Este efecto podría llevarlo a cabo mediante su unión a receptores específicos, denominados  $\text{MT}_1$  y  $\text{MT}_2$  en la membrana del espermatozoide (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016), pero también podría hacerlo atravesando directamente la membrana plasmática y uniéndose a proteínas de unión a calcio como la calmodulina (Benítez-King *et al.*, 1993). La unión de la melatonina a la calmodulina puede afectar a la formación del complejo calcio-calmodulina, y ello puede impedir la activación (por fosforilación u oxidación) de enzimas como la calcio-calmodulina proteína quinasa II o CaMKII (Benítez-King *et al.*, 1996), una enzima implicada, precisamente, en la capacitación espermática (Schlingmann *et al.*, 2007). Pero por otro lado, a través de su unión a receptores, la melatonina podría activar la ruta de la fosfolipasa C (PLC) (Masana and Dubocovich, 2001), en la que se produciría un aumento del diacilglicerol (DAG) que podría activar a la proteína quinasa C, y ésta podría fosforilar a otras kinasas, como la CaMKII.

Por tanto, en base a los antecedentes presentados, en el presente Trabajo Fin de Máster se planteó la siguiente **hipótesis**: la melatonina podría ejercer su efecto regulador de la capacitación actuando sobre la enzima calcio-calmodulina proteína quinasa II, bien tras su unión a receptores o bien atravesando directamente la membrana plasmática.

De este modo, el **objetivo principal** de este trabajo consistió en evaluar el efecto de la melatonina, y de un agonista y un antagonista de los receptores de la misma, sobre la capacitación espermática y sobre los niveles y la activación por modificaciones postraduccionales de la CaMKII en espermatozoides ovinos incubados en condiciones capacitantes y alto AMPc. Y, para ello, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

- 1) Evaluar el efecto de un agonista y un antagonista de los receptores de melatonina, añadidos a diferentes concentraciones (1  $\mu\text{M}$  y 10 nM) sobre espermatozoides ovinos sometidos a capacitación *in vitro*, a fin de determinar si el efecto de la melatonina sobre la capacitación está mediado por su unión a receptores.
- 2) Analizar los cambios en los niveles de CaMKII y de su isoforma CaMKII $\alpha$  debido a la adición de melatonina y sus agonistas y antagonistas a diferentes concentraciones durante la capacitación *in vitro* de espermatozoides ovinos.
- 3) Identificar si la enzima CaMKII sufre procesos de oxidación y/o fosforilación durante la capacitación espermática y si estos dependen o no de la acción de la melatonina, y de la unión o no a sus receptores.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. PROCESADO DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS**

#### **4.1.1. Obtención de muestras seminales**

Para realizar los experimentos se utilizaron muestras seminales obtenidas a partir de nueve moruecos adultos pertenecientes a la Asociación Nacional de Ganaderos de la raza *Rasa Aragonesa* (ANGRA), estabulados en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Zaragoza. Tanto el mantenimiento de los sementales como la obtención de muestras corrieron a cargo del personal del SEA. Se obtuvieron dos eyaculados consecutivos por morueco mediante vagina artificial, y se utilizaron sólo los segundos en base a resultados previos que demostraron que tenían mejores parámetros de calidad que los primeros (Ollero *et al.*, 1996). Además, se trabajó con la mezcla de estos segundos eyaculados para evitar diferencias individuales. Tras la recogida, las muestras se mantuvieron a 37 °C durante el transporte al laboratorio y hasta su uso.

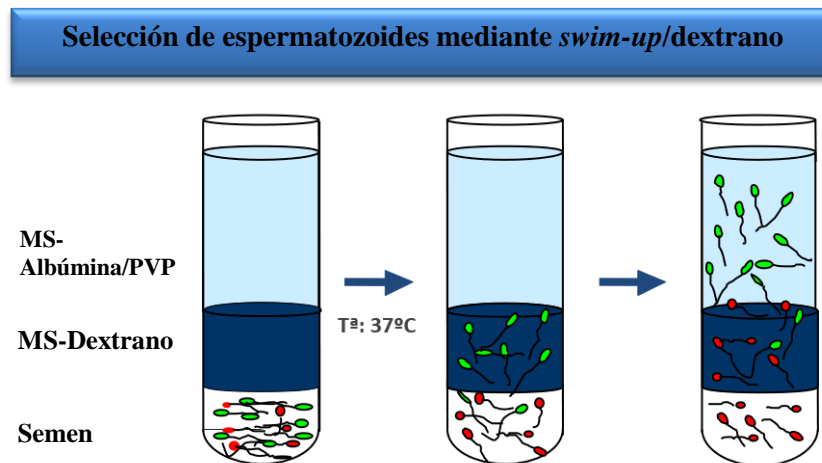
#### **4.1.2. Selección espermática por el método de *swim-up* / dextrano**

Se utilizó el método de *swim-up* / dextrano con el fin de eliminar el plasma seminal y/o restos celulares de las muestras seminales obtenidas. La eliminación del plasma seminal resulta conveniente debido al efecto perjudicial que éste ejerce en las muestras espermáticas (Mortimer, 1994), así como para evitar la influencia de sus componentes, incluida la melatonina presente en el eyaculado (Casao *et al.*, 2010a), en los resultados obtenidos.

El método de *swim-up* / dextrano, puesto a punto en nuestro laboratorio por García-López y cols. (1996), está basado en el descrito por Álvarez y cols. para espermatozoides humanos (Álvarez *et al.*, 1993), pero con el medio y algunos de los pasos del proceso modificados para su aplicación en el lavado de los espermatozoides de morueco. El método original de Álvarez incluía un paso de centrifugación, pero, dado que la centrifugación resulta perjudicial para los espermatozoides ovinos, este paso se ha eliminado del proceso. Cabe destacar que esta técnica no es un simple método de lavado de espermatozoides, sino que, además de la eliminación del plasma seminal, permite obtener una población celular enriquecida en espermatozoides altamente mótils y viables. La composición del medio utilizado para el *swim-up* (MS) fue la siguiente: NaCl 50 mM, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,4 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 mM, HEPES 21 mM, glucosa 2,8 Mm, piruvato sódico 0,33 mM, lactato sódico 18,6 mM y sacarosa 200 mM y el pH se ajustó a 6,5. Este medio no contenía ni CaCl<sub>2</sub> ni NaHCO<sub>3</sub> para evitar fenómenos de capacitación prematura de los espermatozoides (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, y sobre el semen se depositaron 500 µl de MS-Dextrano (30 mg dextrano/ml MS). Esta capa, con alta concentración de dextrano, funciona como una barrera física al impedir el paso de espermatozoides de baja motilidad, y además retiene a aquellos que presenten alteraciones en su membrana. Seguidamente, se añadieron muy lentamente 1,5 ml de MS-Albúmina (5 mg de albúmina sérica bovina/ml MS), sobre la capa de dextrano, para evitar la aglutinación espermática, tal y como se aprecia en la figura 6. No obstante, cuando se vió que la albúmina interfería en la identificación de

CAMKII oxidada, se decidió sustituir los 1,5 ml de MS-Albúmina por 1,5 ml de MS-PVP (1 mg de polivinilpirrolidona/ml MS). En cualquier caso, se dejó incubar a 37 °C en posición vertical durante 15 minutos, y pasado ese tiempo se retiraron 750 µl de la fase superior (a esta fracción se la designó como primer sobrenadante y fue desechada, al contener restos de plasma seminal) y posteriormente se añadieron 750 µl de MS-Albúmina o de MS-PVP. Pasados otros 15 minutos, se retiraron otros 750 µl de la fase superior, se recogieron en otro tubo, y se volvieron a añadir 750 µl de MS-Albúmina o de MS-PVP. El proceso se repitió otras dos veces consecutivas para obtener finalmente un total de tres sobrenadantes, que fueron mezclados en un mismo tubo para proceder a trabajar con ellos.



**Figura 6:** Esquema del proceso de selección espermática mediante el método *swim-up* /dextrano

#### 4.1.3. Capacitación *in vitro*

Los espermatozoides se capacitan *in vivo* a lo largo de su tránsito por el tracto reproductor femenino. Para inducir la capacitación *in vitro*, es necesario incubar a los espermatozoides en presencia de una serie de compuestos que inducen este proceso y en una estufa que simule las condiciones de ese ambiente. El medio usado fue un medio definido que imita la composición del fluido oviductal, denominado medio TALP completo (Parrish *et al.*, 1988), compuesto por NaCl 100 mM, KCl 3,1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,4 mM, HEPES 10 mM, glucosa 5 mM, piruvato sódico 1 mM y lactato sódico 21,6 mM, polivinilpirrolidona (PVP) 1 mg/ml y con el pH ajustado a 7,2. Así, los espermatozoides previamente seleccionados mediante el método de *swim-up*/dextrano se diluyeron a una concentración de  $1,6 \times 10^8$  células/ml en este medio y se incubaron en una estufa a 39 °C, con un 5 % de CO<sub>2</sub> y un 100 % de humedad, durante tres horas.

Como los espermatozoides ovinos son difíciles de capacitar *in vitro*, fue necesario añadir al medio TALP una mezcla de sustancias que denominamos *cocktail*, que son capaces de incrementar el AMPc, y asegurar la capacitación *in vitro* de los espermatozoides ovinos (Colas *et al.* 2008). Este *cocktail* estaba compuesto por dibutilil-cAMP (db-cAMP, un análogo del AMPc; 1 mM), cafeína y teofilina (ambos inhibidores de fosfodiesterasas; a una concentración final de 1 mM, cada uno), ácido okadaico (OA, un inhibidor de fosfatasa de amplio espectro; añadido a una concentración de 0,2 µM) y metil-β-ciclodextrinas (M-β-CD, un aceptor de colesterol; 2,5 mM). Además, a todas las alícuotas se les añadió D-

penicilamina (PEN) a una concentración final de 1 mM, dado que se ha descrito recientemente que este producto de la degradación de la penicilina evita la aglutinación espermática cuando se añade a un medio capacitante (Leahy *et al.*, 2016).

Para valorar el efecto de la melatonina, ésta se añadió al inicio de la capacitación a una concentración final de 1  $\mu$ M. Debido a la baja solubilidad de esta hormona en medios acuosos, se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) y PBS (NaCl 3,13 g/l, KCl 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/l, pH 7,4). Para tener en cuenta un posible efecto del DMSO, este se añadió a la misma concentración (0,1‰) a la muestra control sin melatonina.

Además, para analizar si los posibles efectos de la melatonina estaban mediados por su unión a sus receptores de membrana MT<sub>1</sub> y/o MT<sub>2</sub>, se añadieron también agonistas y antagonistas de los mismos. Se utilizó 8-metoxi-2-propionamidotetralin (8M-PDOT), que es un agonista fuerte del receptor MT<sub>2</sub> y un agonista débil del receptor MT<sub>1</sub> (Dubocovich *et al.*, 1997), a dos concentraciones finales distintas, 1  $\mu$ M y 10 nM, nada más empezar la capacitación *in vitro*. En el caso de los antagonistas, se añadió 4-fenil-2-propionamidotetralin (4P-PDOT), que es un antagonista competitivo de MT<sub>2</sub>, pero a concentraciones superiores a 300 nM también inhibe MT<sub>1</sub> (Dubocovich and Markowska, 2005), por lo que también se añadió a dos concentraciones distintas, 1  $\mu$ M y 10 nM, a tiempo cero. En las muestras con antagonistas, tras 30 minutos de incubación se añadió también melatonina a una concentración final de 1  $\mu$ M.

De esta forma, las muestras utilizadas en los ensayos se denominaron:

- **Swim-up:** muestra libre de plasma seminal, sin incubar en condiciones capacitantes.
- **Control:** muestra incubada en condiciones capacitantes en medio TALP.
- **Cocktail:** muestra incubada en condiciones capacitantes en medio TALP y con la mezcla de sustancias denominada *cocktail*, con capacidad demostrada para inducir la capacitación *in vitro*.
- **Mel 1  $\mu$ M:** muestra incubada en condiciones capacitantes en medio TALP junto con la mezcla de sustancias *cocktail* y melatonina a una concentración de 1  $\mu$ M.
- **8M-PDOT 1  $\mu$ M:** muestra incubada en condiciones capacitantes en medio TALP junto con la mezcla *cocktail* y el agonista 8M-PDOT a una concentración de 1  $\mu$ M.
- **8M-PDOT 10 nM:** muestra incubada en condiciones capacitantes en medio TALP junto con la mezcla *cocktail* y el agonista 8M-PDOT a una concentración de 10 nM.
- **4P-PDOT 1  $\mu$ M:** muestra incubada en condiciones capacitantes en medio TALP junto con la mezcla *cocktail* y el antagonista 4P-PDOT a una concentración de 1  $\mu$ M. A los 30 minutos de incubación se añadió también melatonina a una concentración de 1  $\mu$ M.
- **4P-PDOT 10 nM:** muestra incubada en condiciones capacitantes en medio TALP junto con la mezcla *cocktail* y el antagonista 4P-PDOT a una concentración de 10 nM. A los 30 minutos de incubación se añadió melatonina a una concentración de 1  $\mu$ M.

## **4.2. EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS**

### **4.2.1. Análisis de la motilidad espermática**

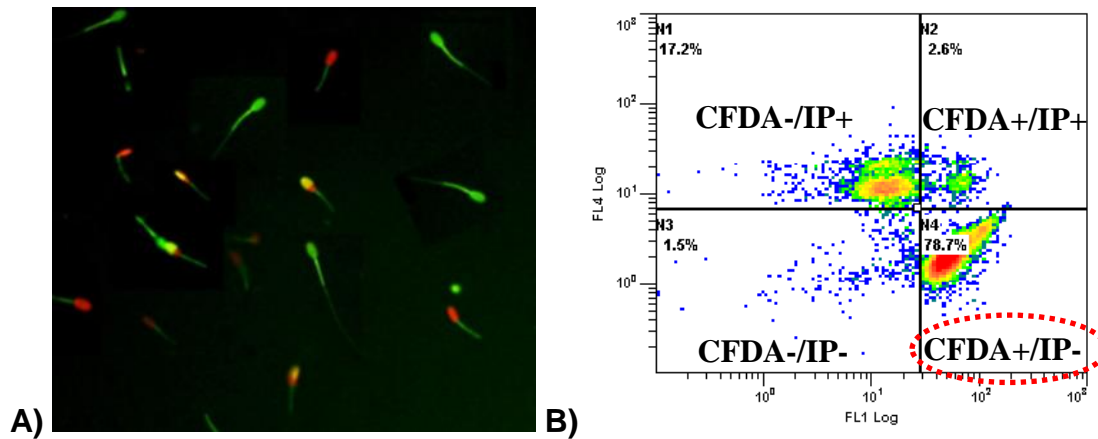
La determinación de la motilidad espermática se realizó mediante un sistema automatizado de análisis espermático asistido por ordenador (CASA, del inglés *Computer Assisted Semen Analysis*), que utiliza un software libre de código abierto desarrollado recientemente por nuestro grupo de investigación denominado OpenCASA (Alquézar-Baeta *et al.*, 2019).

Para ello se hizo una dilución (1:10 para las muestras seleccionadas con el método del *swim-up* y 1:5 para las muestras capacitadas) con medio bifase (sacarosa 0,25 M, EGTA 100 mM, fosfato sódico 0,5 mM, glucosa 50 mM, HEPES 100 mM y KOH 20 mM), se colocó una gota de 8  $\mu$ l en un portaobjetos, se cubrió con un portaobjetos y se evaluó en un microscopio de contraste de fases con objetivo 10x conectado a un ordenador y a una cámara de video capaz de grabar a 60 fotogramas por segundo durante un segundo. OpenCASA es capaz de integrar las imágenes captadas mostrando la trayectoria de los espermatozoides y clasificándolos en función de su movimiento (estáticos y móviles) y velocidad (lentos, medios y rápidos). Así, entre otros datos, proporciona valores de motilidad total (MT, porcentaje de espermatozoides móviles) y de motilidad progresiva (MP, porcentaje de espermatozoides que se mueven siguiendo una trayectoria recta).

### **4.2.2. Estudio de la viabilidad celular (integridad de la membrana plasmática)**

La viabilidad, entendida como la integridad de la membrana espermática, se valoró mediante el método descrito por Harrison y Vickers (1990), conocido como método del yoduro 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 fluorescentes en función de la integridad de su membrana plasmática. Con este método se consideran viables los espermatozoides teñidos de color verde, pues ello implica la presencia de esterasas capaces de hidrolizar el diacetato de carboxifluoresceína (incolore) a carboxifluoresceína (fluorescencia verde) y que su membrana está íntegra al presentar impermeabilidad al yoduro de propidio. Por otro lado, los espermatozoides con fluorescencia roja se consideran no viables, ya que tienen la membrana plasmática dañada y por tanto permeable al yoduro de propidio, el cual penetra en el interior de la célula y se une al ADN, proporcionando fluorescencia roja (Figura 7.A).

Para la evaluación, las muestras se diluyeron en el medio bifase, anteriormente descrito, a una concentración final de  $5 \times 10^6$  células/ml y se añadieron 3  $\mu$ l de diacetato de carboxifluoresceína (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos, 10  $\mu$ M en DMSO), 3  $\mu$ l de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, 7,3  $\mu$ M en agua destilada), y 5  $\mu$ l de formaldehído (1,7 mM en agua destilada) para la fijación de las células. Seguidamente las muestras se incubaron a 37 °C en oscuridad durante 15 minutos, y luego se evaluaron mediante un citómetro de flujo FC 500 (Beckam Coulter, Fullerton, California, Estados Unidos), que usa un láser de argón a 488 nm. La fluorescencia se detectó mediante los filtros FL1-525  $\pm$  5 nm (para CFDA) y FL4-675  $\pm$  5 nm (para PI), y se analizaron un total de 20.000 eventos, con una media de 500-1.000 eventos/segundo. Se diferenciaron cuatro subpoblaciones de espermatozoides y se consideraron los CFDA+/ PI- como viables, tal y como se muestra en la figura 7.B.



**Figura 7. A)** Imagen representativa de la doble tinción de los espermatozoides ovinos con yoduro de propido y diacetato de carboxifluoresceína, evaluada mediante microscopía de fluorescencia con filtro B-2A (filtro de excitación 450-490 nm) y aumento 400x **B)** Diagrama representativo de la integridad de membrana evaluada por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

#### 4.2.3. Evaluación del estado de capacitación

Un espermatozoide adquiere la capacidad fecundante durante su tránsito por el tracto reproductor femenino en un proceso conocido como capacitación espermática, que implica una serie secuencial de profundos cambios bioquímicos y biofísicos (Yanagimachi, 1994b). Algunos de los cambios que se producen, y que es preciso evaluar para determinar el estado de capacitación de la muestra, son un aumento de los niveles de calcio intracelular (Baldi *et al.*, 1991; White and Aitken, 1989) que puede deberse tanto a la entrada de calcio procedente del exterior como a la salida del mismo de reservorios intracelulares, así como el aumento de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina (Visconti *et al.*, 1995), serina y treonina (Grasa *et al.*, 2009).

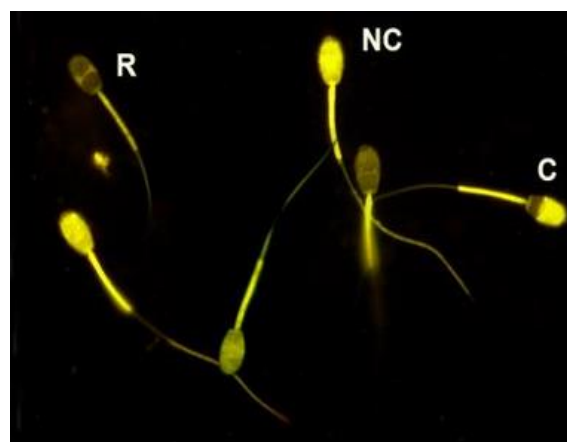
##### 4.2.3.1. Estudio de la distribución del calcio mediante tinción con clorotetraciclina (CTC)

La determinación la distribución del calcio se realizó mediante tinción con el antibiótico clorotetraciclina (CTC). Este antibiótico, al penetrar en la célula espermática se une al calcio libre y da lugar a patrones característicos de tinción en función de la distribución intracelular de este catión, que se relacionan con diferentes estados fisiológicos del espermatozoide: no capacitados, capacitados y aquellos que han sufrido la reacción acrosómica (Gillan *et al.*, 1997). En este estudio se utilizó una versión validada para semen ovino por nuestro grupo de investigación (Grasa *et al.*, 2006), basada en el ensayo descrito por Ward y Storey (1984).

La solución de CTC se preparó el mismo día del experimento a una concentración de 750  $\mu\text{M}$  en una solución tampón que contenía Tris 20 mM, NaCl 130 mM y cisteína 5  $\mu\text{M}$ , esterilizada mediante un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Milipore Ibérica, Madrid, Spain) y con un pH de 7,8. Para realizar la tinción se mezclaron 18  $\mu\text{l}$  de cada muestra espermática (a una concentración de  $1,6 \times 10^8$  células/ml) y 20  $\mu\text{l}$  de la solución de CTC y las células se fijaron con 5  $\mu\text{l}$  de una solución de paraformaldehído al 1,25 % (p/v) en Tris-HCl 0,5 M a pH 7,4. Tras una incubación de 30 minutos a 4 °C en oscuridad, se depositó una gota de 6  $\mu\text{l}$  de

cada mezcla en un portaobjetos y se le añadieron, para conservar la fluorescencia, 4  $\mu$ l de trietilendiamina (DABCO, Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos). Por último, se colocó el cubreobjetos y se selló la preparación con esmalte transparente, siempre realizando todos estos pasos del proceso protegiendo las muestras y los reactivos de la luz.

Las muestras se evaluaron mediante un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E-400) equipado con un filtro V-2A (420-490 nm de excitación y 510 nm de emisión) y objetivo de inmersión 100x. Se evaluaron 200 espermatozoides por muestra y se distinguieron tres tipos espermáticos distintos según el patrón de tinción (figura 8): no capacitados (NC, distribución uniforme de la fluorescencia en toda la cabeza), capacitados (C, con fluorescencia únicamente en el acrosoma) y células con el acrosoma reaccionado (R, sin fluorescencia en la cabeza, o únicamente con una banda de fluorescencia en la zona ecuatorial).



**Figura 8:** Espermatozoides ovinos teñidos con CTC y visualizados con microscopía de fluorescencia con filtro V-2A y 1000x. Se pueden observar espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y reaccionados (R).

#### **4.2.3.2. Estudio de la fosforilación de tirosinas mediante western-blot**

##### **4.2.3.2.a Extracción de proteínas espermáticas**

La extracción de proteínas espermáticas se realizó siguiendo el método descrito por Colás y col. (2008). A 200  $\mu$ l de cada muestra conteniendo una concentración de  $1,6 \times 10^8$  células/ml se les añadieron 100  $\mu$ l de medio de extracción (ESB, Extraction Sample Buffer), compuesto por un 2% de SDS (dodecil sulfato sódico, p/v), Tris-HCl 0,0626 mM a pH 6,8 e inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos), a una concentración de final de 1% (v/v).

La mezcla se incubó durante 5 minutos a 100 °C en un baño de arena y después se centrifugó a 15000 x g durante otros 5 minutos. Se recogió el sobrenadante al que se añadieron 2-mercaptoetanol y glicerol, a una concentración final del 5% y el 1% (v/v) respectivamente, y 0,002% (p/v) de azul de bromofenol diluido en glicerol al 10%. Las proteínas extraídas se almacenaron en congelador a -20 °C hasta su posterior análisis.

#### **4.2.3.2.b SDS-PAGE e Inmunoblotting**

Las proteínas se separaron en una dimensión siguiendo el método descrito por Laemmli (1970). Así, 10 µl de las proteínas extraídas se cargaron en geles de acrilamida al 10 %, junto con un patrón de comparación de pesos moleculares de 10 a 250 kDa (Bio-Rad, Hercules, California, Estados Unidos). Las condiciones de electroforesis fueron 130 V durante 90 minutos, a 4 °C. Las proteínas, una vez separadas, fueron transferidas a una membrana de PVDF utilizando una unidad de transferencia semi-seca, mediante el sistema Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, Hercules, California, Estados Unidos).

Realizada la transferencia de las proteínas, los sitios de unión no específicos de la membrana se bloquearon mediante incubación de la misma en PBS (NaCl 3,13 g/l, KCl 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/l, pH 7,4) con 5% de BSA (p/v) durante cuatro horas a temperatura ambiente.

Para la detección de residuos de tirosina fosforilados, se utilizó el anticuerpo primario monoclonal generado en ratón anti-fosfotirosinas (clone 4G10® Millipore #05-321), diluido 1:1000 en PBS-Tween-20 (0,1 % p/v) con un 1% de BSA (p/v). Se añadió también un anticuerpo anti-actina como control de carga, producido en conejo (SC-398103, Santa Cruz Biotechnology, California, Estados Unidos) diluido 1:500 (v/v) en PBS-Tween-20 (0,1 % p/v) con un 1% de BSA (p/v). Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, tras realizar tres lavados de 10 minutos de duración con PBS-Tween-20, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios (IRDye® 800CW Donkey anti-Mouse e IRDye® 680RD Donkey anti-Rabbit, (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, Estados Unidos)) diluidos 1:30.000 y 1:15.000 (v/v) respectivamente, durante una hora a temperatura ambiente en semi-oscuridad.

Finalmente, las membranas se escanearon utilizando el sistema de adquisición de imágenes para western-blot basado en fluorescencia Odyssey Clx Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, Estados Unidos) y se cuantificó la señal para determinar la intensidad de las bandas de fosfotirosinas de las proteínas en relación al control de carga. Además, las membranas se tiñeron con colorante azul Coomassie durante 10 minutos y se destiñeron con metanol al 30% y ácido acético al 10% (v/v) durante 4 horas para verificar que la transferencia se había producido correctamente.

### **4.3. INMUNOENSAYO DE TIPO ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CaMKII Y CaMKIIα**

Para evaluar la concentración de CaMKII y CaMKIIα en las muestras espermáticas se utilizaron dos kits ELISA de tipo sándwich comerciales (MBS033451 y MBS054563 respectivamente, MyBioSource, San Diego, California, Estados Unidos).

Previamente, se obtuvieron lisados celulares de muestras de espermatozoides incubados en condiciones capacitantes: para ello 500 µl de células se centrifugaron a 600 g durante 6 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 500 µl de un buffer de lisis comercial (X050, Arbor Assays, Michigan, Estados Unidos) al que de forma



previa se habían añadido inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) en una proporción 1:1000 (v/v) y 1:100 (v/v), respectivamente, y también fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), otro inhibidor de proteasas, a una concentración final 1 mM. Tras 30 minutos de incubación en hielo, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C. Por último, se recogió el sobrenadante y se guardó en forma de alícuotas que se almacenaron en un congelador a -80 °C hasta su análisis posterior.

Para la realización del inmunoensayo, se añadieron 50 µl de las muestras de lisados celulares y 50 µl de cada estándar (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub> y S<sub>6</sub>, suministrados en el kit ELISA) a los pocillos correspondientes de una placa de 96 pocillos, dejando dos pocillos vacíos, que funcionaron como blanco. Seguidamente, se añadieron 100 µl del reactivo HRP-Conjugate a todos los pocillos (excepto a los que funcionaban como blanco), se cubrió la placa con una membrana y se dejó incubar durante una hora a 37 °C. Pasado ese tiempo, se realizaron cuatro lavados con una solución de lavado proporcionada por el propio kit. Tras los lavados, se añadieron 50 µl de la denominada solución cromógena A y otros 50 µl de la solución cromógena B, también a todos los pocillos. Se dejó incubar la placa protegida de la luz durante 15 minutos a 37 °C y pasado ese tiempo se añadieron 50 µl de la solución STOP a cada pocillo. Por último, se midió la densidad óptica a 450 nm utilizando un lector de placas de ELISA (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania).

#### **4.4. DETECCIÓN DE LA ENZIMA CALCIO-CALMODULINA KINASA II EN SUS FORMAS FOSFORILADA Y OXIDADA MEDIANTE WESTERN-BLOT**

La extracción de proteínas espermáticas se realizó siguiendo el mismo método que el descrito en el apartado 4.2.3.2.a, si bien de forma previa a la adición del medio de extracción, se realizó una centrifugación de las muestras a 600 g durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante y fue el pellet lo que se resuspendió directamente en el medio de extracción ESB. Por su parte, la separación de proteínas y el inmunoblotting se llevaron a cabo de forma similar a la descrita en el apartado 4.2.3.2.b, con algunas modificaciones. Por ejemplo, a la hora de estudiar la presencia de la forma oxidada de CaMKII, el tiempo de bloqueo de los sitios de unión no específicos de las membranas con PBS 5% BSA tuvo que alargarse, a fin de disminuir al máximo las uniones inespecíficas, pasando de las 4 horas a las 8 horas.

Para la detección de las formas fosforilada y oxidada del complejo calcio-calmodulina Kinasa II (CaMKII) se probaron varios anticuerpos primarios distintos: así, se utilizaron dos anticuerpos monoclonales anti-CaMKII fosforilada en su residuo T286, generados ambos en ratón (AB171095, Abcam, Cambridge, Reino Unido y SC-32289, Santa Cruz Biotechnology, California, Estados Unidos) y un anticuerpo policlonal anti-CaMKII oxidada en sus residuos Met281/2, generado en conejo (07-13987, Milipore Corporation, Burlington, Massachusetts, Estados Unidos), ambos diluidos 1:2000 (v/v) en PBS-Tween-20 (0,1 % p/v) con un 1% de BSA (p/v). En ambos casos se añadieron también anticuerpos anti-actina y anti-tubulina como control de carga, producidos el primero en conejo (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) y el segundo en ratón (SC-398103, Santa Cruz Biotechnology, California, Estados Unidos), diluidos 1:500 (v/v) tal y como se describe en el apartado 4.2.3.2.b.

La incubación de las membranas con los anticuerpos primarios tuvo una duración diferente en función del tiempo utilizado en el bloqueo; de este modo, si el bloqueo tuvo una duración de cuatro horas, la incubación con el anticuerpo primario se mantuvo durante toda la noche, mientras que si el bloqueo se había extendido hasta las 8 horas, como en el caso de los western-blot para analizar la forma oxidada de CaMKII, la incubación con el anticuerpo primario se realizó durante 16 horas.

Por último, los lavados, la incubación con anticuerpos secundarios y el escaneado de las membranas se realizaron con el procedimiento descrito en el apartado 4.2.3.2.b.

#### **4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados presentados en este trabajo se muestran como la media  $\pm$  S.E.M. (error estándar de la media) del número de muestras indicadas para cada caso. El análisis estadístico de los datos se realizó con el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, San Diego, California, Estados Unidos). La motilidad, la viabilidad y el estado de capacitación se analizaron por chi-cuadrado, mientras que la cantidad de proteína CaMKII fosforilada y oxidada, la fosforilación en residuos de tirosina, y los niveles de CaMKII y CaMKII $\alpha$  analizados por inmunoensayo se evaluaron mediante ANOVA tras corroborar que los datos seguían una distribución normal mediante el test de Kolmogorov–Smirnov.

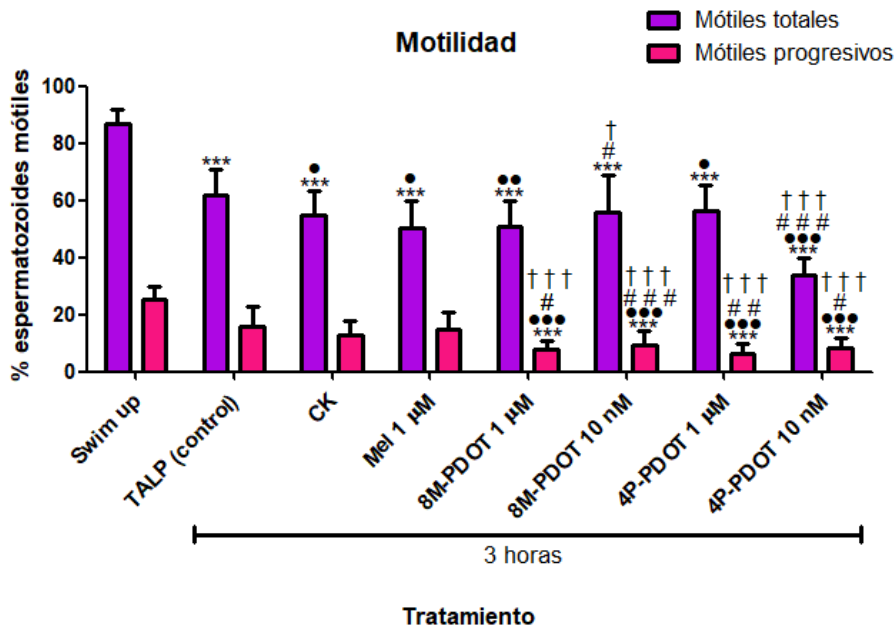
## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1. EFECTO DE LA MELATONINA Y DE UN AGONISTA Y UN ANTAGONISTA DE RECEPTORES DE LA MISMA SOBRE ESPERMATOZOIDES OVINOS INCUBADOS EN CONDICIONES CAPACITANTES**

En primer lugar, con el objetivo de comprobar que la adición de la melatonina, o de los agonistas y antagonistas de los receptores de la misma, no afectaba negativamente a la funcionalidad espermática, se estudió la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides ovinos en presencia de estos compuestos tras su incubación en condiciones capacitantes.

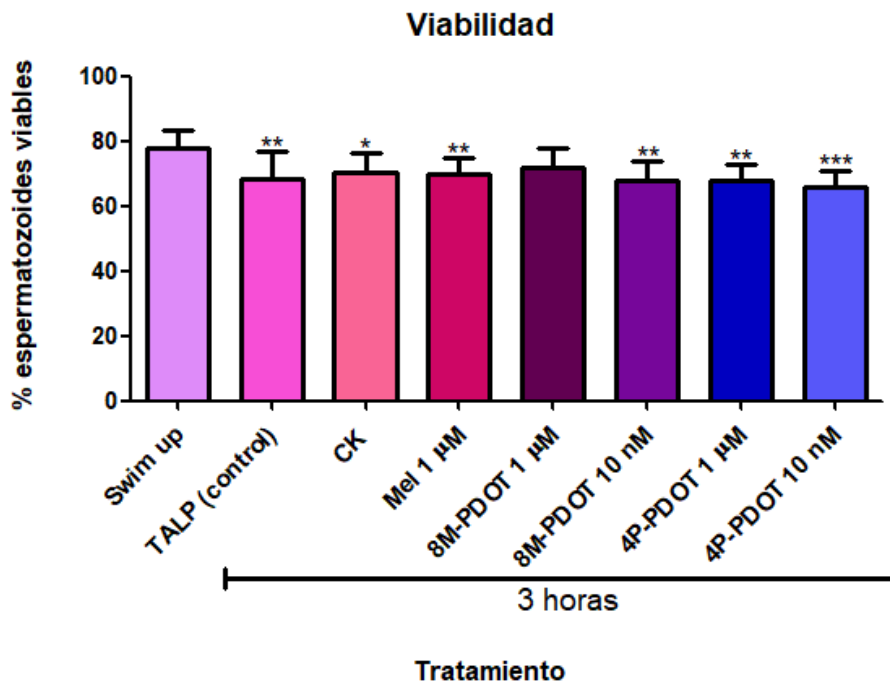
Por un lado, la incubación de los espermatozoides en medio TALP y en medio *cocktail* durante tres horas en condiciones capacitantes disminuyó la motilidad total de forma significativa ( $P < 0,01$ ) en todas las muestras con respecto a la muestra *swim-up* (figura 9). Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente por nuestro grupo de investigación, en los que se ha descrito que la incubación de espermatozoides en condiciones capacitantes durante tres horas provoca una disminución de la motilidad total (Gimeno-Martos *et al.*, 2019). Por otra parte, la muestra incubada con el antagonista de los receptores de melatonina a baja concentración (4P-PDOT a 10 nM), mostró diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) con las muestras TALP, *cocktail* y melatonina ( $33,73 \pm 6,1$  vs.  $62,03 \pm 8,9$ ;  $54,84 \pm 8,7$  y  $50,25 \pm 9,9$  % para 4P-PDOT 10 nM vs. TALP y *cocktail* y melatonina, respectivamente, figura 9). Este hecho, junto con el aumento de motilidad de la muestra incubada con el agonista 8M-PDOT 10 nM con respecto a las muestras *cocktail* y melatonina ( $55,69 \pm 13,4$  vs.  $54,85 \pm 8,7$  y  $50,269 \pm 9,9$  % para 8M-PDOT 10 nM vs. *cocktail* y melatonina,  $P < 0,05$ ) sugiere que, en el espermatozoide de morueco, el receptor  $MT_2$  estaría implicado en la motilidad, a diferencia de otros estudios en conejo que sugieren que, en esta especie, la melatonina actúa sobre la motilidad espermática por vía del receptor  $MT_1$  (Zhu *et al.*, 2019)

En el caso de la motilidad progresiva, se observó una disminución de este parámetro en todas las muestras incubadas en condiciones capacitantes (figura 9), debido a que durante la capacitación espermática se produce un cambio en el patrón de movimiento de los espermatozoides, denominado hiperactivación espermática, que implica un movimiento menos progresivo (Yanagimachi, 1994b). Este descenso fue significativo en presencia tanto del agonista del receptor de melatonina a ambas concentraciones como del antagonista, también a ambas concentraciones, lo cual parece indicar que este descenso en la motilidad progresiva es independiente de los efectos de la adición de melatonina o de sus agonistas y antagonistas. Esto concordaría con algunos estudios en los que se sugiere que, aunque la hiperactivación ocurra durante la capacitación, son fenómenos controlados por rutas diferentes, y que por tanto deberían considerarse de forma independiente (Ho and Suarez, 2001).



**Figura 9:** Porcentaje de espermatozoides móviles y móviles progresivos en muestras seleccionadas por *swim-up* e incubadas en medio TALP y *cocktail* (CK) en condiciones capacitantes (39 °C, 100% humedad y 5% de CO<sub>2</sub>) sin o con melatonina (a concentración final 1 μM), o con diferentes concentraciones (1 μM o 10 nM) del agonista de los receptores de la misma, (8M-PDOT) o melatonina 1 μM junto con el antagonista de los receptores de la misma (4P-PDOT). Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (n=4).\*\*\* P < 0,001 comparando con la muestra *swim up*; \*\*\* P<0,001, \*\* P<0,01 y \* P<0,05 con la muestra TALP; ### P<0,001, y ## P<0,01 y # P<0,05 con la muestra *cocktail*.; ††† P<0,001 y † P<0,05 con la muestra incubada en *cocktail* con melatonina.

Por otro lado, la viabilidad (integridad de membrana plasmática) disminuyó ligeramente tras las tres horas de incubación en condiciones capacitantes, tanto en las muestras incubadas en medio TALP (control) como en medio *cocktail*, en comparación con la muestra *swim-up* (figura 10). Estos resultados coincidirían con otros anteriores de nuestro grupo que demostraron que la incubación de los espermatozoides ovinos durante tres horas en condiciones capacitantes disminuye la viabilidad de las muestras (Luna *et al.*, 2015), y que la incubación con melatonina no parece afectar a la viabilidad (Casao *et al.*, 2010b).



**Figura 10:** Porcentaje de espermatozoides viables (con la membrana intacta) en muestras seleccionadas por *swim-up* e incubadas en medio TALP o *cocktail* (CK) en condiciones capacitantes (39 °C, 100% humedad y 5% de CO<sub>2</sub>) con o sin melatonina (a una concentración final de 1 μM), con diferentes concentraciones del agonista de los receptores de melatonina 8M-PDOT (1 μM o 10 nM) o con diferentes concentraciones del antagonista de los receptores de melatonina 4P-PDOT (1 μM o 10 nM) junto con melatonina 1 μM. Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (n=4).\*\*\* P<0,001, \*\* P<0,01 y \* P<0,05 comparando con la muestra *swim-up*.

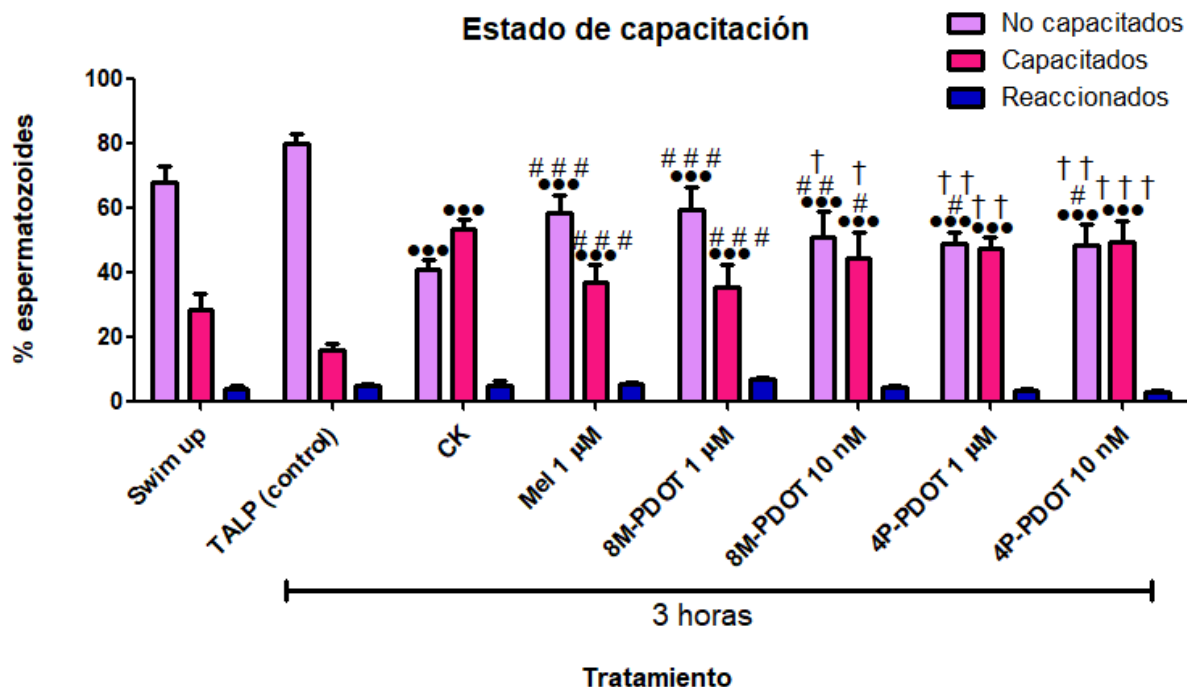
## 5.2. IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES DE MELATONINA EN EL EFECTO DESCAPACITANTE DE LA MISMA EN ESPERMATOZOIDEOS OVINOS INCUBADOS EN CONDICIONES CAPACITANTES

### 5.2.1. Efecto sobre la distribución del calcio

Nuestro grupo de investigación había descrito con anterioridad que la melatonina, a concentración 1 μM, ejercía un efecto descapacitante sobre los espermatozoides ovinos, tanto en medios sin agentes elevadores del AMPc (Casao *et al.*, 2010b) como en presencia de los mismos (*cocktail*) (Gimeno-Martos *et al.*, 2019). Este efecto podría estar mediado por la unión de la melatonina a sus receptores (MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub> o ambos) o ser independiente de ellos (y producirse tras atravesar directamente la membrana plasmática). Para dilucidar esta cuestión, se procedió a evaluar el estado de capacitación espermática mediante tinción con clorotetraciclina (CTC), tras incubación en condiciones capacitantes con agentes elevadores del AMPc (*cocktail*) en presencia de melatonina, y de un agonista y un antagonista de sus receptores.

Tal y como se aprecia en la figura 11, tras tres horas de incubación en condiciones capacitantes se produjo un incremento significativo (P<0,01) de espermatozoides capacitados en todas las muestras incubadas en medio *cocktail* cuando se comparan con el

grupo TALP. Este resultado concuerda con estudios previos de nuestro grupo, que demostraron que para que se produzca la capacitación en espermatozoides ovinos no sólo son necesarios los iones calcio y bicarbonato (presentes tanto en el medio TALP como en el *cocktail*), sino también un conjunto de sustancias que incrementen el AMPc, ya que en los espermatozoides de esta especie hay una elevada cantidad de fosfodiesterasas que degradan rápidamente el AMPc generado (Colas *et al.*, 2008).



**Figura 11:** Porcentaje de espermatozoides no capacitados, capacitados y reaccionados evaluados mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC) en muestras seleccionadas por *swim-up* y tras 3 horas de incubación *in vitro* en medio TALP o *cocktail* (CK) y en condiciones capacitantes (39 °C, 100% humedad y 5% de CO<sub>2</sub>) sin o con melatonina (a una concentración final de 1 μM), con diferentes concentraciones del agonista de receptores de melatonina 8M-PDOT (1 μM o 10 nM), o con diferentes concentraciones del antagonista de los receptores de melatonina 4P-PDOT (1 μM o 10 nM) junto con melatonina 1 μM. Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (n=4 \*\*\* P<0,001 comparando con la muestra control (TALP); #### P<0,001; ## P<0,01 y # P<0,05 comparando con la muestra incubada en medio *cocktail*; ††† P<0,001, †† P<0,01 y † P<0,05 comparando con la muestra incubada en medio *cocktail* y con melatonina 1 μM).

Además, la presencia de melatonina a una concentración 1 μM en el medio *cocktail* produjo un aumento significativo (P<0,01) del porcentaje de espermatozoides no capacitados (41 ± 2,9 vs. 58,40 ± 5,3 % para *cocktail* vs. melatonina), en detrimento del porcentaje de capacitados (53,40 ± 2,8 vs. 36,6 ± 5,9 % para *cocktail* vs. melatonina P<0,01), respecto de la muestra incubada en el mismo medio pero sin esta hormona. Estos resultados estarían en concordancia con el efecto descapacitante de la melatonina a esta concentración descrito anteriormente por nuestro grupo y comentado anteriormente (Casao *et al.*, 2010b; Gimeno-Martos *et al.*, 2019).

Al añadir el agonista de los receptores de melatonina 8M-PDOT a concentración 1 μM se obtuvieron unos porcentajes de espermatozoides no capacitados y capacitados

similares a los obtenidos con melatonina ( $58,4 \pm 5,3$  y  $59,4 \pm 6,7$  % de no capacitados para melatonina y para 8M-PDOT  $1 \mu\text{M}$  y  $36,6 \pm 5,9$  y  $35,2 \pm 7,2$  % de capacitados para melatonina y para 8M-PDOT  $1 \mu\text{M}$ , respectivamente, figura 11). Sin embargo, a concentración menor (10 nM), aunque también se produjo un aumento del porcentaje de espermatozoides no capacitados ( $51 \pm 7,9$  vs.  $41 \pm 2,9$  para 8M-PDOT 10 nM vs *cocktail*,  $P < 0,01$ ) y una disminución del porcentaje de capacitados ( $44,4 \pm 8,1$  vs.  $53,4 \pm 2,8$  para 8M-PDOT 10 nM vs *cocktail*,  $P < 0,05$ ) con respecto a la muestra *cocktail*, estos cambios también fueron significativamente inferiores a los de la muestra incubada con melatonina ( $58,4 \pm 5,3$  % de no capacitados y  $36,6 \pm 5,9$  % de capacitados,  $P < 0,05$  con respecto a 8M-PDOT 10 nM). Teniendo en cuenta que a concentración  $1 \mu\text{M}$ , 8M-PDOT es capaz de unirse a los dos receptores de melatonina  $\text{MT}_1$  y  $\text{MT}_2$ , mientras que a concentración 10 nM tiene mayor afinidad por el receptor  $\text{MT}_2$  (Dubocovich *et al.*, 1997), estos resultados parecen apuntar a que la melatonina, en medios con alto AMPc, necesita unirse a ambos receptores de melatonina para ejercer todo su efecto descapacitante.

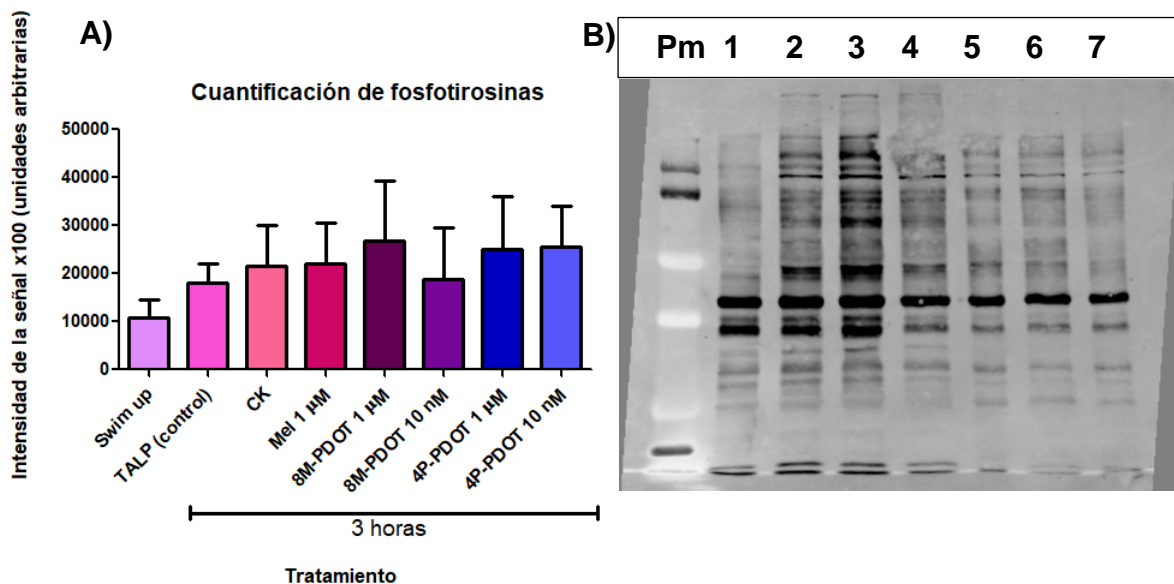
Cuando, previamente a la adición de melatonina  $1 \mu\text{M}$  en las muestras *cocktail*, se añadió el antagonista de los receptores 4P-PDOT, se atenuó el efecto descapacitante de la hormona, ya que, como se puede observar en la figura 11, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides capacitados con respecto a la muestra *cocktail* ( $53,4 \pm 2,8$  vs.  $47,2 \pm 3,6$  y  $49,2 \pm 6,6$  % para *cocktail* vs. 4P-PDOT  $1 \mu\text{M}$  y 10 nM, respectivamente), mientras que los no capacitados aumentaron ligeramente ( $41 \pm 2,9$  vs.  $48,8 \pm 3,5$  y  $48,2 \pm 6,72$  para *cocktail* vs. 4P-PDOT  $1 \mu\text{M}$  y 10 nM, respectivamente.  $P < 0,05$ ). Además, en las muestras incubadas con el antagonista, el porcentaje de espermatozoides no capacitados fue significativamente inferior, y el de capacitados superior a los de la muestra incubada con melatonina  $1 \mu\text{M}$  ( $58,4 \pm 5,3$  % de no capacitados y  $36,6 \pm 5,9$  % de capacitados,  $P < 0,01$  cuando se comparan con 4P-PDOT  $1 \mu\text{M}$  y 10 nM). Como 4P-PDOT es un antagonista selectivo del receptor  $\text{MT}_2$  a concentración 10 nM, y antagonista de ambos receptores a concentración  $1 \mu\text{M}$  (Dubocovich and Markowska, 2005), estos resultados corroboran los observados con el agonista. Hasta ahora, nuestro grupo había demostrado que el efecto descapacitante de la melatonina en medios sin agentes elevadores del AMPc se ejercía fundamentalmente a través del receptor  $\text{MT}_2$  (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016). Los resultados del presente trabajo Fin de Máster apuntan a que, cuando la capacitación se dispara con agentes elevadores del AMPc, este efecto descapacitante se podría llevar a cabo también a través de  $\text{MT}_1$ .

### **5.2.2. Efecto sobre la fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas de membrana espermáticas**

La fosforilación de proteínas es una modificación post-traducciona que se relaciona con el proceso de capacitación espermática. En concreto, se ha observado que durante la capacitación aumenta el grado de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en especies como el ratón (Visconti *et al.*, 1995), el ser humano (Carrera *et al.*, 1996; Leclerc *et al.*, 1997) y tal como describió nuestro grupo, también en la especie ovina (Pérez-Pé *et al.*, 2002). Por esta razón, una vez observado que la melatonina, el agonista 8M-PDOT y el antagonista 4P-PDOT modifican los porcentajes de espermatozoides capacitados y no capacitados determinados mediante tinción con CTC, se procedió a estudiar si la incubación

con estas sustancias en condiciones capacitantes afectaba también a la fosforilación de residuos de tirosina.

El análisis de las bandas correspondientes a fosfotirosinas obtenidas mediante western-blot por cuantificación densitométrica reveló una mayor señal para todas las muestras incubadas en medio cocktail frente a las muestras no capacitadas *in vitro* (*swim-up*) y muestras incubadas en medio TALP (figura 12.A). También puede observarse un ligero aumento de la señal en la muestra incubada con el agonista a concentración 1  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, las diferencias no fueron significativas entre ninguno de los grupos experimentales posiblemente debido a la gran variabilidad de señal que presentaron las distintas membranas de western-blot. Aunque tampoco se puede descartar que, aunque la melatonina y los moduladores de los receptores de la misma produzcan cambios sobre la distribución intracelular del calcio, que es lo que evalúa la tinción de CTC, no tengan efecto sobre la fosforilación de tirosinas en las condiciones ensayadas, ya que, aunque ambos fenómenos ocurren durante la capacitación espermática, no tienen por qué darse siempre juntos o en respuesta a los mismos estímulos (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016). Así, sería necesario llevar a cabo un mayor número de experimentos de western-blot para dilucidar esta cuestión.



**Figura 12.A:** Cuantificación por densitometría del total de proteínas fosforiladas en tirosinas de las muestras espermáticas seleccionadas por *swim-up* y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ ), en medio TALP (control), en medio cocktail, con melatonina 1  $\mu\text{M}$ , con diferentes concentraciones del agonista de receptores de melatonina 8M-PDOT (1  $\mu\text{M}$  o 10 nM), o con diferentes concentraciones del antagonista de los receptores de melatonina 4P-PDOT (1  $\mu\text{M}$  o 10 nM) junto con melatonina 1  $\mu\text{M}$ . Los valores se muestran como media  $\pm$  error estándar de la media ( $n=4$ ). **B.** Western-blot representativo de los obtenidos utilizando anticuerpos antifosfotirosinas en proteínas de muestras seleccionadas por *swim-up* (carril 1) y tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ ) en medio TALP (control, carril 2), en medio *cocktail* (carril 3), con melatonina 1  $\mu\text{M}$  (carril 4), con diferentes concentraciones del agonista de receptores de melatonina 8M-PDOT (1  $\mu\text{M}$  en el carril 5 o 10 nM, en el carril 6), o con el antagonista de los receptores de melatonina 4P-PDOT a una concentración 1  $\mu\text{M}$ , junto con melatonina 1  $\mu\text{M}$  (carril 7).



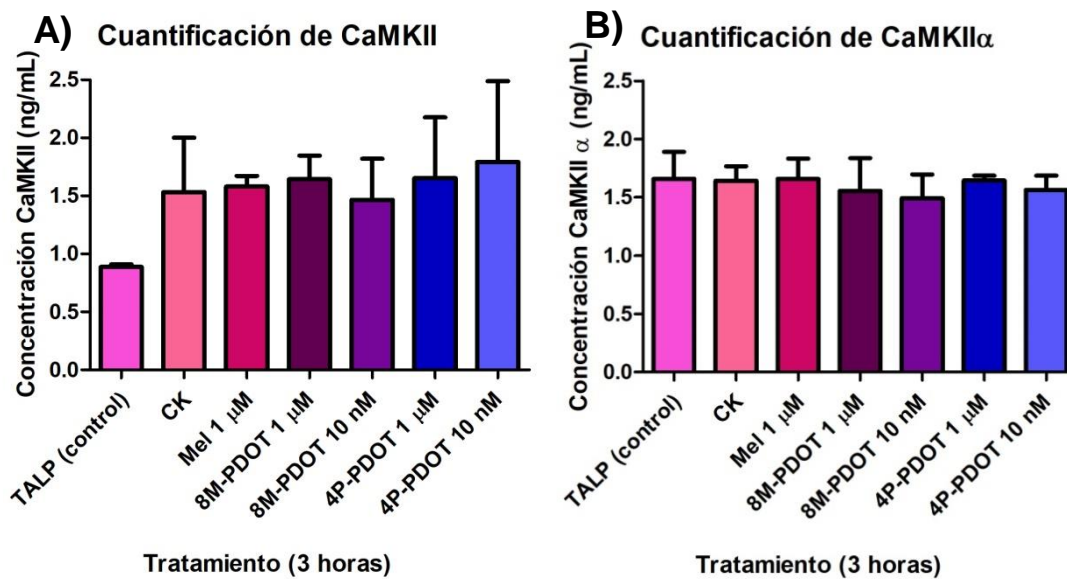
### 5.3. IMPLICACIÓN DE LA CaMKII EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA MELATONINA

Una vez estudiado el efecto de la melatonina sobre la capacitación espermática y la participación de ambos receptores de melatonina en el proceso, nos planteamos estudiar si en este mecanismo también estaba implicada la enzima CaMKII, y de qué manera.

#### 5.3.1. Efecto de la melatonina, y de agonistas y antagonistas de receptores de melatonina sobre los niveles de CaMKII y CaMKII $\alpha$ en el espermatozoide ovino evaluado por inmunoensayo

En un trabajo anterior, que formó parte de mi Trabajo Fin de Grado, se identificó, por primera vez, la CaMKII y su isoforma alfa (CaMKII $\alpha$ ) en el espermatozoide ovino. Además, se observó un aumento cualitativo en los niveles de esta enzima, evaluado por western-blot, cuando los espermatozoides eran incubados en condiciones capacitantes en presencia de melatonina a una concentración 1  $\mu$ M (Peña-Delgado *et al.*, 2018). Ya que, como hemos comentado, a veces es difícil la observación de diferencias significativas tras cuantificación de las señales de western-blotting, debido a la gran variabilidad de señal que presentan las distintas membranas, en el presente TFM se trató de determinar cuantitativamente cambios en los niveles de CaMKII y CaMKII $\alpha$  debidos a la presencia de melatonina mediante ensayos ELISA. Así mismo, también se realizaron ensayos en presencia de agonistas y antagonistas de sus receptores de membrana, con el fin de analizar si los cambios relativos a la cantidad de enzima se relacionarían con una posible unión de la melatonina a los receptores MT $_1$  y MT $_2$ .

Como se puede apreciar en la figura 13.A, se observó un aumento no significativo de los niveles de CaMKII total en todas las muestras incubadas en el medio *cocktail* respecto del control (TALP), lo que sugiere que se produce un aumento de la concentración de esta enzima con la capacitación espermática, ya que esta kinasa participa en importantes procesos que ocurren durante la capacitación, como la hiperactivación (Ignatz and Suarez, 2005) y la fosforilación de proteínas (González-Fernández *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016). Sin embargo, la concentración de la isoforma alfa (CaMKII $\alpha$ ) se mantiene constante entre los distintos grupos experimentales, en torno a los 1.5 ng/ml (figura 13.B). Teniendo en cuenta que el kit de ELISA empleado para medir los niveles de CaMKII total es capaz de reconocer todas las isoformas de la misma, es posible que el aumento en los niveles de CaMKII observado se deba a que aumenta la concentración de otras isoformas de CaMKII, como las isoformas  $\beta$ ,  $\delta$  o  $\gamma$ . En cualquier caso, la presencia de melatonina no dio lugar a ningún aumento en los niveles de esta enzima, ni tampoco la incubación con los agonistas o antagonistas de los receptores de la misma. Estos resultados no concuerdan con los observados en células somáticas, pues se ha visto en células de músculo esquelético que la melatonina es capaz de aumentar la concentración intracelular de CaMKII, y lo hace aumentando sus niveles de expresión (Teodoro *et al.*, 2014). Tal vez este efecto no se pueda observar en espermatozoides debido a que su material genético está altamente compactado al tener las histonas sustituidas por protaminas, de tal forma que no puede haber replicación ni transcripción (Ángel *et al.*, 2006), y de este modo, no se pueda producir ningún cambio en los niveles de expresión de ninguna proteína, incluida la CaMKII.



**Figura 13:** Concentración de CaMKII total (panel A) y CaMKII $\alpha$  (panel B) evaluada mediante ELISA en muestras espermáticas tras 3 horas de incubación en condiciones capacitantes (100% humedad, 39 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>) en medio TALP, en medio cocktail (CK), en medio cocktail con melatonina a una concentración final de 1  $\mu$ M, con diferentes concentraciones del agonista de receptores de melatonina 8M-PDOT (1  $\mu$ M o 10 nM) o con diferentes concentraciones del antagonista de los receptores de melatonina 4P-PDOT (1  $\mu$ M o 10 nM) junto con melatonina 1  $\mu$ M. Los valores se muestran como media  $\pm$  error estándar de la media de n=3 para CaMKII y de n=4 para CaMKII $\alpha$ .

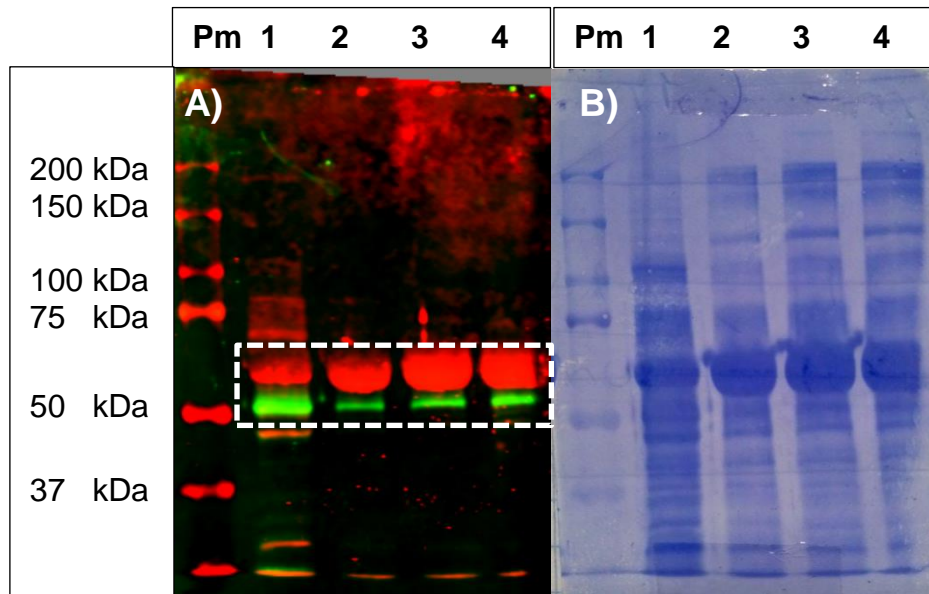
### 5.3.2. Identificación de modificaciones post-traduccionales de la calcio-calmodulina proteína quinasa II (CaMKII) en el espermatozoide ovino

Una vez comprobado que los efectos de la melatonina sobre la capacitación espermática no están mediados por cambios en la concentración de la enzima CaMKII, quedaba por estudiar la posibilidad de que dicha hormona actuase dando lugar a modificaciones post-traduccionales de la citada enzima, pues ésta puede sufrir tanto procesos de fosforilación como de oxidación (Erickson, 2014). Estas modificaciones se han descrito en células somáticas como en cardiomiocitos (Erickson *et al.*, 2011b), neuronas (Lee *et al.*, 2009) y células de músculo esquelético (Eilers *et al.*, 2014), y también en espermatozoides de algunas especies, como la especie bovina (Shabtay and Breitbart, 2016), pero hasta la fecha, nunca se habían descrito en el espermatozoide ovino. Así que, el siguiente paso se centró en investigar si las formas oxidada y fosforilada de la CaMKII estaban presentes en espermatozoides de morueco.

#### 5.3.2.1 Identificación de la enzima CaMKII en su forma oxidada

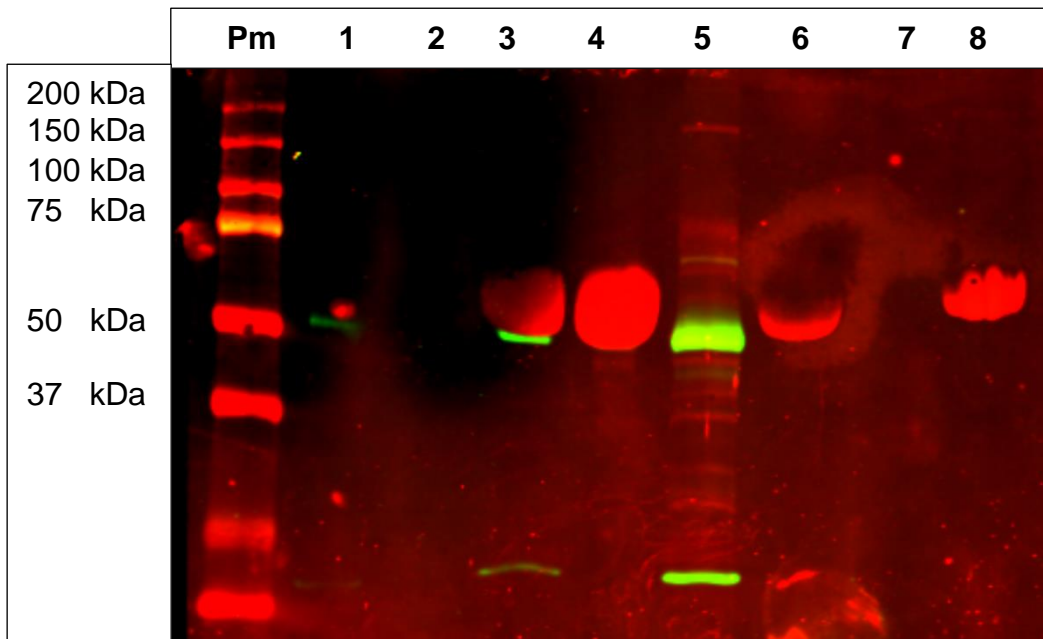
La oxidación de los residuos Met281 y Met282 es un fenómeno que se ha observado, además de en tejido cardíaco (Erickson *et al.*, 2011a), en el espermatozoide bovino (Shabtay and Breitbart, 2016), de modo que se procedió a evaluar, mediante western-blot, la posible presencia de CaMKII oxidada en el espermatozoide de morueco.

Los primeros western-blot realizados con el único anticuerpo disponible para CaMKII oxidada (07-13987, Milipore Corporation, Burlington, Massachusetts, Estados Unidos ) mostraron una banda muy intensa en torno en torno a los 60 kDa, que es el peso molecular esperado para esta proteína oxidada (figura 14.A.). Aunque estos resultados parecían esperanzadores, al comparar las bandas fluorescentes con las que aparecían en las membranas una vez teñidas (figura 14.B.) daba la impresión de que el anticuerpo estaba reconociendo en realidad a la albúmina sérica bovina (BSA), que estaba presente en los medios en los que se habían incubado las muestras, y que tiene un peso molecular parecido al de la CaMKII oxidada (en torno a 66 kDa).



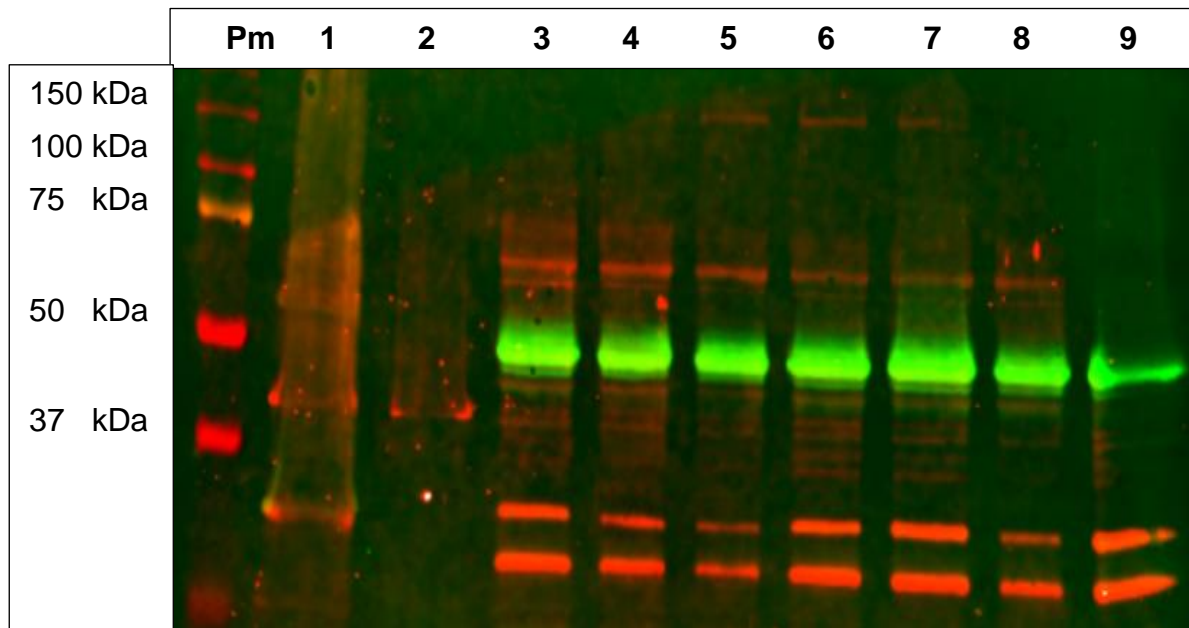
**Figura 14. A):** Western-blot representativo de los obtenidos utilizando un anticuerpo anti CaMKII oxidada (07-13987, Milipore Corporation) en proteínas extraídas de espermatozoides seleccionados por *swim-up* (carril 1), y tras tres horas de incubación en condiciones capacitantes (100 % humedad, 39 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>) en medio TALP (carril 2), en medio *cocktail* (carril 3) y en medio *cocktail* con melatonina a una concentración 1 μM (carril 4). Las bandas correspondientes a la proteína de interés (en rojo) y a la tubulina empleada como control de carga (verde) aparecen remarcadas en blanco. **B):** Membrana teñida con Azul de Coomassie de ese mismo western-blot.

A fin de comprobar esta posible unión inespecífica, se realizó un nuevo western blot en el que se cargaron proteínas extraídas de una muestra de semen fresco diluido en medio bifase (que no lleva BSA en su composición), semen fresco diluido en medio mHTF con BSA, y muestras de espermatozoides seleccionados por *swim-up* y posteriormente capacitados *in vitro* sustituyendo la BSA por polivinilpirrolidona (PVP) para evitar la aglutinación espermática y la adhesión de los espermatozoides a las paredes de los tubos. Este cambio se realizó en base a resultados previos del grupo, que sugerían que la BSA no era necesaria para la capacitación de los espermatozoides ovinos (Grasa *et al.*, 2006). Además, en ese mismo western-blot también se cargó el medio mHTF-BSA sin células. El resultado reveló que, efectivamente, el anticuerpo se estaba uniendo a la BSA (figura 15), pues sólo aparecía señal en los carriles donde se habían cargado muestras celulares que se habían diluido en medio con BSA, y en el medio mHTF-BSA sin células.



**Figura 15:** Western-blot incubado con un anticuerpo que reconoce a la enzima CaMKII oxidada (O7-13987, Milipore Corporation) en una muestra de proteínas procedentes de semen fresco diluido 1:100 (carril 1) y 1:500 (carril 2) en medio bifase; de una muestra de semen fresco diluido 1:100 (carril 3) y 1:500 (carril 4) en medio mHTF-BSA; de una muestra de espermatozoides seleccionados por *swim-up* realizado con dextrano y PVP (sin BSA, carril 5), y de una alícuota de medio mHTF-BSA sin células sometido al mismo procedimiento de extracción de proteínas que el resto de muestras (carril 6) o añadida directamente (carril 8).

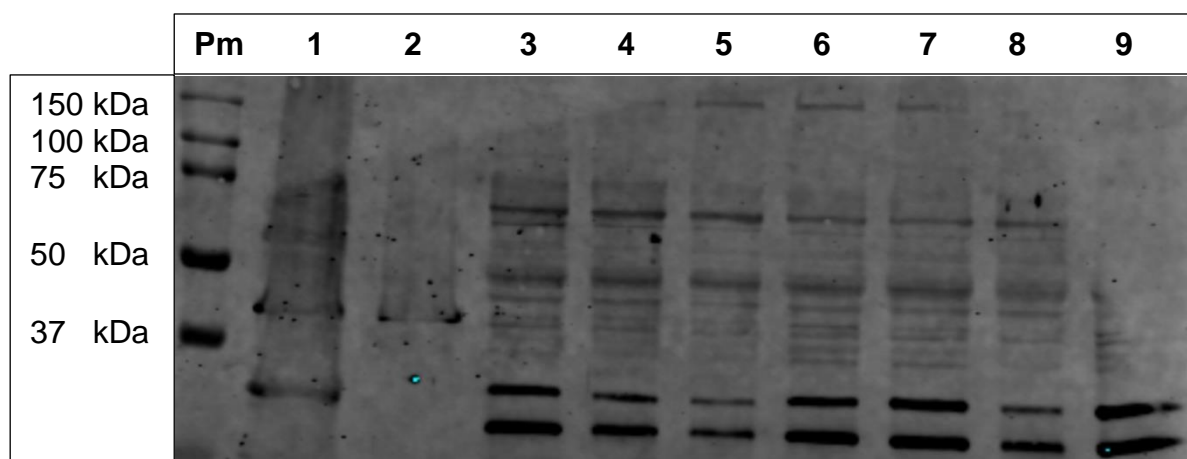
Dado que la eliminación de BSA aparentemente no afectaba negativamente al desarrollo del *swim-up* y la capacitación (evaluada por CTC), se realizaron los experimentos con agonistas y antagonistas sustituyendo la BSA por PVP en los medios, y cuyos resultados se han expuesto en los apartados 5.1-5.3. Tras el proceso de capacitación, se extrajeron proteínas y estas fueron analizadas de nuevo por western-blot, probando distintos tiempos de bloqueo e incubación con el anticuerpo primario, a fin de disminuir al máximo las posibles uniones inespecíficas. Además, se añadieron también controles positivos (lisado de corazón de ratón, y lisado de hígado ovino), con los que se esperaba identificar la banda correspondiente a la CaMKII oxidada, con un peso molecular en torno a los 60 kDa. La elección de estos controles positivos se basó en estudios que demostraban que la enzima estaba presente en el corazón de ratón (Swaminathan *et al.*, 2011) y en el hígado de rata (Toledo *et al.*, 2014), aunque no se encontró bibliografía específica sobre la presencia de CaMKII en el hígado ovino. El análisis de las membranas reveló la presencia de una banda en torno a 60 kDa en las muestras de espermatozoide de morueco, que podría tratarse de la enzima CaMKII oxidada; sin embargo, junto a ella aparecían también otras bandas, de incluso mayor intensidad y de menor peso molecular (figura 16) que podrían implicar la presencia de la proteína, pero fragmentada, aunque esto resulta poco probable, pues no se ha descrito que la CaMKII tenga subunidades susceptibles de separarse por SDS-PAGE.



**Figura 16:** Western-blot representativo de los obtenidos utilizando un anticuerpo anti CaMKII oxidada (07-13987, Milipore Corporation) en proteínas extraídas de espermatozoides incubados durante tres horas en condiciones capacitantes (100 % humedad, 39 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>) en medio TALP (carril 3), en medio *cocktail* (carril 4), en medio *cocktail* con melatonina a una concentración 1 μM (carril 5), con el agonista 8M-PDOT a una concentración 1 μM (carril 6) o 10 nM (carril 7), y con el antagonista 4P-PDOT a concentración 1 μM (carril 8) o 10 nM (carril 9) junto con melatonina 1 μM. Los carriles 1 y 2 corresponden a los controles positivos: proteínas de lisado de corazón de ratón (carril 1) y de lisado de hígado ovino (carril 2). Las bandas correspondientes a la proteína de interés aparecen de color rojo, mientras que la banda verde es la tubulina empleada como control de carga.

No obstante, al visualizar las membranas en blanco y negro, se evidenció la presencia de un mayor número de bandas (figura 17) que implicarían una unión inespecífica del anticuerpo primario utilizado a múltiples proteínas oxidadas, y que no aparecían en los controles positivos. El hecho de que aparezcan estas múltiples bandas en las muestras espermáticas y no aparezcan en los controles positivos podría deberse a que los espermatozoides son células muy sensibles al estrés oxidativo (Agarwal *et al.*, 2014) y los espermatozoides incubados en condiciones capacitantes sufren un aumento de la producción de ROS, que sirven para regular la capacitación (Kothari *et al.*, 2010) y que podrían oxidar múltiples proteínas en sus residuos de metionina.

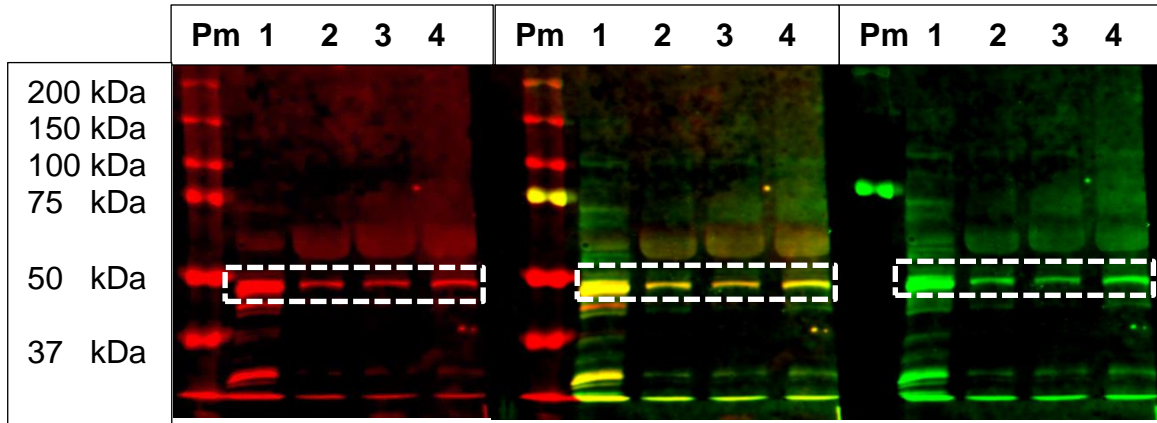
De este modo, con los experimentos realizados no se ha podido evidenciar de forma fehaciente que la CaMKII sufra procesos de oxidación en el espermatozoide ovino, pese a que sí se ha descrito esta modificación post-traducciona para la CaMKII del espermatozoide bovino (Shabtay and Breitbart, 2016), por lo que se necesitaría realizar más estudios de western-blot o ampliar estos con ensayos de inmunofluorescencia indirecta a fin de poder determinar si verdaderamente la CaMKII se oxida en el espermatozoide ovino.



**Figura 17:** Mismo Western-blot que el mostrado en la figura 16 pero visualizado en blanco y negro con el canal de detección de 700 nm, donde se visualizan las bandas que proporcionó el anticuerpo anti CaMKII oxidada (07-13987, Milipore Corporation) en proteínas extraídas de espermatozoides incubados durante tres horas en condiciones capacitantes (100 % humedad, 39 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>) en medio TALP (carril 3), en medio *cocktail* (carril 4), en medio *cocktail* con melatonina a una concentración 1 μM (carril 5), con el agonista 8M-PDOT a una concentración 1 μM (carril 6) o 10 nM (carril 7), y con el antagonista 4P-PDOT a concentración 1 μM (carril 8) o 10 nM (carril 9) junto con melatonina 1 μM. Los carriles 1 y 2 corresponden a los controles positivos: proteínas de lisado de corazón de ratón (carril 1) y de lisado de hígado ovino (carril 2).

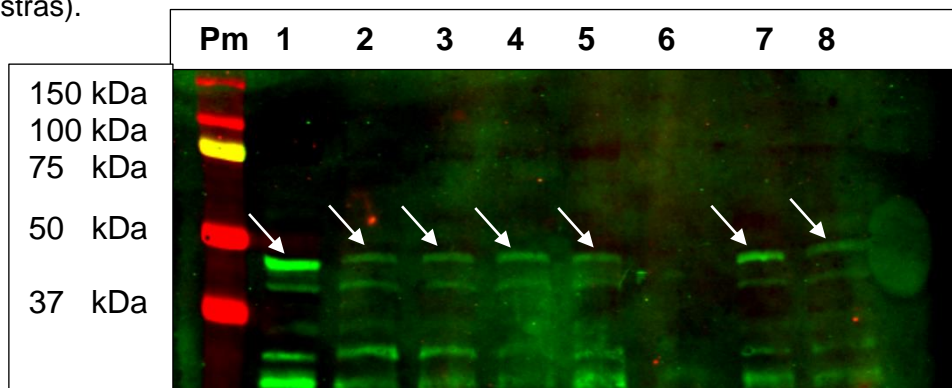
### 5.3.2.2 Identificación de la enzima CaMKII en su forma fosforilada y de cambios en los niveles de la misma

Para identificar la CaMKII fosforilada se realizaron análisis por western-blot utilizando anticuerpos que reconocían a la CaMKII fosforilada en su residuo T286. El primer anticuerpo utilizado (ab171095, Abcam, Cambridge, Reino Unido), permitió evidenciar la presencia de una banda de peso molecular de aproximadamente 50 kDa (figura 18) que se correspondería con el peso molecular de la CaMKII fosforilada. Sin embargo, el peso molecular de esta enzima coincide con el peso molecular de la actina, la proteína utilizada para la normalización en la cuantificación por densitometría, de tal modo que con este anticuerpo resultaba imposible discernir cuál era la banda correspondiente a la proteína de interés, y cuál la correspondiente a la actina, pues se veía una única banda de color amarillo, resultado de la superposición de la señal verde (correspondiente a la CaMKII fosforilada) y la señal roja (la correspondiente a la actina). Este marcaje inespecífico también se mantenía al evaluar los canales 700 y 800 por separado.



**Figura 18:** Western-blot representativo de los obtenidos utilizando un anticuerpo anti CaMKII fosforilada (ab171095, Abcam) en proteínas extraídas de espermatozoides seleccionados por *swim-up* (carril 1), y tras tres horas de incubación en condiciones capacitantes (100 % humedad, 39 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>) en medio TALP (carril 2), en medio *cocktail* (carril 3) y en medio *cocktail* con melatonina a una concentración 1 μM (carril 4). Las bandas correspondientes a la proteína de interés aparecen remarcadas en blanco. A la izquierda, aparece la membrana vista con el canal de detección de 700 nm, a la derecha, vista con el canal de detección de 800 nm, y en el centro, vista con ambos canales abiertos a la vez.

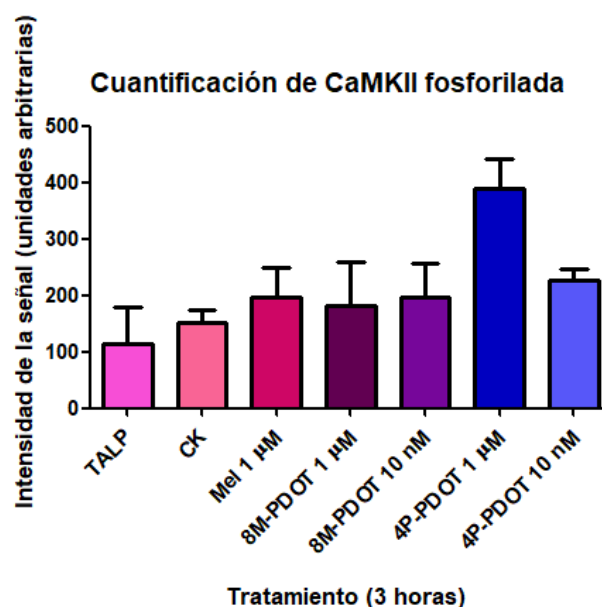
Por este motivo, se decidió cambiar de anticuerpo y se adquirió otro de otra casa comercial (SC-32289, Santa Cruz Biotechnology, California, Estados Unidos), se repitieron los análisis de western-blot y siguió apareciendo el mismo problema. Finalmente, para evitar estas interferencias, se decidió no añadir anticuerpos que reconociesen a la actina, a fin de observar una única banda a 50 kDa (figura 19), que se correspondería con la CaMKII fosforilada. Los cambios observados en la señal de estas bandas fueron referidos a la concentración de células añadidas al principio ( $1,6 \times 10^8$  células/ml, para todas las muestras).



**Figura 19:** Western-blot representativo de los obtenidos utilizando un anticuerpo anti-CaMKII fosforilada (SC-32289, Santa Cruz Biotechnology) en proteínas extraídas de espermatozoides seleccionados por *swim-up* (carril 1), y tras tres horas de incubación en condiciones capacitantes en medio TALP (carril 2), en medio *cocktail* (carril 3) y en medio *cocktail* con melatonina a una concentración 1 μM (carril 4), con el agonista 8M-PDOT a una concentración 1 μM (carril 5) y a 10 nM (carril 6), y con el antagonista 4P-PDOT a concentración 1 μM (carril 7) y 10 nM (carril 8), junto con melatonina 1 μM. Las bandas correspondientes a la proteína de interés aparecen remarcadas con flechas blancas.

Estos resultados permitieron evidenciar, por primera vez, la presencia de la CamKII en su forma fosforilada en espermatozoides ovinos. Tras haber identificado que la enzima CaMKII sufre procesos de fosforilación en el espermatozoide ovino, se procedió a evaluar si se producían cambios en los niveles de esta enzima fosforilada en presencia de melatonina, o de agonistas y antagonistas de los receptores de la misma. La cuantificación por densitometría de las membranas obtenidas por western-blot, mostró aumento de la señal, aunque no significativa, en las muestras incubadas con la hormona y los agonistas y antagonistas, con respecto a las muestras TALP y *cocktail*, especialmente en las muestras incubadas con el antagonista 4P-PDOT, a una concentración 1  $\mu$ M (figura 20).

A la vista de estos resultados, se podría concluir que, la melatonina, a través de su unión a receptores, no es capaz de ejercer cambios sobre la CaMKII relacionados con su fosforilación.



**Figura 20:** Cuantificación por densitometría de CaMKII fosforilada en las muestras espermáticas tras tres horas de incubación en condiciones capacitantes (100 % humedad, 39 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>) en medio TALP, en medio *cocktail* (CK), en medio *cocktail* con melatonina (a una concentración final de 1  $\mu$ M), con diferentes concentraciones del agonista de los receptores de melatonina 8M-PDOT (1  $\mu$ M o 10 nM) o con diferentes concentraciones del antagonista de los receptores de melatonina 4P-PDOT (1  $\mu$ M o 10 nM) junto con melatonina 1  $\mu$ M. Los valores se muestran como media  $\pm$  error estándar de la media (n=4).

En conclusión, la melatonina a concentración 1  $\mu$ M ejerce un efecto descapacitante en los espermatozoides ovinos. Este efecto, al menos en relación con la localización del calcio intracelular evaluado por la tinción de CTC, lo ejerce por medio de su unión a ambos receptores de membrana específicos, el MT<sub>1</sub> y el MT<sub>2</sub>. Sin embargo, a esta concentración, la melatonina, no es capaz de modificar los niveles de la enzima CamKII, ni de forma global, ni de su isoforma  $\alpha$ , que es la está más relacionada con la capacitación espermática en otras especies (Zhang *et al.*, 2016). Además, tampoco es capaz de ejercer modificaciones post-traduccionales en dicha enzima, al menos fosforilaciones, ya que la forma oxidada no se ha detectado en el presente trabajo. Por tanto, el efecto sobre la capacitación espermática ovina de la melatonina no parece mediado por una acción sobre la CaMKII.



## **6. CONCLUSIONES**

1) El agonista de receptores de melatonina 8M-PDOT a concentraciones altas (1  $\mu$ M) produjo un aumento significativo del porcentaje de espermatozoides no capacitados y una disminución del porcentaje de capacitados similares a los producidos por la melatonina añadida a la misma concentración en condiciones capacitantes.

2) La incubación con el antagonista de receptores de melatonina 4P-PDOT añadido a diferentes concentraciones (1  $\mu$ M y 10 nM), y seguido de la adición de melatonina (1  $\mu$ M) treinta minutos después, produjo una disminución del porcentaje de espermatozoides no capacitados y un incremento del porcentaje de capacitados con respecto a la muestra incubada con melatonina, lo que sugiere que en medios con alto AMPc, la melatonina ejercería su efecto decapitante sobre los espermatozoides ovinos a través de su unión a sus dos receptores específicos, MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>.

3) Los cambios observados en los porcentajes de espermatozoides capacitados y no capacitados en respuesta a la melatonina, y a los agonistas y antagonistas de los receptores de la misma, no se relacionaron con los cambios en el grado de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina.

4) La melatonina no produjo cambios cuantitativos en los niveles de la enzima CaMKII ni de su isoforma alfa (CaMKII $\alpha$ ), y tampoco lo hicieron el antagonista ni el antagonista de sus receptores, añadidos a diferentes concentraciones.

5) La forma fosforilada de la CaMKII está presente en espermatozoides ovinos, pero no se pudo determinar de forma concluyente la presencia de la forma oxidada.

6) La incubación con melatonina, agonistas o antagonistas de sus receptores no afecta a la fosforilación de la CaMKII durante la capacitación espermática ovina

## **CONCLUSIONS**

1) Melatonin receptor agonist, 8M-PDOT, at high concentrations (1  $\mu$ M), produced a significant increase in the percentage of non-capacitated sperm and a decrease in the percentage of capacitated sperm, which were similar to those changes produced when melatonin was added at the same concentration in capacitating conditions.

2) Incubation with melatonin receptor antagonist 4P-PDOT, added at different concentrations (1  $\mu$ M and 10 nM), followed by the addition of melatonin (1  $\mu$ M) 30 minutes later, produced a decrease in the percentage of non-capacitated sperm and an increase in the percentage of capacitated spermatozoa compared to the sample incubated with melatonin, suggesting that in high AMPc medium, melatonin would exert the decapacitating action on ram sperm by binding to its two specific receptors MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub>.

3) These observed changes in the percentages of non-capacitated and capacitated sperm in response to melatonin, and to agonists and antagonists of melatonin receptors, were not related to changes in the degree of phosphorylation of tyrosine residues in proteins.

4) Melatonin did not produce quantitative changes in the levels of the CaMKII enzyme or its alpha isoform (CaMKII $\alpha$ ), nor did the antagonist or antagonist of its receptors added to different concentrations (1  $\mu$ M and 10 nM).

5) Phosphorylated CaMKII is present in ram spermatozoa, but the presence of the oxidized form could not be conclusively determined.

6) Incubation with melatonin, or melatonin receptor agonists or antagonists did not affect CaMKII phosphorylation during ram sperm capacitation.

## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., Plessis, S.S. du, 2014. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *The World Journal of Men's Health* 32, 1.
- Alquézar-Baeta, C., Gimeno-Martos, S., Miguel-Jiménez, S., Santolaria, P., Yániz, J., Palacín, I., Casao, A., Cebrián-Pérez, J.Á., Muiño-Blanco, T., Pérez-Pé, R., 2019. OpenCASA: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis. *PLoS Comput Biol* 15.
- Alvarez, J.G., Lasso, J.L., Blasco, L., Nuñez, R.C., Heyner, S., Caballero, P.P., Storey, B.T., 1993. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Hum. Reprod.* 8, 1087–1092.
- Ángel, M.O., Ruíz, T., Morales, A.M.T., Echeverri, C.A.G., 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 19, 426–436.
- Avdi, M., Banos, G., Stefos, K., Chemineau, P., 2004. Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams. *Theriogenology* 62, 275–282.
- Baldi, E., Casano, R., Falsetti, C., Krausz, C., Maggi, M., Forti, G., 1991. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J. Androl.* 12, 323–330.
- Bazwinsky-Wutschke, I., Mühlbauer, E., Albrecht, E., Peschke, E., 2014. Calcium-signaling components in rat insulinoma  $\beta$ -cells (INS-1) and pancreatic islets are differentially influenced by melatonin. *J. Pineal Res.* 56, 439–449. <https://doi.org/10.1111/jpi.12135>
- Bedu-Addo, K., Costello, S., Harper, C., Machado-Oliveira, G., Lefievre, L., Ford, C., Barratt, C., Publicover, S., 2008. Mobilisation of stored calcium in the neck region of human sperm--a mechanism for regulation of flagellar activity. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 615–626.
- Benítez-King, G., 2006. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J. Pineal Res.* 40, 1–9.
- Benítez-King, G., Huerto-Delgado, L., Antón-Tay, F., 1993. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sciences* 53, 201–207. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(93\)90670-X](https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90670-X)
- Benítez-King, G., Ríos, A., Martínez, A., Antón-Tay, F., 1996. In vitro inhibition of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim. Biophys. Acta* 1290, 191–196.
- Boutin, J.A., Audinot, V., Ferry, G., Delagrangé, P., 2005. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 412–419.
- Brzezinski, A., Seibel, M.M., Lynch, H.J., Deng, M.H., Wurtman, R.J., 1987. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64, 865–867.
- Carrera, A., Moos, J., Ning, X.P., Gerton, G.L., Tesarik, J., Kopf, G.S., Moss, S.B., 1996. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a

- calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev. Biol.* 180, 284–296.
- Casao, A., Cebrián, I., Asumpção, M.E., Pérez-Pé, R., Abecia, J.A., Forcada, F., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T., 2010a. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8, 59.
- Casao, A., Gallego, M., Abecia, J.A., Forcada, F., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.Á., 2012. Identification and immunolocalisation of melatonin MT(1) and MT(2) receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 953–961.
- Casao, A., Mendoza, N., Pérez-Pé, R., Grasa, P., Abecia, J.-A., Forcada, F., Cebrián-Pérez, J.A., Muino-Blanco, T., 2010b. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *J. Pineal Res.* 48, 39–46.
- Chin, E.R., 2004. The role of calcium and calcium/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity and mitochondrial biogenesis. *Proc Nutr Soc* 63, 279–286.
- Colas, C., James, P., Howes, L., Jones, R., Cebrian-Perez, J.A., Muiño-Blanco, T., 2008. Cyclic-AMP initiates protein tyrosine phosphorylation independent of cholesterol efflux during ram sperm capacitation. *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 649–658.
- Coultrap, S.J., Bayer, K.U., 2012. CaMKII regulation in information processing and storage. *Trends Neurosci.* 35, 607–618. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.05.003>
- Di Francesco, S., Mariotti, E., Tsantarliotou, M., Sattar, A., Venditto, I., Rubessa, M., Zicarelli, L., Gasparrini, B., 2010. Melatonin promotes in vitro sperm capacitation in buffalo (*Bubalus bubalis*) Abstract No. 311. *Reproduction Fertility and Development* 22, 311–312.
- Dubocovich, M.L., Markowska, M., 2005. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocr* 27, 101–110.
- Dubocovich, M.L., Masana, M.I., Iacob, S., Sauri, D.M., 1997. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 355, 365–375.
- Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M.R., Reppert, S.M., 1994. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 6133–6137.
- Ebling, F., Hastings, M., 1992. The neural basis of seasonal reproduction. *Annales de zootechnie* 41, 239–246.
- Eilers, W., Gevers, W., Overbeek, D. van, Haan, A. de, Jaspers, R.T., Hilbers, P.A., Riel, N. van, Flück, M., 2014. Muscle-Type Specific Autophosphorylation of CaMKII Isoforms after Paced Contractions. *BioMed Research International* 2014.
- Erickson, J.R., 2014. Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. *Front Pharmacol* 5.

- Erickson, J.R., He, B.J., Grumbach, I.M., Anderson, M.E., 2011a. CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states. *Physiol. Rev.* 91, 889–915.
- Erickson, J.R., Patel, R., Ferguson, A., Bossuyt, J., Bers, D.M., 2011b. FRET-based sensor Camui provides new insight into mechanisms of CaMKII activation in intact cardiomyocytes. *Circulation research* 109, 729.
- Fujinoki, M., 2008. Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction* 136, 533–541.
- Galantino-Homer, H.L., Visconti, P.E., Kopf, G.S., 1997. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol. Reprod.* 56, 707–719.
- García-López, N., Ollero, M., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., 1996. A dextran swim-up procedure for separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma. *Theriogenology* 46, 141–151.
- Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W.M., 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 481–487.
- Gimeno-Martos, S., Casao, A., Yeste, M., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T., Pérez-Pé, R., 2019. Melatonin reduces cAMP-stimulated capacitation of ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 31, 420–431.
- Gonzalez-Arto, M., Luna, C., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., Casao, A., 2016. New evidence of melatonin receptor contribution to ram sperm functionality. *Reprod. Fertil. Dev.* 28, 924–935.
- González-Fernández, L., Macías-García, B., Loux, S.C., Varner, D.D., Hinrichs, K., 2013. Focal adhesion kinases and calcium/calmodulin-dependent protein kinases regulate protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm. *Biol. Reprod.* 88, 138.
- Grasa, P., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T., 2006. Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reproduction* 132, 721–732. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00770>
- Grasa, P., Colas, C., Gallego, M., Monteagudo, L., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., 2009. Changes in content and localization of proteins phosphorylated at tyrosine, serine and threonine residues during ram sperm capacitation and acrosome reaction. *Reproduction* 137, 655–667.
- Grasa, P., Pérez-Pé, R., Báguena, O., Forcada, F., Abecia, A., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T., 2004. Ram sperm selection by a dextran/swim-up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes. *J. Androl.* 25, 982–990.
- Han, J.H., Chang, I.H., Myung, S.C., Lee, M.Y., Kim, W.Y., Lee, Seo Yeon, Lee, Shin Young, Lee, S.W., Kim, K.D., 2012. A novel pathway underlying the inhibitory effects of melatonin on isolated rat urinary bladder contraction. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 16, 37–42.

- Harrison, R.A., Vickers, S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 88, 343–352.
- Hazlerigg, D.G., Morgan, P.J., Lawson, W., Hastings, M.H., 1991. Melatonin Inhibits the Activation of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase in Cultured Pars Tuberalis Cells from Ovine Pituitary. *J. Neuroendocrinol.* 3, 597–603.
- Ho, H.-C., Suarez, S.S., 2003. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol. Reprod.* 68, 1590–1596.
- Ho, H.C., Suarez, S.S., 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* 122, 519–526.
- Hudmon, A., Schulman, H., 2002a. Neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 473–510.
- Hudmon, A., Schulman, H., 2002b. Structure–function of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochemical Journal* 364, 593–611.
- Huether, G., 1993. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia* 49, 665–670.
- Iborra, A., Companyó, M., Martínez, P., Morros, A., 2000. Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. *Biol. Reprod.* 62, 378–383.
- Ignotz, G.G., Suarez, S.S., 2005b. Calcium/calmodulin and calmodulin kinase II stimulate hyperactivation in demembrated bovine sperm. *Biol. Reprod.* 73, 519–526.
- J Parrish, J., Susko-Parrish, J., Winer, M., L First, N., 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of reproduction* 38, 1171–80.
- Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A., du Plessis, S.S., 2010. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J. Exp. Biol.* 48, 425–435.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lai, Y., Nairn, A.C., Gorelick, F., Greengard, P., 1987. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II: identification of autophosphorylation sites responsible for generation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-independence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5710–5714.
- Leahy, T., Rickard, J.P., Aitken, R.J., de Graaf, S.P., 2016. Penicillamine prevents ram sperm agglutination in media that support capacitation. *Reproduction* 151, 167–177.
- Leclerc, P., de Lamirande, E., Gagnon, C., 1997. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 643–656.
- Lee, S.-J.R., Escobedo-Lozoya, Y., Szatmari, E.M., Yasuda, R., 2009. Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature* 458, 299.

- Li, X., Wang, L., Li, Y., Zhao, N., Zhen, L., Fu, J., Yang, Q., 2016. Calcium regulates motility and protein phosphorylation by changing cAMP and ATP concentrations in boar sperm in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 172, 39–51.
- Luchetti, F., Canonico, B., Betti, M., Arcangeletti, M., Pilolli, F., Piroddi, M., Canesi, L., Papa, S., Galli, F., 2010. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J.* 24, 3603–3624.
- Luczak, E.D., Anderson, M.E., 2014. CaMKII oxidative activation and the pathogenesis of cardiac disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 73, 112–116.
- Luna, C., Colás, C., Casao, A., Serrano, E., Domingo, J., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T., 2015. Ram seminal plasma proteins contribute to sperm capacitation and modulate sperm-zona pellucida interaction. *Theriogenology* 83, 670–678.
- Ma, H., Li, B., Tsien, R.W., 2015. Distinct roles of multiple isoforms of CaMKII in signaling to the nucleus. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 1953–1957.
- Macías, M., Escames, G., Leon, J., Coto, A., Sbihi, Y., Osuna, A., Acuña-Castroviejo, D., 2003. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur. J. Biochem.* 270, 832–840.
- Malpoux, B., Thiéry, J.C., Chemineau, P., 1999. Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod. Nutr. Dev.* 39, 355–366.
- Martínez, B., Sánchez, Y., Urra, K., Daymara, Y., Burgos, J.L., 2012. Hormona de la oscuridad. *Rev Latinoamer Patol Clin* 59, 222–232.
- Masana, M.I., Dubocovich, M.L., 2001. Melatonin Receptor Signaling: Finding the Path Through the Dark. *Sci. STKE* 2001, pe39–pe39.
- McGuire, N.L., Kangas, K., Bentley, G.E., 2011. Effects of melatonin on peripheral reproductive function: regulation of testicular GnIH and testosterone. *Endocrinology* 152, 3461–3470.
- Misztal, T., Romanowicz, K., Barcikowski, B., 2002. Effect of melatonin on daily LH secretion in intact and ovariectomized ewes during the breeding season. *Anim. Reprod. Sci.* 69, 187–198.
- Mortimer, D., 1994. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reprod. Fertil. Dev.* 6, 25–31.
- Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F., Beauverger, P., Henlin, J.M., Lefoulon, F., Fauchere, J.L., Delagrangé, P., Canet, E., Boutin, J.A., 2000. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem.* 275, 31311–31317.
- Ollero, M., Muiño-Blanco, T., López-Pérez, M.J., Cebrián-Pérez, J.A., 1996. Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *Int. J. Androl.* 19, 287–292.
- Ortiz, A., Espino, J., Bejarano, I., Lozano, G.M., Monllor, F., García, J.F., Pariente, J.A., Rodríguez, A.B., 2011. High endogenous melatonin concentrations enhance sperm

- quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility. *J. Pineal Res.* 50, 132–139.
- Peña, C., Rincon, J., Pedreanez, A., Viera, N., Mosquera, J., 2007. Chemotactic effect of melatonin on leukocytes. *J. Pineal Res.* 43, 263–269.
- Peña Delgado, V., Pérez Pe, R., Casao Gascón, A., 2018. Efecto de la melatonina sobre la Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina proteín-kinasa II de los espermatozoides ovinos (Trabajo Fin de Grado). Universidad de Zaragoza.
- Pérez-Pé, R., Grasa, P., Fernández-Juan, M., Peleato, M.L., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T., 2002. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 61, 226–233.
- QIAGEN - GeneGlobe Pathways - Melatonin Signaling [WWW Document], n.d. URL <https://www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways/pathway-details/?pwid=288> (accessed 9.10.18).
- Reiter, R.J., 1991. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 12, 151–180.
- Reppert, S.M., 1997. Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Rhythms* 12, 528–531.
- Rosa, H.J.D., Bryant, M.J., 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research* 48, 155–171.
- Rotfeld, H., Hillman, P., Ickowicz, D., Breitbart, H., 2014. PKA and CaMKII mediate PI3K activation in bovine sperm by inhibition of the PKC/PP1 cascade. *Reproduction* 147, 347–356.
- Schlingmann, K., Michaut, M.A., McElwee, J.L., Wolff, C.A., Travis, A.J., Turner, R.M., 2007. Calmodulin and CaMKII in the sperm principal piece: evidence for a motility-related calcium/calmodulin pathway. *J. Androl.* 28, 706–716. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.001669>
- Shabtay, O., Breitbart, H., 2016. CaMKII prevents spontaneous acrosomal exocytosis in sperm through induction of actin polymerization. *Dev. Biol.* 415, 64–74.
- Shirakawa, H., Ogino, N., 1987. Novel activity of melatonin. Its chemotactic effect on retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic Res.* 19, 226–229.
- Slominski, A., Tobin, D.J., Zmijewski, M.A., Wortsman, J., Paus, R., 2008. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol. Metab.* 19, 17–24.
- Smith, M.D., Baker, P.C., 1974. The maturation of melatonin synthesis in the lateral eyes of the mouse. *Comparative and General Pharmacology* 5, 275–277.
- Swaminathan, P.D., Purohit, A., Soni, S., Voigt, N., Singh, M.V., Glukhov, A.V., Gao, Z., He, B.J., Luczak, E.D., Joiner, M.A., Kutschke, W., Yang, J., Donahue, J.K., Weiss, R.M., Grumbach, I.M., Ogawa, M., Chen, P.-S., Efimov, I., Dobrev, D., Mohler, P.J., Hund,



- T.J., Anderson, M.E., 2011. Oxidized CaMKII causes cardiac sinus node dysfunction in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 3277–3288.
- Tan, D.-X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Paredes, S.D., Korkmaz, A., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Fuentes-Broto, L., Reiter, R.J., 2010. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev Camb Philos Soc* 85, 607–623.
- Teodoro, B.G., Baraldi, F.G., Sampaio, I.H., Bomfim, L.H.M., Queiroz, A.L., Passos, M.A., Carneiro, E.M., Alberici, L.C., Gomis, R., Amaral, F.G., Cipolla-Neto, J., Araújo, M.B., Lima, T., Akira Uyemura, S., Silveira, L.R., Vieira, E., 2014. Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and insulin resistance in rat skeletal muscle. *J. Pineal Res.* 57, 155–167.
- Toledo, F.D., Pérez, L.M., Basiglio, C.L., Ochoa, J.E., Sanchez Pozzi, E.J., Roma, M.G., 2014. The  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin- $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II signaling pathway is involved in oxidative stress-induced mitochondrial permeability transition and apoptosis in isolated rat hepatocytes. *Arch. Toxicol.* 88, 1695–1709.
- Vadnais, M.L., Galantino-Homer, H.L., Althouse, G.C., 2007. Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. *Arch. Androl.* 53, 109–123.
- Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P., Kopf, G.S., 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121, 1129–1137.
- Ward, C.R., Storey, B.T., 1984. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev. Biol.* 104, 287–296.
- Wassarman, P.M., 1999. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96, 175–183.
- Wei, J.-Y., Li, W.-M., Zhou, L.-L., Lu, Q.-N., He, W., 2015. Melatonin induces apoptosis of colorectal cancer cells through HDAC4 nuclear import mediated by CaMKII inactivation. *J. Pineal Res.* 58, 429–438.
- White, D.R., Aitken, R.J., 1989. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res* 22, 163–177.
- Yanagimachi, R., 1994a. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2, 371–372.
- Yanagimachi R, 1994b. Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction* 189–317.
- Yu, H., Dickson, E.J., Jung, S.-R., Koh, D.-S., Hille, B., 2016. High membrane permeability for melatonin. *J Gen Physiol* 147, 63–76.
- Yung, L.Y., Tsim, S.T., Wong, Y.H., 1995. Stimulation of cAMP accumulation by the cloned *Xenopus* melatonin receptor through  $G_i$  and  $G_z$  proteins. *FEBS Lett.* 372, 99–102.

- Zhang, Y.-L., Han, Z.-F., Sun, Y.-P., 2016. Structure-based identification of CaMKII $\alpha$ -interacting MUPP1 PDZ domains and rational design of peptide ligands to target such interaction in human fertilization. *Amino Acids* 48, 1509–1521.
- Zhu, Z., Li, R., Lv, Y., Zeng, W., 2019. Melatonin protects rabbit spermatozoa from cryo-damage via decreasing oxidative stress. *Cryobiology* 88, 1–8.