



Universidad  
Zaragoza



Facultad de Ciencias  
Universidad Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

Efecto de la melatonina sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina  
proteín-kinasa II de los espermatozoides ovinos

Effect of melatonin on  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin protein-kinase  
II of ram spermatozoa

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).

Septiembre de 2018





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

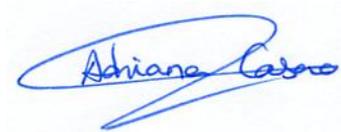
**INFORMAN:**

Que la alumna Victoria Peña Delgado, ha realizado bajo nuestra dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin de Grado titulado "Efecto de la melatonina sobre la Ca<sup>2+</sup>/calmodulina protein-kinasa II de los espermatozoides ovinos". Este trabajo cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFG, 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 2018.



**Rosaura Pérez Pe**



**Adriana Casao Gascón**



## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las profesoras Rosaura Pérez y Adriana Casao; gracias por haberme ofrecido la posibilidad de trabajar en tan maravilloso grupo y por todo lo que he aprendido con y de vosotras. Rosaura, siempre con la puerta del despacho abierta, me has recibido con los brazos abiertos cada vez que tenía algo que enseñarte; Adriana, también siempre con la puerta del despacho abierta, has acudido en mi ayuda cada vez que lo he necesitado y has solucionado todas mis dudas cada vez que tocaba hacer un Western-blot, todo ello sin perder la sonrisa.

También quiero dar las gracias a Pepín y a Tere, siempre atentos y risueños, me acogisteis con mucho cariño, y cada vez que os paseáis por el laboratorio y decís: <<Buenos días, chicas>> me alegráis las mañanas, por muy duras que hayan sido.

Por supuesto, no me olvido de Melissa, Sara y Silvia, gracias por haber permanecido a mi lado desde que llegué, allá por el lejano julio de 2017 como una chica de prácticas. Siempre me habéis supervisado y ayudado, siendo un poco como mis hermanas mayores. En verdad os digo que este año me habéis visto crecer, tanto en lo académico como en lo personal.

Por último, quisiera dar gracias a mi pareja, Adrián, a mis padres, mis abuelos, mis tíos y demás familia, por el apoyo mostrado a lo largo de todos estos años, a mi profesor del *cole* Antonio Martín por haberme inculcado la pasión por la ciencia hace ya algún tiempo, y a mis amigos, tanto los de dentro como los de fuera de la universidad, por haber sido mi pilar, mi fuente de ánimo en los momentos adversos desde que entré en la carrera, por haberos interesado por este trabajo desde el primer momento y por todos los buenos ratos compartidos.

En definitiva, a todos vosotros, muchas gracias, de corazón.

Septiembre de 2018

Victoria Peña Delgado



## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
ABSTRACT.....	2
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
2.1 LA MELATONINA Y LA REPRODUCCIÓN.....	3
2.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA MELATONINA EN LAS CÉLULAS.....	4
2.3 LA ENZIMA CALCIO/CALMODULINA PROTEÍN-QUINASA II .....	6
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>9</b>
4.1 PROCESADO DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS .....	9
4.1.1 Obtención de muestras seminales .....	9
4.1.2 Método de <i>swim-up</i> /dextrano .....	9
4.1.3 Capacitación <i>in vitro</i> .....	10
4.2 EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS .....	11
4.2.1 Análisis de la motilidad espermática.....	11
4.2.2 Estudio de la viabilidad celular (integridad de la membrana plasmática) .....	11
4.2.3 Evaluación del estado de capacitación.....	12
4.2.4 Estudio de los niveles intracelulares de calcio.....	13
4.3 DETECCIÓN DEL COMPLEJO CALCIO/CALMODULINA PROTEÍN-QUINASA II POR WESTERN BLOTTING .....	14
4.3.1 Extracción de proteínas espermáticas.....	14
4.3.2 SDS-PAGE e Inmunoblotting .....	14
4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	15
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>16</b>
5.1 EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LOS NIVELES Y DISTRIBUCIÓN DEL CALCIO EN ESPERMATOZOIDES OVINOS INCUBADOS EN CONDICIONES CAPACITANTES.....	16
5.2 IDENTIFICACIÓN DE LA ENZIMA CAMKII EN EL ESPERMATOZOIDE OVINO .....	19
5.3 EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LOS NIVELES DE CAMKII Y CAMKII $\alpha$ EN EL ESPERMATOZOIDE OVINO INCUBADO EN CONDICIONES CAPACITANTES .....	21
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>22</b>
CONCLUSIONS.....	22
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>23</b>



## **1. RESUMEN**

La melatonina es una hormona que se sintetiza principalmente en la glándula pineal y que regula muchos procesos fisiológicos, como la reproducción estacional. A nivel celular es capaz de aumentar los niveles de calcio intracelular en células somáticas y unirse a la proteína calmodulina. Esto inhibe la formación del complejo calcio/calmodulina, que regula la actividad de la enzima calcio/calmodulina proteína-quinasa II (CaMKII).

Dado que tanto el aumento de los niveles de calcio como la actividad de CaMKII están implicados en la capacitación espermática (conjunto de cambios que debe sufrir un espermatozoide para adquirir capacidad fecundante), en el presente trabajo se planteó la hipótesis de que la melatonina podría modular la capacitación espermática ovina a través de la enzima CaMKII. Así, los objetivos de este estudio fueron investigar el efecto de la melatonina sobre los niveles y distribución del calcio intracelular, identificar la presencia de la proteína CaMKII en el espermatozoide ovino y evaluar los cambios en la concentración de la misma en espermatozoides ovinos incubados en condiciones capacitantes.

Para ello, espermatozoides ovinos seleccionados por *swim-up* se incubaron durante 3 horas en condiciones capacitantes (39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>) en medio TALP (control), y con dos concentraciones de melatonina (100 pM y 1 μM). Tras la incubación se evaluó la motilidad, viabilidad, y estado de capacitación de las muestras. Los cambios en la concentración y distribución de calcio intracelular se evaluaron mediante citometría de flujo con las sondas Fluo-4 AM y Rhod-5N AM. Finalmente, la identificación y cuantificación de CaMKII se realizó mediante Western Blot en proteínas espermáticas extraídas tras la capacitación *in vitro*.

Los resultados obtenidos indican que la melatonina a una concentración 1 μM es capaz de aumentar el porcentaje de espermatozoides vivos con altos niveles de calcio tras tres horas de incubación en condiciones capacitantes, sin afectar negativamente a la funcionalidad espermática. Además, la presencia de melatonina en el medio parece aumentar los niveles de CaMKII y de una de sus isoformas (CaMKII $\alpha$ ) en el espermatozoide de morueco.

En conclusión, este trabajo sugiere que la melatonina podría regular el proceso de capacitación espermática aumentando los niveles de la enzima CaMKII, aunque las implicaciones que puede tener esto en su activación o actividad todavía no están esclarecidas.

## **ABSTRACT**

Melatonin is a hormone synthesized principally by the pineal gland that regulates many physiological processes, such as seasonal reproduction. At the cellular level, melatonin can increase intracellular calcium levels in somatic cells, and it can also bind to calmodulin. This binding inhibits the formation of the calcium/calmodulin complex, which regulates the activity of calcium/calmodulin protein-kinase II (CaMKII).

Since both the increase of calcium levels and CaMKII activity are involved in sperm capacitation (set of changes required for sperm to gain fertilizing capacity), we hypothesized that melatonin could modulate ovine sperm capacitation through the CaMKII enzyme. Therefore, this study aimed to investigate the effect of melatonin on intracellular calcium levels and distribution, to identify the presence of CaMKII protein in ram spermatozoa, and to evaluate the changes in CaMKII concentration in ram spermatozoa incubated under capacitating conditions.

For this purpose, ovine spermatozoa, selected by a swim-up/dextran procedure, were incubated for three hours under capacitating conditions (39 °C and 5% CO<sub>2</sub>) in TALP medium (control) and with two different concentrations of melatonin (100 pM y 1 μM). After incubation, motility, viability and capacitation state of the sperm samples were evaluated. Changes in intracellular calcium levels and distribution were evaluated by flow cytometry with Fluo-4 AM and Rhod-5N AM probes. Finally, CaMKII was identified and quantified by Western Blot analysis of ram sperm proteins extracted after *in vitro* capacitation.

The obtained results indicated that 1 μM melatonin can increase the percentage of live spermatozoa with high calcium levels after three hours under capacitating conditions, with no negative effects on sperm functionality. Moreover, melatonin seems to increase CaMKII and CaMKIIα (an isoform of CaMKII) levels in ram spermatozoa.

In conclusion, this work suggests that melatonin could regulate sperm capacitation by increasing CaMKII levels, although the melatonin implication on CaMKII activation or activity is still not clear.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 LA MELATONINA Y LA REPRODUCCIÓN**

La melatonina es una hormona sintetizada principalmente durante la noche en la glándula pineal a partir del aminoácido triptófano, aunque también se produce a lo largo del día en otros tejidos extra-pineales, como el ojo (Smith and Baker, 1974), la piel (Slominski *et al.*, 2008), el tracto gastro-intestinal (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).

Esta hormona está implicada en la regulación de muchos procesos fisiológicos y presenta un mecanismo de acción muy complejo. Por una parte, participa en la regulación de los ritmos circadianos y circanuales, y de la reproducción en mamíferos de reproducción estacional. Esta molécula también destaca por su papel antioxidante, evitando el daño oxidativo en macromoléculas, células y tejidos (Tan *et al.*, 2010). Además, a la melatonina también se le ha asignado un importante papel como molécula quimioatrayente en leucocitos (Peña *et al.*, 2007) y en células del epitelio pigmentario retinal (Shirakawa and Ogino, 1987), y también como modulador del citoesqueleto (Benítez-King, 2006).

Respecto a su participación en los procesos reproductivos, la melatonina regula la estacionalidad reproductiva a través del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (McGuire *et al.*, 2011). En el caso de la especie ovina, que presenta una reproducción estacional muy marcada, con un período reproductivo en otoño e invierno y otro no reproductivo en primavera y verano, la melatonina actúa como estimuladora de la reproducción. Fueron Ebling y Hastings (1992) los primeros en identificar las bases del mecanismo de liberación de esta hormona: 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, siendo esta secreción proporcional a la duración de la noche. 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 que son, precisamente, las estaciones en las que la especie ovina presenta actividad reproductiva.

Esta secreción de melatonina nocturna regula la liberación pulsátil de GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) en el hipotálamo, lo que a su vez regula la secreción de LH (hormona luteinizante), responsable de la actividad ovárica en la hembra y de la producción de espermatozoides en el macho (Malpoux *et al.*, 1999, 1997; Misztal *et al.*, 2002).

En los machos de algunos mamíferos, la melatonina, además de actuar sobre el eje hipotálamo-hipofisario-testicular, también está presente en el plasma seminal (Casao *et al.*, 2010a), donde ejerce un efecto directo sobre los espermatozoides. Además, también se haya presente en el tracto reproductor femenino, formando parte del fluido oviductal (Brzezinski *et al.*, 1987), regulando posiblemente la funcionalidad espermática. Así, se ha descrito que la incubación de los espermatozoides con melatonina mejora la motilidad en muestras seminales humanas (Ortiz *et al.*, 2011), y promueve la hiperactivación espermática (el cambio en el patrón de motilidad que sufren los espermatozoides para poder llevar a cabo la fecundación) en hámster (Fujinoki, 2008) y la capacitación (conjunto de cambios

bioquímicos y biofísicos que debe sufrir un espermatozoide para adquirir capacidad fecundante) en búfalo (Di Francesco *et al.*, 2010).

En la especie ovina, nuestro grupo de investigación ha demostrado que esta hormona ejerce efectos beneficiosos en los espermatozoides, como la disminución de marcadores de apoptosis o el aumento de la tasa de fertilidad, y que regula el proceso de capacitación, ya que tiene efectos capacitantes o descapacitantes en función de su concentración (Casao *et al.*, 2010b).

## **2.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA MELATONINA EN LAS CÉLULAS**

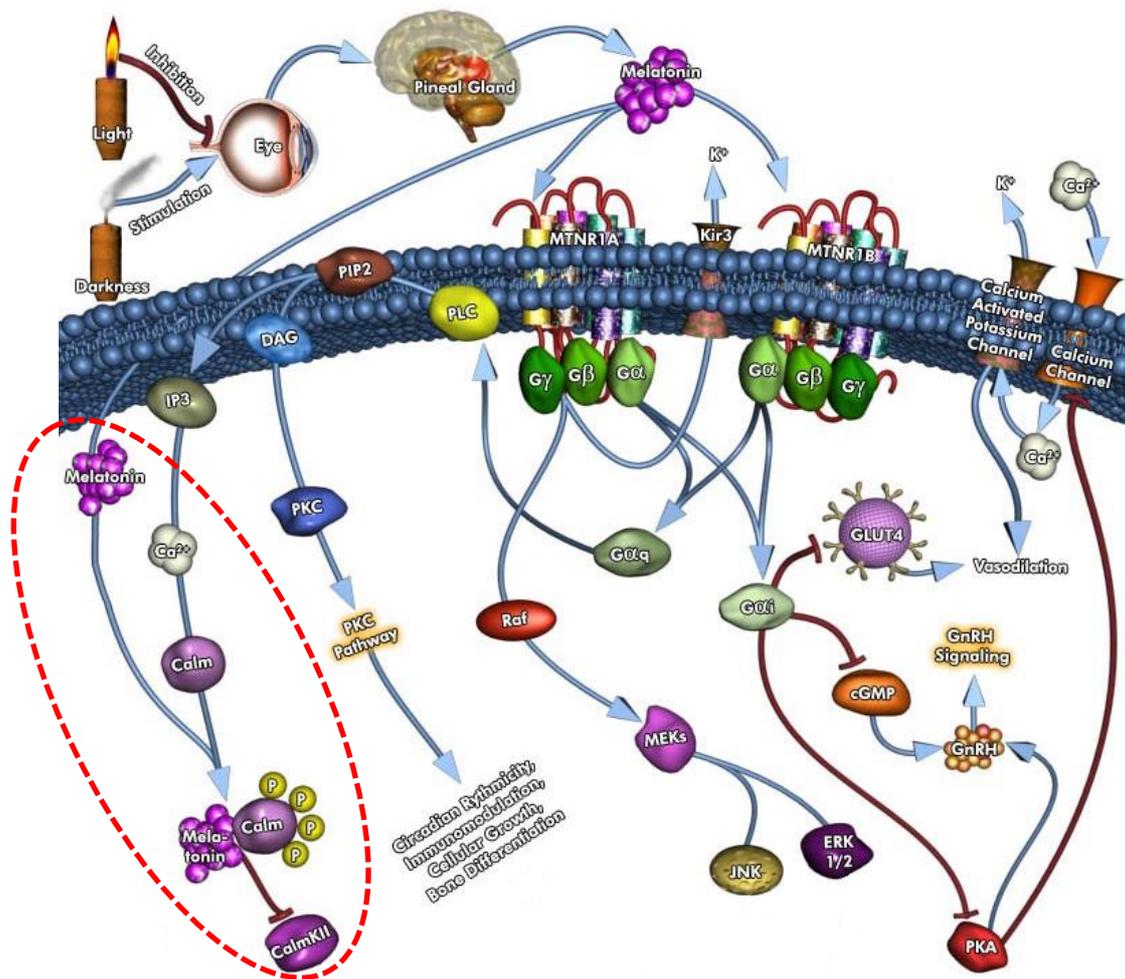
La melatonina puede ejercer muchas de sus funciones, a excepción de su actividad antioxidante, a través de su interacción con receptores específicos que pertenecen a la superfamilia de receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs, del inglés *G-protein coupled receptors*, Reppert, 1997). En mamíferos se han descrito dos receptores: MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>, mientras que un tercer receptor, MT<sub>3</sub>, está presente en aves, anfibios y peces (Ebisawa *et al.*, 1994). Además, debido a su naturaleza lipofílica, la melatonina también es capaz de atravesar la membrana plasmática directamente. Una vez en el interior de la célula, la melatonina puede unirse a proteínas como la calmodulina (Benítez-King *et al.*, 1993) y la calreticulina (Macías *et al.*, 2003), ambas proteínas de unión a calcio. Su unión a la calmodulina estaría relacionada con el mecanismo de regulación del citoesqueleto (Benítez-King *et al.*, 1993), mientras que su unión a calreticulina se ha asociado con sus efectos sobre el núcleo celular (Macías *et al.*, 2003).

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.*, 2012a), así como el posible papel del receptor MT<sub>2</sub> en la capacitación espermática (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016) En células somáticas, la unión de melatonina a estos receptores provoca una cascada de señalización mediada por segundos mensajeros, que varía según el tejido y la especie estudiados (Luchetti *et al.*, 2010). Muchas de esas rutas de transducción de señales son las mismas que participan en muchos de los procesos que sufre el espermatozoide en el tracto reproductor femenino (Grasa *et al.*, 2006), tales como la hiperactivación, la capacitación y la reacción acrosómica.

En células somáticas, como consecuencia de la activación de estas rutas de transducción por la acción de la melatonina, se produce un aumento del calcio intracelular (Kumari and Dash, 2011; Sjöblom *et al.*, 2003). En espermatozoides, éste es un fenómeno crucial para los procesos de capacitación, la reacción acrosómica (Wassarman, 1999) y la actividad del flagelo (Bedu-Addo *et al.*, 2008). En estas células, ese calcio puede proceder bien del exterior, por la apertura de canales de calcio presentes en la membrana, o bien de reservorios intracelulares, como la envoltura nuclear redundante (ENR), una estructura situada en la base del flagelo compuesta por cisternas membranosas que presentan receptores para IP<sub>3</sub> y para calreticulina (Ho and Suarez, 2003), que, como ya se ha comentado, tiene capacidad de unión a melatonina. De este modo, se puede conjeturar que la melatonina podría regular el aumento de calcio intracelular en el espermatozoide de manera directa, tras su unión a calreticulina, o bien por la ruta de la fosfolipasa C (PLC), en la que se produce IP<sub>3</sub>.

Además, la melatonina, atravesando directamente la membrana plasmática, también sería capaz de unirse a la calmodulina citoplásmica. La calmodulina es una proteína que,

tras su unión al calcio, regula la actividad de la enzima calcio/calmodulina proteína-quinasa II (CaMKII), enzima implicada en la hiperactivación (Ignatz and Suarez, 2005) y en la capacitación espermática (Schlingmann *et al.*, 2007).



**Figura 1:** 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.

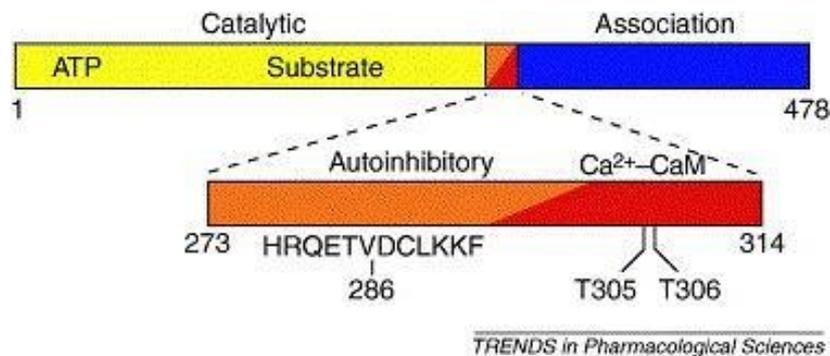
En células somáticas, la melatonina es capaz de inhibir *in vitro* la actividad de la CaMKII y su autofosforilación, al unirse con gran afinidad a la calmodulina, impidiendo así su unión al calcio y la formación del complejo  $Ca^{2+}$ /calmodulina, necesario para activar a la CaMKII (Benítez-King *et al.*, 1996). Sin embargo, *in vivo* esta acción sólo se ha observado en tratamientos conjuntos de melatonina con sustancias que aumentan los niveles de AMPc, como IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) o foskolina (Bazwinsky-Wutschke *et al.*, 2014). Hasta la fecha se desconoce si la unión de la melatonina a la calmodulina inhibiría la activación de esta enzima en espermatozoides por un mecanismo competitivo. Tampoco debemos olvidar la acción de la melatonina sobre la liberación de calcio mencionada anteriormente, que también podría regular la activación de la CaMKII. Por tanto, el mecanismo de acción de la melatonina sobre la CaMKII en espermatozoides puede ser bastante complejo, y, hasta el momento, desconocido.

## 2.3 LA ENZIMA CALCIO/CALMODULINA PROTEÍN-QUINASA II

La denominada calcio/calmodulina proteín-quinasa II (CaMKII, o CAMK2), es una serina/treonina quinasa que participa, además de en la capacitación espermática, en importantes procesos neuronales relacionados con el aprendizaje y la memoria (Silva *et al.*, 1992) y otros como la regulación de la expresión de enzimas oxidativas, de la biogénesis mitocondrial y de la expresión de proteínas miofibrilares concretas (Chin, 2004).

Esta quinasa es en realidad una familia de isoformas derivadas de cuatro genes altamente relacionados ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) (Hudmon and Schulman, 2002). Cada RNA mensajero producido a partir de estos cuatro genes puede sufrir *splicing* alternativo, lo que hace que existan muchas isozimas para cada gen. A pesar de la gran variedad de isoformas que existen, la mayoría de holoenzimas CaMKII son multímeros formados por la asociación de aproximadamente unas 12 subunidades (Ma *et al.*, 2015), y cada una de ellas con la siguiente estructura:

- Un dominio catalítico-regulador.
- Un segmento de asociación, que permite la formación de multímeros.
- Un segmento que une el dominio catalítico con el de asociación.



**Figura 2:** Modelo linealizado de la estructura de CaMKII, donde pueden observarse sus tres segmentos. En la región reguladora, se destacan el dominio de unión al complejo calcio/ calmodulina y el dominio de inhibición. Tomado de Merrill *et al.*, 2005.

Algunas isoformas se han encontrado en testículos de ratón (Hudmon and Schulman, 2002) y de toro (Ignatz and Suarez, 2005). Y en la especie ovina, se han identificado los cuatro genes de CaMKII (CAMK2A, CAMK2B, CAMK2D y CAMK2G). Sin embargo, las secuencias de aminoácidos de las diferentes isoformas de CaMKII que se pueden obtener a partir de estos cuatro genes en ovino tan solo están predichas, y muchas de ellas están sin revisar.

En cuanto a su función en las células espermáticas, esta quinasa juega un papel relevante en la motilidad de los espermatozoides de mamíferos (Schlingmann *et al.*, 2007), así como en la hiperactivación (Ignatz and Suarez, 2005) y en la fosforilación de proteínas (González-Fernández *et al.*, 2013), procesos clave de la capacitación espermática. En espermatozoides de ratón se ha comprobado que la proteína CaMKII $\beta$  es diana del complejo Ca<sup>2+</sup>/calmodulina y co-localiza con él en la pieza principal del flagelo del espermatozoide (Schlingmann *et al.*, 2007). En bovino también se ha demostrado que la

CaMKII previene la reacción acrosómica espontánea mediante la polimerización de la actina (Rotfeld *et al.*, 2014; Shabtay and Breitbart, 2016). Y en espermatozoides humanos se ha demostrado que esta acción está mediada concretamente por la isoforma  $\alpha$ , (CaMKII $\alpha$ ) (Zhang *et al.*, 2016).

Para poder llevar a cabo estas funciones, la CaMKII debe activarse mediante fosforilación y/o oxidación en algunos de sus residuos. En un principio, este proceso requiere su unión al complejo Ca<sup>2+</sup>/calmodulina, pero se ha demostrado que cuando aumentan los niveles de calcio intracelulares, la CaMKII sufre una autofosforilación en su residuo Thr287 que la mantiene activa sin que sea necesario que esté unida este complejo. Por otro lado, también pueden oxidarse los residuos Met281 y Met282 del dominio regulador, lo que parece que también evita que la CaMKII se desactive una vez se ha liberado del complejo (Erickson *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado en el espermatozoide bovino que la activación de esta quinasa depende a su vez de otras, como la PKA (proteína quinasa A) y las SFK (familia de las Src quinasa) (Rotfeld *et al.*, 2014). En estos procesos, la concentración de ROS (especies reactivas de oxígeno) parece ser crucial y se ha sugerido que unos niveles altos de ROS podrían activar a la Adenil Ciclasa para aumentar los niveles de AMPc, lo que activaría a la PKA, y con ello, a la CaMKII; por otro lado, niveles altos de ROS también serían importantes para la oxidación de la CaMKII (Shabtay and Breitbart, 2016).

Por tanto, dado que la melatonina parece regular la actividad de CaMKII en células somáticas, y que en los espermatozoides CaMKII está relacionada con la capacitación espermática, podríamos hipotetizar que la melatonina podría ejercer sus efectos moduladores de la capacitación a través de la enzima CaMKII.

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La melatonina es una hormona implicada en la regulación de muchos procesos fisiológicos, entre ellos la reproducción estacional en algunos mamíferos a través del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (McGuire *et al.*, 2011); pero la melatonina también puede actuar directamente sobre los gametos (Casao *et al.*, 2010a).

La melatonina es capaz de regular la capacitación espermática, o conjunto de cambios que debe sufrir un espermatozoide para adquirir capacidad fecundante, (Yanagimachi, 1994), mediante su unión a receptores específicos en la membrana del espermatozoide (Casao *et al.*, 2012a) (Casao *et al.*, 2012b). Pero la melatonina, al menos en células somáticas, también es capaz de atravesar directamente la membrana plasmática y unirse a proteínas de unión a calcio como la calmodulina (Benítez-King *et al.*, 1993). Esta unión afectaría a la formación del complejo  $Ca^{2+}$ /calmodulina, lo que tendría un efecto inhibitorio sobre enzimas como la  $Ca^{2+}$ /calmodulina proteín-quinasa II (CaMKII) (Benítez-King *et al.*, 1996) además de incrementar los niveles de calcio libre intracelular (Kumari and Dash, 2011; Sjöblom *et al.*, 2003). Para que se produzca la capacitación espermática es imprescindible que haya un aumento de los niveles de calcio intracelular, y además se ha demostrado la implicación de la enzima CaMKII en este proceso (Schlingmann *et al.*, 2007).

Por tanto, en base a los antecedentes presentados, en el presente Trabajo Fin de Grado se planteó la siguiente **hipótesis**: la melatonina podría modular la capacitación espermática ovina a través de cambios en los niveles intracelulares de calcio, mediante la regulación del complejo  $Ca^{2+}$ /calmodulina y la enzima  $Ca^{2+}$ /calmodulina proteín-quinasa II.

De este modo, el **objetivo principal** de este trabajo consistió en evaluar el efecto de la melatonina sobre los niveles y distribución del calcio intracelular y los niveles de la  $Ca^{2+}$ /calmodulina proteín-quinasa II (CaMKII) en espermatozoides ovinos incubados en condiciones capacitantes.

Y, para ello, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Evaluar el efecto de diferentes concentraciones fisiológicas de melatonina añadidas a los espermatozoides ovinos durante la capacitación *in vitro* sobre los niveles y la distribución del calcio intracelular.
2. Identificar la presencia de CaMKII en espermatozoides ovinos
3. Analizar los cambios en la concentración de la proteína CaMKII debidos a la adición de la melatonina a diferentes concentraciones fisiológicas durante la capacitación *in vitro*.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

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

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

Para realizar los experimentos se utilizó semen obtenido 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 estos 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 los 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 Método de *swim-up* / dextrano.**

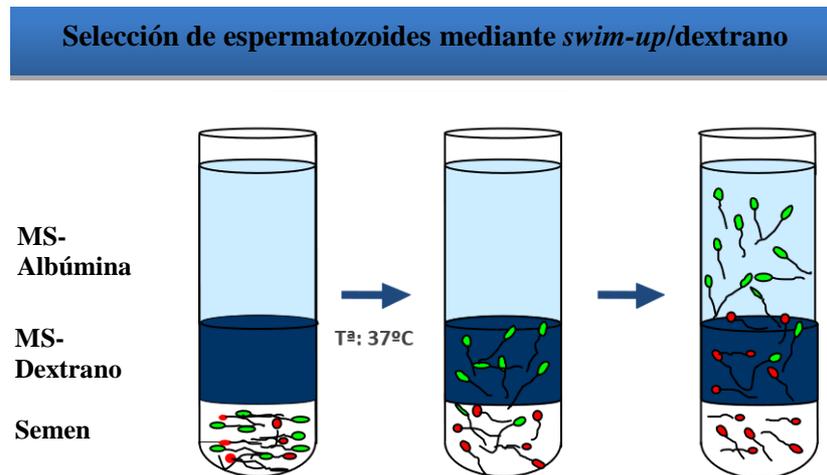
Se utilizó el método de *swim-up* / dextrano con el fin de eliminar el plasma seminal y/o restos celulares de las muestras frescas obtenidas. La eliminación del plasma seminal resulta conveniente debido al efecto perjudicial que éste ejerce en el mantenimiento de las muestras espermáticas (Mortimer, 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 (1993), pero se modificaron tanto algunos de los pasos del proceso como la composición del medio 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 móviles 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 del mismo 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. A continuación se añadieron muy lentamente 1,5 ml de MS-Albúmina (5 mg de albúmina sérica bovina/ml MS) sobre la capa de dextrano, tal y como se aprecia en la figura 3. La adición de albúmina en la capa superior evita la aglutinación espermática. Se dejó incubar a 37 °C en posición vertical

durante 15 minutos, seguidamente se retiraron 750  $\mu$ l de la fase superior (a esta fracción se le designó como primer sobrenadante, y fue desechada al contener restos de plasma seminal) y posteriormente se añadieron 750  $\mu$ l de MS-Albúmina. Pasados otros 15 minutos, se retiraron otros 750  $\mu$ l de la fase superior, se recogieron en otro tubo, y se volvieron a añadir 750  $\mu$ l de MS-Albúmina. El proceso se repitió otras dos veces consecutivas obteniéndose al final un total de tres sobrenadantes, que fueron mezclados en un mismo tubo para proceder a trabajar con ellos.



**Figura 3:** Esquema del proceso de selección espermática mediante el método *swim-up* /dextrano

#### 4.1.3 Capacitación *in vitro*

Para inducir la capacitación *in vitro*, los espermatozoides previamente seleccionados mediante *swim-up*, se diluyeron a una concentración de  $1,6 \times 10^8$  células/ml en medio TALP completo (J Parrish *et al.*, 1988), compuesto por NaCl 100 mM, KCl 3,1 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,3 mM,  $\text{CaCl}_2$  3 mM,  $\text{MgCl}_2$  0,4 mM, HEPES 10 mM, glucosa 5 mM, piruvato sódico 1 mM y lactato sódico 21,6 mM, albúmina sérica bovina 5 mg/ml (p/v) y pH ajustado a 7,2.

Las muestras se incubaron en una estufa a 39 °C, con un 5 % de  $\text{CO}_2$  y un 100 % de humedad, durante tres horas. Para valorar el efecto de la melatonina, ésta se disolvió en PBS (NaCl 3,13 g/l, KCl 0,2 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,44 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,24 g/l, pH 7,4) con dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadió al inicio de la capacitación a una concentración final de 1  $\mu$ M o 100 pM, respectivamente. Para tener en cuenta un posible efecto del DMSO, este se añadió a la misma concentración (0,1%) a la muestra control sin melatonina.

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.
- **Mel 100 pM:** muestra incubada en condiciones capacitantes en medio TALP junto con melatonina a una concentración de 100 pM.
- **Mel 1  $\mu$ M:** muestra incubada en condiciones capacitantes en medio TALP junto con melatonina a una concentración de 1  $\mu$ M.

## 4.2 EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS

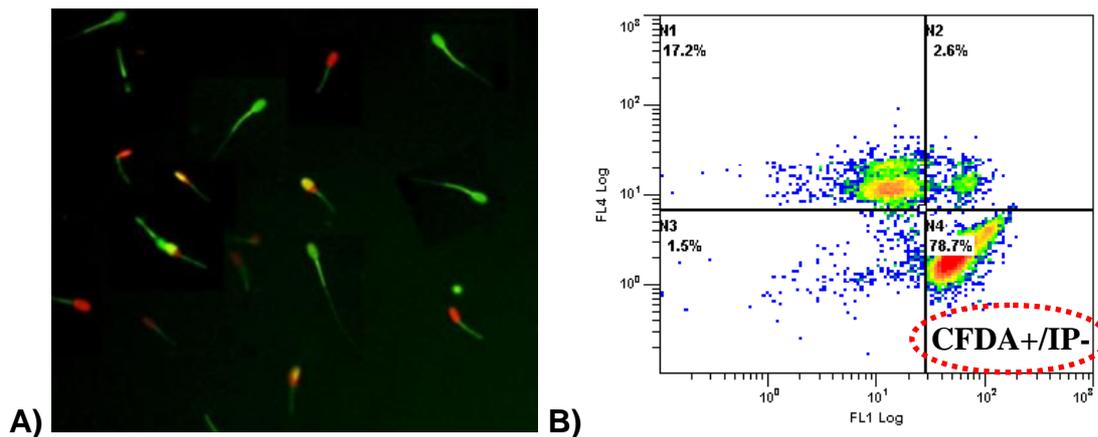
### 4.2.1 Análisis de la motilidad espermática

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*), mediante el programa ISAS 1.0.4. (*Integrated Semen Analysis System*, Proiser SL, Valencia, España). Para ello se hizo una dilución (1:100 para las muestras frescas, 1:10 para las seleccionadas con el método del *swim-up*) 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 en un portaobjetos y se evaluó en un microscopio de contraste de fases con objetivo 10x conectado a un ordenador. Se analizaron al menos cinco campos por gota. El programa ISAS 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, 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 en función de la integridad de su membrana plasmática. 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 (Fig 4.A).

Así, 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, USA), 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 PI-/CFDA+ como viables, tal y como se muestra en la figura 4.B.



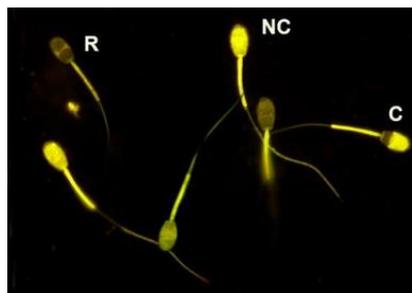
**Figura 4:** **A)** Imagen representativa de la doble tinción de los espermatozoides ovinos con ioduro de propido y diacetato de carboxifluoresceína, evaluada mediante microscopía de fluorescencia con filtro B-2A (filtro de excitación 450-490 nm) y aumento 400x **B)** Diagrama representativo de la integridad de membrana evaluada por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

### 4.2.3 Evaluación del estado de capacitación

La determinación del estado de capacitación 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 capacitado, capacitado y que ha sufrido la reacción acrosómica (Gillan et al., 1997). En este estudio se utilizó una versión modificada del ensayo descrito por Ward y Storey (Ward and Storey, 1984) y validada para semen ovino por nuestro grupo de investigación (Grasa *et al.*, 2006).

La solución de CTC se preparó el mismo día del experimento a una concentración 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  $^{\circ}\text{C}$  en oscuridad, se depositó una gota de 6  $\mu\text{l}$  de cada mezcla en un portaobjetos y se le añadieron 4  $\mu\text{l}$  de trietilendiamina (DABCO Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) para conservar la fluorescencia. Se colocó el cubreobjetos y se selló la preparación con esmalte transparente, siempre realizando todos estos procesos 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 (Fig. 5): 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).



**Figura 5:** Espermatozoides ovinos teñidos con CTC y visualizados con microscopía de fluorescencia con filtro V-2A y 1000x. Se pueden distinguir espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (C) y reaccionados (R).

#### 4.2.4 Estudio de los niveles intracelulares de calcio por citometría de flujo

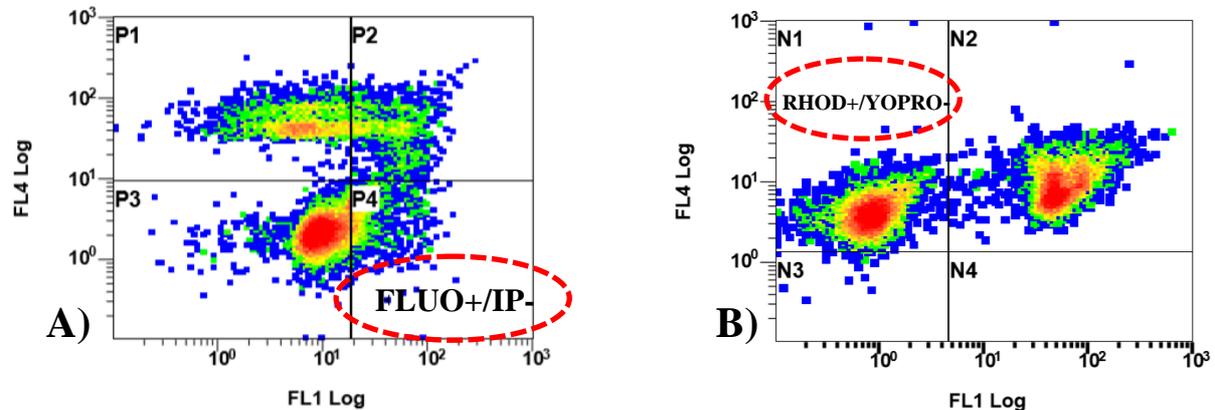
El calcio intracelular se valoró en las muestras seleccionadas por *swim-up* y en las muestras capacitadas, a la hora y a las 3 horas de incubación *in vitro* en condiciones capacitantes. Para ello se utilizaron dos tinciones:

Para valorar **el calcio intracelular libre** se utilizó la sonda fluorescente Fluo-4 AM (Invitrogen, Thermo Fisher, Eugene, Oregon, USA). Cuando Fluo-4 AM penetra en el interior celular es hidrolizado por las esterasas allí presentes para generar Fluo-4, que presenta gran afinidad por el ión calcio, y proporciona fluorescencia verde (Gee *et al.*, 2000). Para esta tinción se añadieron de 3  $\mu\text{l}$  de la sonda fluorescente Fluo-4 AM, y 2  $\mu\text{l}$  de yoduro de propidio (PI) a las muestras espermáticas diluidas a una concentración final de  $1,4 \times 10^7$  espermatozoides/ml. Tras una incubación de 15 minutos a 37 °C, las muestras se fijaron con 4  $\mu\text{l}$  de formaldehído.

El análisis se realizó en un citómetro FC 500 (Beckman Coulter, Fullerton, California, USA) equipado con un láser de argón a 484 nm. La fluorescencia de la sonda Fluo-4 se detectó usando un filtro de banda FL-1 (525 nm), mientras que la del yoduro de propidio se detectó usando un filtro FL-4 (675 nm). Se analizaron un total de 10.000 eventos, con una media de 500-1.000 eventos/segundo. Se excluyeron del análisis las células muertas (IP positivas) y se calculó la intensidad media de la fluorescencia correspondiente a Fluo-4 (X mean) de las células vivas (negativas para IP), distinguiéndose dos sub-poblaciones: aquellas con niveles de calcio altos (alta intensidad de fluorescencia verde) y aquellas con niveles de calcio más bajos (baja intensidad de fluorescencia verde). Posteriormente, se escogió la población de altos niveles de calcio para evaluar los cambios en la intensidad de fluorescencia emitida por la sonda Fluo-4 en esta sub-población de interés.

Para valorar **el calcio intracelular contenido en el interior de los diferentes compartimentos celulares** se utilizó la sonda fluorescente Rhod-5N AM, (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). Esta sonda presenta una menor afinidad por el calcio que Fluo-4 AM, por lo que resulta útil para valorar los niveles de este ión en aquellos orgánulos donde la concentración es elevada, por ejemplo, en el retículo endoplásmico (Paredes *et al.*, 2008). Su mecanismo de actuación es el mismo que el de Fluo-4 AM. Para esta tinción se añadieron 1,4  $\mu\text{l}$  de Rhod-5N AM, y 1,4  $\mu\text{l}$  de Yo-Pro-1 (Invitrogen, Thermo Fisher Eugene, Oregon, USA) a las muestras espermáticas diluidas a una concentración final de  $2,2 \times 10^7$  espermatozoides/ml. La sonda fluorescente Yo-Pro-1 es un marcador de apoptosis celular que tiñe aquellas células con alteración de membrana plasmática asociada a los primeros estadios de apoptosis (Idziorek *et al.*, 1995). Tras 15 minutos de incubación a 37 °C, las células se fijaron con 4  $\mu\text{l}$  de formaldehído.

La fluorescencia de la sonda Rhod-5N se detectó usando el filtro de banda FL-4 (675 nm), mientras que la del Yo-Pro-1 se detectó con el filtro de banda FL-1 (525 nm). Se excluyeron del análisis aquellas células positivas para el marcaje con Yo-Pro-1 (apoptóticas y muertas) y se calculó la intensidad de fluorescencia (X mean) correspondiente a Rhod-5N de las células vivas no apoptóticas (Yo-Pro-1 negativas).



**Figura 6: A)** Diagrama representativo de la concentración de calcio intracelular libre estudiada como intensidad de la señal de la sonda Fluo-4 AM y evaluada por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4. La población de interés (espermatozoides vivos, con altos niveles de calcio) aparece remarcada en rojo. **B)** Diagrama representativo de la concentración de calcio intracelular en reservorios celulares estudiada como intensidad de la señal de la sonda Rhod-5N y evaluada por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4. La población de cuya señal se estudia la intensidad (células vivas, YO-PRO negativas) aparece remarcada en rojo.

### 4.3 DETECCIÓN DEL COMPLEJO CALCIO/CALMODULINA PROTEÍN-QUINASA II POR WESTERN BLOTTING

#### 4.3.1 Extracción de proteínas espermáticas

La extracción de proteínas espermáticas se realizó siguiendo el método descrito por Colás y cols. (Colas *et al.*, 2008). A 200  $\mu$ l de cada muestra (swim-up y capacitadas con y sin melatonina) 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, un 0,002% de azul de bromofenol diluido en glicerol al 10% (siendo la concentración final de glicerol del 1%) e inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos), a una concentración de final de 1%.

La mezcla se incubó durante 5 minutos a 100 °C en un baño de arena y después se centrifugó a 15000 xg 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% respectivamente. Las proteínas extraídas se almacenaron en congelador a -20 °C hasta su posterior análisis.

#### 4.3.2 SDS-PAGE e Inmunoblotting

Las proteínas se separaron en una dimensión siguiendo el método descrito por Laemmli (1970). 10  $\mu$ l 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, USA). Las condiciones de electroforesis fueron 130 V durante 90 minutos, a 4 °C. Una vez separadas las proteínas, fueron transferidas a una membrana de PVDF utilizando una unidad de transferencia semiseca, mediante el sistema Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

Una vez realizada la transferencia de las proteínas, los sitios de unión no específicos de la membrana fueron bloqueados 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 del complejo calcio/calmodulina proteína-quinasa II se probaron dos anticuerpos primarios distintos: un anticuerpo monoclonal anti-CaMKII $\alpha$  y un anticuerpo policlonal anti-CaMKII (SC-32288 y SC-5306 respectivamente, Santa Cruz Biotechnology, California, USA), ambos generados en ratón y diluidos 1:1000 en PBS-Tween-20 (0,1 % p/v) con un 1% de BSA (p/v). Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4 °C.

En ambos casos se añadió también un anticuerpo anti-actina como control de carga, producido en conejo (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) y diluido 1:500 en PBS-Tween-20 (0,1 % p/v) con un 1% de BSA (p/v).

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) diluidos 1:30.000 y 1:15.000 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 correspondientes al complejo calcio/calmodulina proteína-quinasa ii 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% durante 4 horas para verificar que la transferencia se había producido correctamente.

#### **4.4 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. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas en la motilidad, la viabilidad, el estado de capacitación, la cantidad de calcio intracelular y de proteína CaMKII y CaMKII $\alpha$  en función del tratamiento. Previamente, todos los datos expresados en porcentaje fueron normalizados mediante la transformación arcoseno. Esta transformación consiste en calcular el arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje ( $\text{arcoseno}\sqrt{p}$ , donde  $p$  es el porcentaje dividido entre 100).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

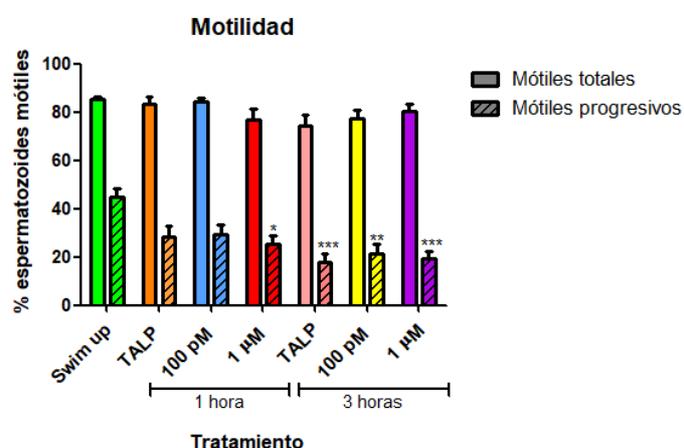
### 5.1 EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LOS NIVELES Y DISTRIBUCIÓN DEL CALCIO EN ESPERMATOZOIDES OVINOS INCUABADOS EN CONDICIONES CAPACITANTES.

Con el objeto de comprobar que la adición de melatonina no tenía efectos perjudiciales en la funcionalidad de los espermatozoides, se estudió si se producían cambios en la motilidad, la viabilidad y el estado de capacitación durante la incubación con esta hormona en condiciones capacitantes.

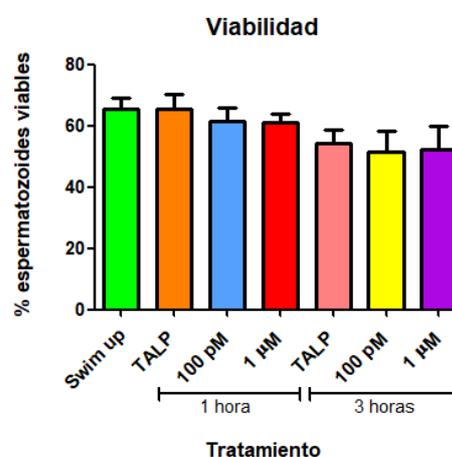
Como se puede observar, la incubación de los espermatozoides en medio TALP durante 3 horas en condiciones capacitantes, apenas afectó a la motilidad total, manteniéndose en torno a valores del 80 % en todos los grupos experimentales, mientras que la motilidad progresiva disminuyó de forma significativa en todas las muestras (Fig. 7).

Esta disminución de la motilidad progresiva con la capacitación se produce porque durante este proceso se produce un cambio en el patrón de movimiento, denominado hiperactivación espermática, que implica un movimiento menos progresivo (Yanagimachi, 1994).

Por otro lado, la viabilidad, entendida como la integridad de membrana, también disminuyó ligeramente tras tres horas de incubación en condiciones capacitantes (Fig. 8). Estos resultados concuerdan con los observados anteriormente por nuestro grupo de investigación, pues se ha visto que la incubación con melatonina en condiciones similares, pero en un medio no capacitante, no afecta a la viabilidad espermática (Casao et al., 2010b).



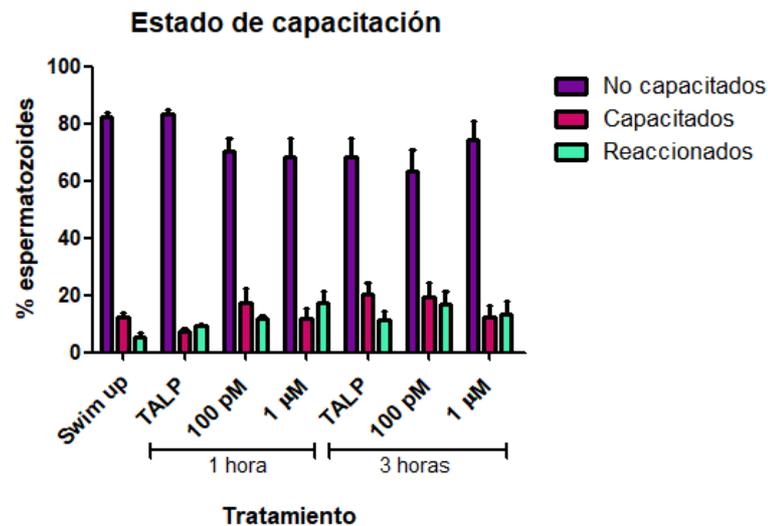
**Figura 7:** Porcentaje de espermatozoides mótils y mótils progresivos en muestras seleccionadas por Swim up e incubadas en condiciones capacitantes (100% humedad, 39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>) sin (TALP) y con diferentes concentraciones de melatonina (100 pM o 1 μM). Los valores se muestran media ± error estándar de la media (n=9). \*\*\* P <0,001; \*\* P <0,01 y \* P <0,05 comparando con la muestra del swim-up.



**Figura 8:** Porcentaje de espermatozoides viables (con la membrana intacta) en muestras seleccionadas por swim-up e incubadas en condiciones capacitantes (100% humedad, 39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>) sin (TALP) y con diferentes concentraciones de melatonina (100 pM o 1 μM). Los resultados se muestran como media ± error estándar de la media (n=9).

Quando se evaluó el estado de capacitación mediante la tinción con CTC no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides no capacitados,

capacitados o reaccionados entre los distintos grupos experimentales (Fig. 9), tal vez debido a que los experimentos se llevaron a cabo durante la época reproductiva, momento en el cual hay elevadas concentraciones de melatonina en el plasma seminal (Casao *et al.*, 2010a), y debido a la presencia de esas cantidades de hormona los espermatozoides quizá no respondan a la adición de melatonina exógena. Pese a ello, tras tres horas de incubación, el porcentaje de espermatozoides capacitados aumentó en las muestras tratadas con una concentración de melatonina 100 pM, mientras que el porcentaje de espermatozoides no capacitados aumentó en el grupo tratado con concentración de melatonina 1  $\mu$ M.



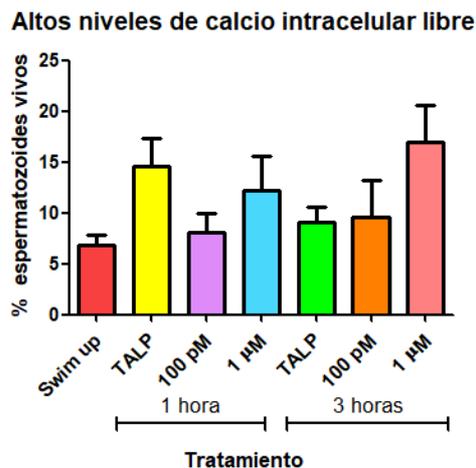
**Figura 9:** Porcentaje de espermatozoides no capacitados, capacitados, y reaccionados evaluados mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC) en muestras seleccionadas por swim-up y tras 1 y 3 horas de incubación *in vitro* en condiciones capacitantes (100% humedad, 39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>) sin (TALP) o con diferentes concentraciones de melatonina (100 pM ó 1  $\mu$ M). Los resultados se representan media  $\pm$  error estándar de la media (n=8).

Esto concuerda con trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Casao *et al.*, 2010b), donde se observó que la melatonina parece tener un efecto capacitante sobre las muestras espermáticas a una concentración de 100 pM, mientras que tendría un efecto descapacitante a una concentración de 1  $\mu$ M.

Una vez evidenciado que la capacitación espermática ha tenido lugar y que la melatonina a las concentraciones ensayadas no provoca un detrimento ni en la motilidad ni en la integridad de la membrana espermática, se analizaron los niveles de calcio intracelular en las muestras espermáticas mediante citometría de flujo.

La tinción con la sonda Fluo-4AM, permitió distinguir dos poblaciones celulares: una población de espermatozoides vivos con alto contenido en el ión calcio intracelular libre (población de vivos con alto calcio), y otra con un contenido menor, en la que la intensidad de fluorescencia emitida por la sonda era menor (vivos con bajo calcio). Una vez identificada la población de interés, aquella con altos niveles de calcio, se decidió evaluar si el porcentaje de espermatozoides con altos niveles de calcio intracelular variaba en condiciones capacitantes y en presencia de melatonina. Tal y como se observa en la figura 10, se produjo un aumento del porcentaje de espermatozoides vivos con alto calcio durante el proceso de capacitación en medio TALP, especialmente evidente durante la primera hora de incubación. Estos datos coincidirían con lo descrito en otras especies, como ratón

(Ruknudin and Silver, 1990), hámster (White and Aitken, 1989), cerdo (Zhou *et al.*, 1990) y humano (Baldi *et al.*, 1991), donde se observó un incremento de calcio intracelular durante la capacitación espermática. Tras tres horas de incubación en condiciones capacitantes en presencia de melatonina 1  $\mu\text{M}$ , el porcentaje de espermatozoides con alto calcio fue mucho mayor que en el medio TALP sin hormona. Si bien esas diferencias no fueron significativas, a la vista de estos resultados, se podría hipotetizar que la melatonina sería capaz de aumentar el calcio en el interior celular cuando se encuentra a concentraciones de 1  $\mu\text{M}$ , tal vez mediante su unión a la calmodulina, impidiendo así la formación del complejo calcio/Calmodulina ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) (Benítez-King *et al.*, 1996) y aumentando por consiguiente el calcio libre.

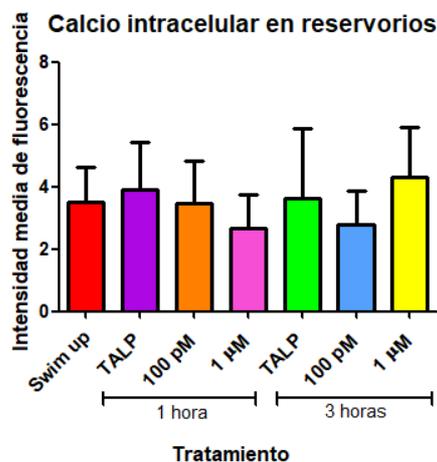


**Figura 10:** Porcentaje de espermatozoides vivos (ioduro de propidio negativos) y con altos niveles de calcio intracelular libre (mayor intensidad de fluorescencia emitida por la sonda Fluo 4-AM) en muestras seleccionadas por swim-up y tras 1 y 3 horas de incubación *in vitro* en condiciones capacitantes (100% humedad, 39 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ ) sin (TALP) o con diferentes concentraciones de melatonina (100 pM o 1  $\mu\text{M}$ ). Los resultados se muestran como media  $\pm$  error estándar de la media (n=6).

Dado que el aumento del calcio intracelular puede darse tanto por la entrada de calcio procedente del medio extracelular (Yanagimachi and Usui, 1974) como por la salida de los reservorios intracelulares (Ho and Suarez, 2003), se procedió a evaluar las posibles variaciones en los niveles de calcio contenidos en los reservorios celulares por acción de la melatonina, mediante la tinción con la sonda Rhod 5-AM. Este compuesto se une con menor afinidad al calcio que el Fluo 4-AM, de modo que es capaz de unirse al calcio contenido en los compartimentos que actúan de reservorios, donde la concentración del ión será mucho más elevada que en el citoplasma.

No obstante, al evaluar los cambios en la intensidad de fluorescencia emitida por la sonda Rhod 5-AM, no se observaron diferencias en las muestras incubadas en condiciones capacitantes con o sin melatonina (Fig. 11). Por tanto, se podría sugerir que el incremento en los niveles de calcio intracelular observado en las muestras incubadas con melatonina 1  $\mu\text{M}$  no sería debido a calcio procedente de los reservorios intracelulares. Tal vez podría deberse a que la presencia de la melatonina, a esta alta concentración, desplace al calcio de su unión con la calmodulina, y por tanto quede más calcio intracelular libre. Esta menor cantidad del complejo calcio/calmodulina repercutiría por tanto en la activación de la enzima CaMKII. Como primer abordaje para testar esta hipótesis, se planteó el estudio de los

niveles de CaMKII en presencia de melatonina, aunque previamente habría que evidenciar la presencia de esta enzima en el espermatozoide ovino.



**Figura 11:** Intensidad media de fluorescencia emitida por la sonda Rhod-5AM y evaluada por citometría de flujo en espermatozoides vivos de muestras seleccionadas por Swim up y tras 1 y 3 horas de incubación *in vitro* en condiciones capacitantes (3 horas a 39 °C y 5% de CO<sub>2</sub>) sin (control, TALP) y con diferentes concentraciones de melatonina (100 pM ó 1 µM). Los resultados se representan como media ± error estándar de la media (n=6).

## 5.2 IDENTIFICACIÓN DE LA ENZIMA CaMKII EN EL ESPERMATOZOIDE OVINO

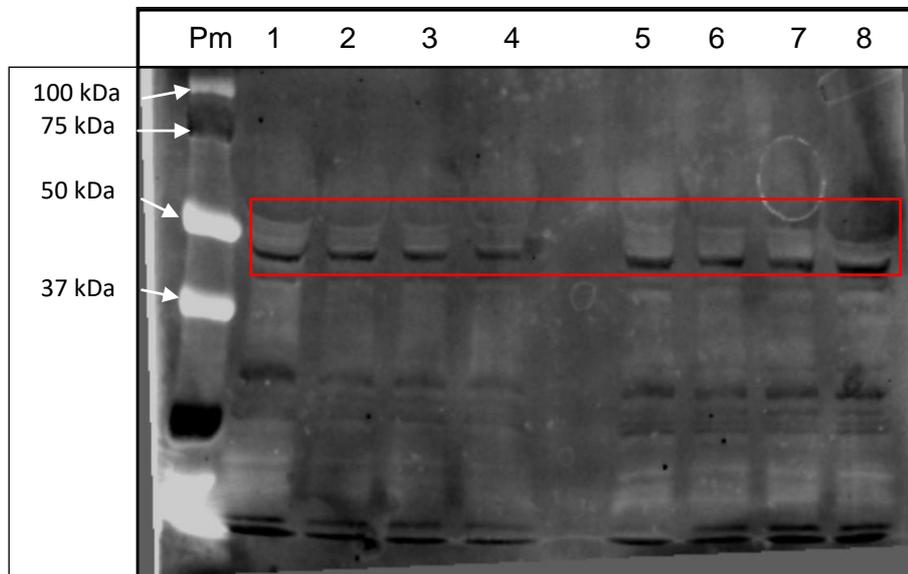
Para poder analizar si los cambios ejercidos por la melatonina sobre los niveles de calcio intracelular estaban relacionados con la enzima CaMKII, previamente se hizo necesario identificar a la enzima CaMKII en el espermatozoide ovino, ya que, hasta la fecha, no se había evidenciado su presencia. Para ello se llevaron a cabo análisis por Western-blotting utilizando dos anticuerpos distintos: uno que detectaba todas las isoformas de la CaMKII, y otro específico para la isoforma alfa (CaMKII $\alpha$ ), ya que, al menos en espermatozoides humanos es la que se relaciona con la funcionalidad espermática, en concreto, con la inhibición de la reacción acrosómica espontánea (Zhang *et al.*, 2016).

Los resultados del western-blot revelaron que CaMKII está presente en el espermatozoide ovino. El anticuerpo anti-CaMKII utilizado permitió evidenciar en algunas muestras dos bandas de peso molecular de aproximadamente 50 kDa y 60 kDa, compatibles con el peso molecular de algunas isoformas de CaMKII (Fig. 12).

La isoforma  $\alpha$  de CaMKII también está presente en el espermatozoide ovino, ya que el anticuerpo anti-CaMKII $\alpha$  identificó una única banda, en torno a los 50 kDa, compatible con esta enzima (Fig. 13).

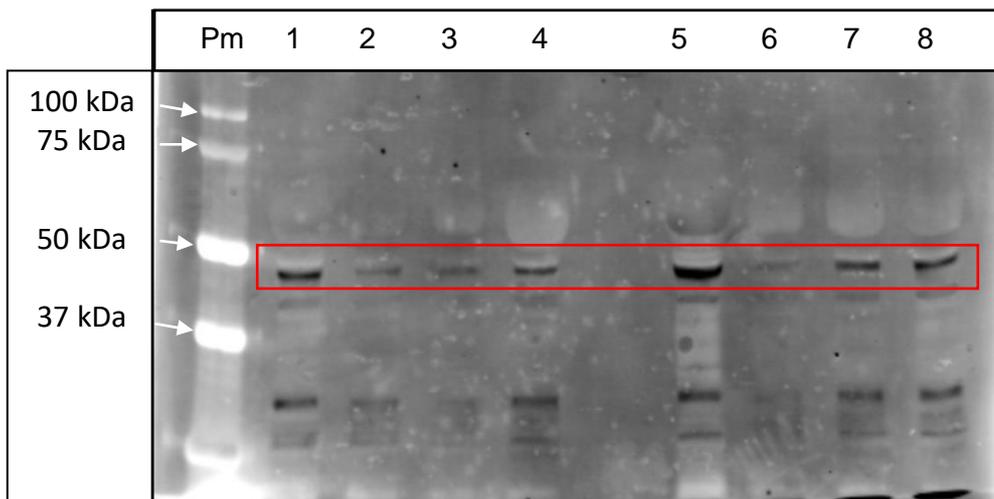
La aparición de las dos bandas en la membrana mostrada en la figura 12 podría explicarse porque el anticuerpo empleado es capaz de reconocer varias isoformas de la enzima. Por un lado, la isoforma  $\alpha$  tiene un peso molecular predicho próximo a 50 kDa, correspondiéndose entonces con la banda de 50 kDa, que ya ha sido caracterizada en el espermatozoide de rata y ratón (Ackermann *et al.*, 2009). Por otro lado, la isoforma  $\beta$  tiene un peso molecular predicho de unos 62 kDa, y se ha encontrado en el espermatozoide equino (Lasko *et al.*, 2012) y murino (Schlingmann *et al.*, 2007). En el gel de la figura 12,

puede apreciarse que la intensidad de la banda inferior es mucho mayor que la de la banda superior (que ni siquiera se aprecia con claridad en algunas muestras), por lo que podríamos concluir que hay una mayor cantidad de CaMKII $\alpha$  que de CaMKII $\beta$  en el espermatozoide ovino.



**Figura 12:** Western-blot representativo de los obtenidos utilizado anticuerpos anti-CaMKII en proteínas extraídas de espermatozoides seleccionados por swim up, (carriles 1 y 5), y tras tres horas de incubación en condiciones capacitantes (100% humedad, 39 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>) en medio TALP sin melatonina, (carriles 2 y 6), con 100 pM de melatonina (carriles 3 y 7) y con 1  $\mu$ M de melatonina (carriles 4 y 8). Las bandas correspondientes a la proteína aparecen remarcadas en rojo.

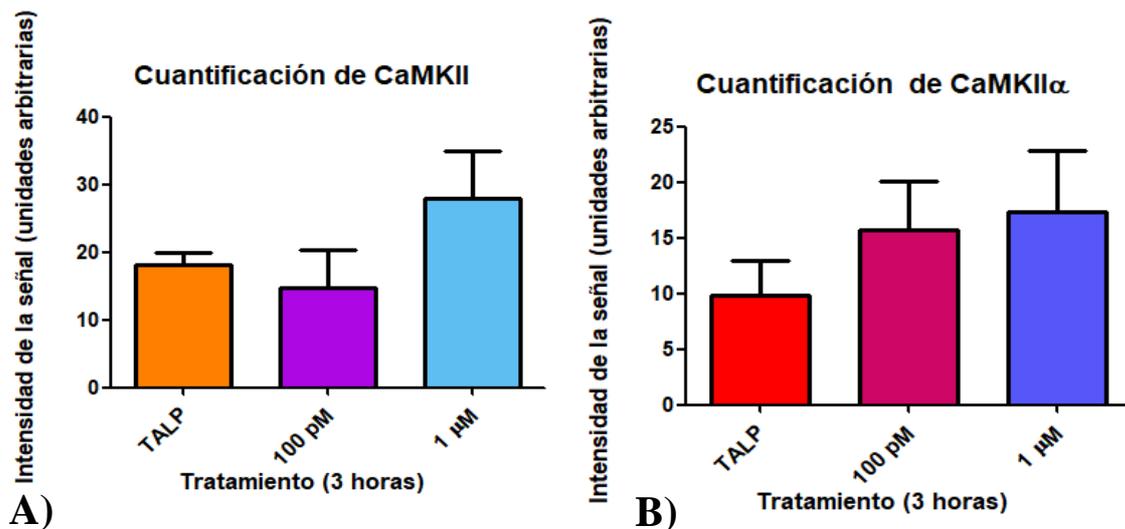
Por otro lado, en la membrana representativa de la figura 13, al usarse un anticuerpo específico para CaMKII $\alpha$ , tan solo se evidenció una única banda en torno a los 50 kDa, tal y como se esperaba para esta isoforma.



**Figura 13:** Western-blot representativo de los obtenidos utilizado anticuerpos anti-CaMKII $\alpha$  en proteínas extraídas de espermatozoides seleccionados por swim up, (carriles 1 y 5), y tras tres horas de incubación en condiciones capacitantes (100% humedad, 39 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>) en medio TALP sin melatonina, (carriles 2 y 6), con 100 pM de melatonina (carriles 3 y 7) y con 1  $\mu$ M de melatonina (carriles 4 y 8). Las bandas correspondientes a la proteína aparecen remarcadas en rojo.

### 5.3 EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LOS NIVELES DE CaMKII Y CaMKII $\alpha$ EN EL ESPERMATOZOIDE OVINO INCUBADO EN CONDICIONES CAPACITANTES

Una vez evidenciada la presencia de varias isoformas de esta enzima en el espermatozoide ovino, se llevó a cabo el estudio de los niveles de CaMKII en presencia de melatonina en condiciones capacitantes. La cuantificación densitométrica de las membranas obtenidas por western-blot, reveló que aumentaba la señal, aunque no de forma significativa, en las muestras incubadas con melatonina 1  $\mu$ M utilizando el anticuerpo frente a todas las isoformas de CaMKII (Fig. 14. A), y en las muestras incubadas con ambas concentraciones de melatonina en el caso del anticuerpo frente a CaMKII $\alpha$  (Fig. 14.B).



**Figura 14:** Cuantificación por densitometría de CaMKII (todas las isoformas, panel A) y CaMKII $\alpha$  (panel B) presente en las muestras espermáticas tras 3 horas de incubación en condiciones condiciones capacitantes (100% humedad, 39 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>) en medio TALP o con diferentes concentraciones de melatonina (100 pM o 1  $\mu$ M). Los resultados se muestran como media  $\pm$  error estándar de n=9 para CaMKII y n=7 para CaMKII $\alpha$ .

Evidentemente se hace necesario completar estos experimentos con estudios de la actividad enzimática de CaMKII, para determinar si esta mayor señal es debida a la enzima activada o no. El hecho de que aparezca una mayor señal correspondiente a la enzima en presencia de melatonina, podría deberse a que la melatonina, atravesando la membrana plasmática, se uniría a la calmodulina y que esa unión impediría la formación del complejo calcio/calmodulina (Benítez-King *et al.*, 1996). En caso de que el complejo calcio/calmodulina (Ca<sup>2+</sup>/CaM) y el anticuerpo se unieran al mismo sitio de la CaMKII, la disminución de los niveles del complejo Ca<sup>2+</sup>/CaM haría que haya mayor cantidad de CaMKII disponible para unirse y ser reconocida por el anticuerpo, lo que explicaría el aumento de la señal densitométrica observado.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo parecen apuntar a que la melatonina, a concentración 1  $\mu$ M, es capaz de unirse a la proteína calmodulina e impedir la formación del complejo Ca<sup>2+</sup>/CaM, lo que haría, por un lado, que aumentasen los niveles de calcio intracelular libre, y por otro, los niveles de la enzima CaMKII libre. No obstante, las implicaciones que puede tener esto en la activación o en la actividad del enzima CaMKII, y su relación con la capacitación espermática ovina, necesitan ser estudiadas más adelante.

## **6. CONCLUSIONES**

1) La melatonina, a concentraciones altas (1  $\mu\text{M}$ ), produjo un aumento del porcentaje de espermatozoides vivos con altos niveles de calcio libre tras tres horas de incubación en condiciones capacitantes.

2) Estos altos niveles de calcio observados en los espermatozoides incubados con melatonina 1  $\mu\text{M}$  no procedieron de los reservorios intracelulares.

3) La enzima calcio/calmodulina proteín-quinasa II (CaMKII), y su isoforma alfa (CaMKII  $\alpha$ ) están presentes en el espermatozoide ovino.

4) La melatonina, a concentraciones altas (1  $\mu\text{M}$ ) aumentó los niveles de CaMKII y de su isoforma CaMKII $\alpha$  tras tres horas de incubación en condiciones capacitantes, mientras que, a concentraciones bajas (100 pM), sólo produjo un aumento de los niveles de CaMKII.

## **CONCLUSIONS**

1) Melatonin, at high doses (1  $\mu\text{M}$ ), caused an increase on the percentage of live spermatozoa with high levels of intracellular calcium after three hours under capacitating conditions.

2) Those high levels of calcium observed in spermatozoa incubated with melatonin 1  $\mu\text{M}$  did not come from intracellular calcium stores.

3) The calcium/calmodulin protein-kinase II (CaMKII) enzyme and its alpha isoform (CaMKII  $\alpha$ ) are both present in ram spermatozoa.

4) Melatonin, at high doses (1  $\mu\text{M}$ ) caused an augmentation of CaMKII and CaMKII $\alpha$  levels after three hours. Meanwhile, low doses of melatonin (100 pM) produced an increase only of CaMKII levels.

## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Ackermann, F., Zitanski, N., Borth, H., Buech, T., Gudermann, T., Boekhoff, I., 2009. CaMKII $\alpha$  interacts with multi-PDZ domain protein MUPP1 in spermatozoa and prevents spontaneous acrosomal exocytosis. *J Cell Sci* 122, 4547–4557.
- 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.
- 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.
- 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 Sci.* 53, 201–207.
- Benítez-King, G., Ríos, A., Martínez, A., Antón-Tay, F., 1996. In vitro inhibition of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim. Biophys. Acta* 1290, 191–196.
- 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.
- 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.A., 2012a. Identification and immunolocalisation of melatonin MT(1) and MT(2) receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 953–961.
- Casao, A., Luna, C., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J., 2012b. Receptor mediated effect of melatonin on ram sperm calcium patterns. pp. 90–90.
- 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.
- 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.
- 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.

- Erickson, J.R., He, B.J., Grumbach, I.M., Anderson, M.E., 2011. CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states. *Physiol. Rev.* 91, 889–915.
- Fujinoki, M., 2008. Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction* 136, 533–541.
- 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.
- Gee, K.R., Brown, K.A., Chen, W.N., Bishop-Stewart, J., Gray, D., Johnson, I., 2000. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* 27, 97–106.
- 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.
- 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.
- 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.
- Harrison, R.A., Vickers, S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 88, 343–352.
- 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.
- Hudmon, A., Schulman, H., 2002. 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.
- Idziorek, T., Estaquier, J., De Bels, F., Ameisen, J.C., 1995. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods* 185, 249–258.
- Ignotz, G.G., Suarez, S.S., 2005. 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.
- Kumari, S., Dash, D., 2011. Melatonin elevates intracellular free calcium in human platelets by inositol 1,4,5-trisphosphate independent mechanism. *FEBS Lett.* 585, 2345–2351.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lasko, J., Schlingmann, K., Klocke, A., Ann Mengel, G., Turner, R., 2012. Calcium/calmodulin and cAMP/protein kinase-A pathways regulate sperm motility in the stallion. *Animal reproduction science* 132, 169–77.
- 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.
- 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.
- Malpoux, B., Viguié, C., Skinner, D.C., Thiéry, J.C., Chemineau, P., 1997. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res. Bull.* 44, 431–438.
- 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.
- Merrill, M.A., Chen, Y., Strack, S., Hell, J.W., 2005. Activity-driven postsynaptic translocation of CaMKII. *Trends in Pharmacological Sciences* 26, 645–653.
- 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.
- 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.
- Paredes, R.M., Etzler, J.C., Watts, L.T., Zheng, W., Lechleiter, J.D., 2008. Chemical calcium indicators. *Methods* 46, 143–151.
- Peña, C., Rincon, J., Pedreanez, A., Viera, N., Mosquera, J., 2007. Chemotactic effect of melatonin on leukocytes. *J. Pineal Res.* 43, 263–269.
- 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).
- Reppert, S.M., 1997. Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Rhythms* 12, 528–531.
- 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.
- Ruknudin, A., Silver, I.A., 1990. Ca<sup>2+</sup> uptake during capacitation of mouse spermatozoa and the effect of an anion transport inhibitor on Ca<sup>2+</sup> uptake. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 63–68.
- 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. *Journal of Andrology* 28, 706–716.
- 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.
- Silva, A.J., Paylor, R., Wehner, J.M., Tonegawa, S., 1992. Impaired spatial learning in alpha-calmodulin-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257, 206–211.
- Sjöblom, M., Säfsten, B., Flemström, G., 2003. Melatonin-induced calcium signaling in clusters of human and rat duodenal enterocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284, G1034-1044.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2, 371–372.
- Yanagimachi, R., Usui, N., 1974. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 89, 161–174.
- 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.
- Zhou, R., Shi, B., Chou, K.C., Oswald, M.D., Haug, A., 1990. Changes in intracellular calcium of porcine sperm during in vitro incubation with seminal plasma and a capacitating medium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172, 47–53.