

BASE MOLECULAR DE LA FUNCIÓ DE L'ESPERMATOZOIDE DE PEIXOS: EL PAPER DE LES ACUAPORINES

Joan Cerdà^{1*}, François Chauvigné¹, Alba Ferré¹, Roderick Nigel Finn²

¹Laboratori Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)-Institut de Ciències del Mar (CSIC), Passeig marítim 37-49, 08003 Barcelona, Espanya. * joan.cerda@irta.cat

²Department of Biology, Bergen High Technology Centre, University of Bergen, 5020 Bergen, Norway, i Institute of Marine Research, PO Box 1870 Nordnes, 5817 Bergen, Norway

Resum

Els gàmetes de teleostis ovípars s'enfronten a importants reptes osmòtics quan s'alliberen al medi extern aquàtic. Descobriments recents en la dorada (*Sparus aurata*) indiquen que els espermatozoides expressen múltiples canals d'aigua transmembrana (acuaporines) que podrien mitigar l'estrès osmòtic associat a l'activació de la motilitat espermàtica en l'aigua marina. Estudis d'inhibició immunològica han revelat que un d'aquests canals, acuaporina-1aa (Aqp1aa), facilita el flux de sortida d'aigua durant el xoc hiperosmòtic en aigua de mar, lo que porta a un augment del Ca^{2+} intracel·lular que activa la motilitat dels espermatozoides. Al mateix temps, durant l'activació la Aqp8bb és ràpidament fosforilada i translocada a la mitocondria, on actua com una peroxiporina facilitant el flux de sortida d'espècies reactives d'oxigen (ROS), com ara el H_2O_2 , i la producció d'ATP per alimentar la motilitat flagel·lar. Mitjançant l'ús d'un repertori d'inhibidors de diferents vies de senyalització intracel·lular hem trobat que el transport mitocondrial de Aqp8bb és regulat per la proteïna quinasa C activada per Ca^{2+} així com per la via de la quinasa c-Jun N-terminal induïda per ROS. Aquestes observacions revelen l'acció coordinada tant de les acuaporines com de diferents vies de senyalització durant l'activació de la motilitat dels espermatozoides de teleostis marins, i proporcionen nous coneixements sobre els mecanismes moleculars subjacents a la fertilitat masculina.

Paraules clau: acuaporina, calci, mitocondria, motilitat, espermatozoide, teleosti, tràfic intracel·lular, ROS.

Abstract

The gametes of oviparous teleosts face tremendous osmotic challenges when released into the external aquatic environment. Recent findings in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*) indicate that multiple transmembrane water channels (aquaporins) are expressed in spermatozoa which might mitigate the osmotic stress occurring during the activation of motility in seawater (SW). Immunological inhibition studies have revealed that one of these channels, aquaporin-1aa (Aqp1aa), facilitates the water efflux during the hyperosmotic shock in SW and the further rise of intracellular Ca^{2+} , which activates sperm motility. In contrast, upon activation Aqp8bb is rapidly phosphorylated and translocated to the mitochondrion, where it acts as a peroxiporin facilitating the efflux of reactive oxygen species (ROS), such as H_2O_2 , and the production of ATP to power flagellar motility. Using a repertoire of inhibitors for different transduction pathways we find that Aqp8bb mitochondrial transport is concomitantly regulated by Ca^{2+} -activated protein kinase C as well as by ROS-induced c-Jun N-terminal kinase signaling. These findings uncover the coordinated action of aquaporins and signaling pathways during sperm motility activation in marine teleosts, and provide novel insight into the molecular mechanisms underlying male fertility.

Key words: aquaporin, calcium, mitochondria, motility, spermatozoa, teleost, intracellular trafficking, ROS.

INTRODUCCIÓ

Els peixos teleostis que habiten en ambients marins i d'aigua dolça estan constantment exposats a gradients osmòtics oposats que condueixen respectivament a l'afluència passiva o flux de sortida d'aigua i el flux de sortida o entrada d'ions. Aquestes perturbacions hidro-

minerals són compensades pel control coordinat dels òrgans osmoreguladors que faciliten l'absorció o excreció d'aigua i minerals per tal de mantenir l'equilibri homeosmòtic (Marshall i Grosell 2006). Aquesta situació, però, és extremadament difícil per als gàmetes i embrions de teleostis ovípars alliberats al medi, ja que aquests estan desproveïts dels òrgans juvenils i adults per el

control hídric i iònic. Per tant, sembla probable que en els òrgans reproductius i cèl·lules germinals d'aquests peixos hagin evolucionat adaptacions moleculars per tal de fer front als reptes osmòtics externs, i d'aquesta manera mantenir la capacitat dels gàmetes per formar un zigot que desenvoluparà embrions i larves normals.

En els últims anys, evidències creixents indiquen el paper dels canals d'aigua transmembrana (acuaporines) per el transport de fluid transepitelial en els òrgans de osmoregulació de peixos, com ara les brànquies, intestí o ronyó (Cerdà i Finn 2010; Madsen *et al.* 2015). En teleostis marins també s'ha demostrat que les acuaporines exerceixen papers importants en els gàmetes masculins i femenins. Aquesta investigació està revelant mecanismes inesperats i altament específics de regulació d'acuaporines en cèl·lules germinals, així com la funció d'alguns d'aquests canals més enllà del transport d'aigua. En aquesta petita revisió resumirem alguns d'aquests nous descobriments en el espermatozoide de teleostis marins.

ACTIVACIÓ DE LA MOTILITAT DELS ESPERMATOZOIDES DE PEIXOS MARINS

Els espermatozoides de teleostis es mantenen en repòs en el testicle i conductes eferents, i l'activació de la motilitat solament es induïda pel medi aquàtic en el que el esperma és ejaculat. En teleostis marins la motilitat dels espermatozoides s'activa pel xoc osmòtic causat per l'exposició a l'aigua de mar. Aquest xoc hiperosmòtic augmenta la concentració intracel·lular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), que activa directament la maquinària del axonema, o mitjançant la fosforilació/desfosforilació de proteïnes de components estructurals del axonema depenent de Ca^{2+} /calmodulina o AMP cíclic (Zilli *et al.* 2012). En algunes espècies, l'augment de Ca^{2+} intracel·lular pot ocórrer com a conseqüència del transport de Ca^{2+} través de la membrana plasmàtica, tot i que fins a la data només un intercanviador invers $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ s'ha pogut demostrar en alguna espècie (Cerdà *et al.*, 2017). En altres casos, l'augment de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pot ser el resultat de l'estimulació de canals activats per estirament (SACs, del anglès *stretch-activated channels*) en resposta a canvis osmòtics o mecànics, o ser causat per l'alliberament de Ca^{2+} intracel·lular (Zilli *et al.*, 2012). No obstant això, els mecanismes osmòtics de membrana i iònics, així com les vies de transducció de senyals per l'activació i manteniment de la motilitat flagel·lar en espermatozoides marins són molt desconeguts. Aquest escenari es complica encara més pel fet que els mecanismes d'iniciació de la motilitat dels espermatozoides en teleostis marins són en molts casos específic de l'espècie (Zilli *et al.* 2012).

LOCALITZACIÓ DE LES ACUAPORINES EN EL ESPERMATOZOIDE DE PEIXOS

La resposta osmòtica dels espermatozoides de teleostis marins després de l'exposició a l'aigua de mar s'ha estimat que es dona en qüestió de mil·lisegons (Cosson *et al.* 2008). Aquest ràpid mecanisme suggereix la presència de acuaporines en la membrana plasmàtica de l'espermatozoide, i així facilitar un ràpid flux de sortida d'aigua seguint el gradient osmòtic. En conseqüència, en diferents espècies marines s'ha observat que el mercuri (típic inhibidor de acuaporines), en dosis que no tenen cap efecte sobre l'aparell axonemal dels espermatozoides, pot reduir la motilitat de l'esperma (Cosson *et al.*, 2008). En alguns teleostis d'aigua dolça, el mercuri també pot afectar la motilitat de l'esperma, però en d'altres, tot i que el HgCl_2 redueix la durada de la motilitat de manera dependent de la dosi, la baixa permeabilitat de la membrana plasmàtica dels espermatozoides suggereix l'absència de acuaporines (Boj *et al.*, 2015b). En els teleostis d'aigua dolça, cap estudi ha proporcionat evidències directes de la presència de les acuaporines en els espermatozoides, i per tant el paper d'aquests canals en l'activació dels espermatozoides d'aquestes espècies és incerta.

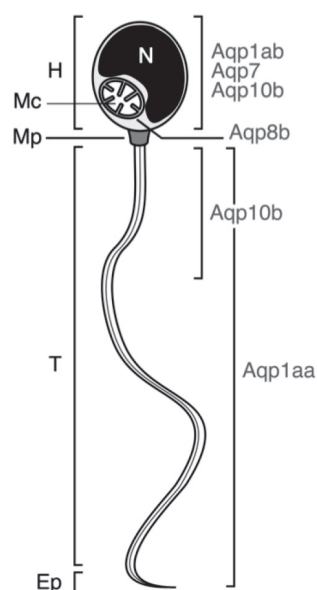


Figura 1. Localització de acuaporines en espermatozoides activats de dorada establerta mitjançant microscopia d'immunofluorescència amb anticossos específics. H, head (cap); Mc, mitochondria; Mp, midpiece (regió mitja); T, tail (cua); Ep, end piece (regió final).

En la dorada (*Sparus aurata*) experiments de immunofluorescència mitjançant anticossos específics han demostrat la presència de múltiples acuaporines en el

espermatozoide (Chauvigné *et al.*, 2013; Boj *et al.*, 2015a) (Figura 1). Així, en els espermatozoides ejaculats immòbils la Aqp1aa i -7 es troben en el flagell i el cap, respectivament, mentre que la Aqp1ab, -8bb i -10b estan en el cap i la cua anterior. Durant l'activació la Aqp1ab i -10b s'acumulen en la membrana plasmàtica del cap i la cua anterior, i la Aqp8bb és ràpidament fosforilada i transportada al únic mitocondri del espermatozoide, mentre que la Aqp1aa i -7 romanen sense canvis. Aquesta redistribució suggereix que les acuaporines podrien exercir diferents papers en el transport d'aigua i soluts durant la iniciació i/o el manteniment de la motilitat dels espermatozoides.

PAPER DE LA AQP1AA DURANT L'ACTIVACIÓ DELS ESPERMATOZOIDES

En l'espermatozoide ejaculat de dorada, la Aqp1aa es distribueix al llarg de tot el flagell, i aquesta localització es manté sense canvis després de l'activació en aigua de mar. La persistència de la Aqp1aa en el flagell pot implicar una necessitat immediata d'aquest canal d'aigua per a l'activació de la motilitat. D'acord amb aquesta hipòtesi, s'ha observat que l'exposició dels espermatozoides de dorada al mercuri suprimeix completament la motilitat, i aquesta inhibició pot ser revertida per l'agent reductor β -mercaptoetanol (Zilli *et al.* 2009). El possible paper de la Aqp1aa en la activació de la motilitat ha estat re-avaluat recentment mitjançant anticossos específics per la Aqp1aa de dorada purificats per afinitat, que poden bloquejar la conductància de la Aqp1aa a l'aigua en oòcits de granota (Boj *et al.*, 2015a). Aquests experiments han demostrat que la inhibició immunològica de la Aqp1aa induïx una forta disminució de la motilitat, la progressió i el moviment flagel·lar dels espermatozoides, el que reforça la idea que la Aqp1aa és essencial per iniciar la motilitat.

En teleosts marins, la activació de canals de Ca^{2+} o K^{+} pot no ser necessària per a la iniciació de la motilitat flagel·lar, ja que els espermatozoides poden ser activats en solucions no iònics, i s'ha vist que diversos inhibidors de canals iònics no tenen cap efecte sobre la motilitat (Zilli *et al.* 2008; Boj *et al.* 2015b). En la dorada es creu que l'augment de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en els espermatozoides durant l'activació és el resultat del increment de la concentració citosòlica a causa del flux de sortida massiva d'aigua després del xoc hiperosmòtic i/o per l'alliberament de Ca^{2+} intracel·lular (Zilli *et al.* 2012; Boj *et al.*, 2015b). En presència del anticòs contra la Aqp1aa s'inhibeix l'elevació del $[\text{Ca}^{2+}]_i$, i aquest efecte s'inverteix per l'exposició dels espermatozoides a un ionòfor de Ca^{2+} (A23187) que restaura els nivells de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i la motilitat (Figura 2). Per tant, aquestes dades proporcio-

nen més suport per al model actual d'activació dels espermatozoides de dorada, on el ràpid flux de sortida d'aigua a través de la Aqp1aa en resposta al xoc osmòtic eleva el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que activa el moviment flagel·lar (Boj *et al.*, 2015b).

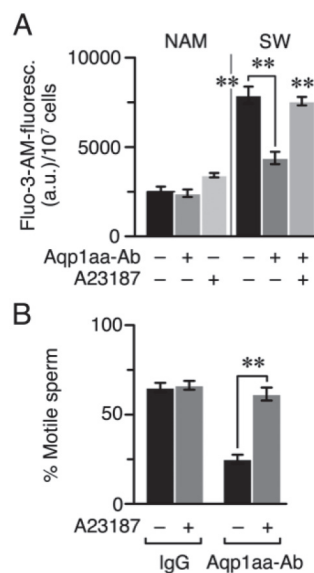


Figura 2. Determinació de Ca^{2+} intracel·lular (A) i la motilitat (B) en espermatozoides immòbils i activats en presència o absència d'un anticòs contra Aqp1aa (Aqp1aa-Ab) i/o el ionòfor A23187. NAM (del anglès, *non-activating medium*); SW (del anglès, *seawater*). **, $P < 0,01$, respecte als espermatozoides en NAM o com s'indica amb parèntesi quadrat. Les dades són de Boj *et al.* (2015a).

LA AQP8BB I LA BIOENERGÈTICA DE LA MOTILITAT FLAGEL·LAR

Durant l'activació dels espermatozoides de la dorada la Aqp8bb, que es troba prèviament al llarg del flagell anterior i en vesícules que envolten el nucli, és ràpidament (és a dir, en menys d'un segon després de l'activació) fosforilada i s'insereix en la membrana interna del únic mitocondri del espermatozoide (Chauvigné *et al.*, 2015). Molts paràlegs d'acuaporina, incloent la Aqp8bb de la dorada, poden transportar espècies d'oxigen reactives (ROS, del anglès *reactive oxygen species*) com ara el peròxid d'hidrogen (H_2O_2), a més d'aigua (Cerdà *et al.*, 2017). Com la fosforilació oxidativa mitocondrial sembla ser una important font d'ATP en els espermatozoides de peix durant la fase de la motilitat (Boj *et al.*, 2015b), es possible que el H_2O_2 produït com un subproducte durant la fosforilació oxidativa, així com el que s'acumula a la mitocondria a causa del estrès hiperosmòtic, podrien ser transportats fora d'aquest compartiment a través de l'Aqp8bb. Per comprovar aquesta hi-

pòtesi, es va fer servir un anticòs purificat per afinitat específic per l'Aqp8bb de dorada que bloqueja el transport intracel·lular del canal en els espermatozoides, possiblement a través de la inhibició estèrica del mecanisme de trànsit, així com la seva permeabilitat un cop inserit en la mitocondria. Quan el trànsit mitocondrial i l'activitat de l'Aqp8bb es bloquegen immunològicament en espermatozoides activats, els nivells de H_2O_2 s'acumulen en el mitocondri, el que condueix a la despolarització de la membrana mitocondrial, la reducció de la producció d'ATP i la ràpida detenció de la motilitat de l'esperma (Figura 3). Aquesta inhibició es reverteix completament en presència d'un antioxidant mitocondrial.

El descobriment de la funció fisiològica de l'Aqp8bb en l'espermatozoide de dorada revela la funció d'aquest canal més enllà del transport d'aigua. Així, en espermatozoides activats l'Aqp8bb opera com una peroxiporina mitocondrial per permetre el flux de sortida de H_2O_2 acumulat, mantenint d'aquesta manera el potencial de la membrana mitocondrial i la producció d'ATP necessari per al manteniment de la motilitat (Chauvigné *et al.*, 2015). Això indica per tant que la Aqp8bb mitocondrial possiblement juga un paper essencial per millorar l'estrès oxidatiu per ROS en els espermatozoides acti-

vats i així preservar la motilitat en condicions hipertòniques. Recentment s'ha observat que un ortòleg de la AQP8 també s'acumula en la mitocondria dels espermatozoides activats del salmó de l'Atlàntic (*Salmo salar*) (Chauvigné *et al.*, dades no publicades), el que suggereix que el mecanisme de desintoxicació per AQP8 en els espermatozoides dels teleostis pot haver evolucionat com un avantatge selectiu per augmentar la competència espermàtica (Chauvigné *et al.* 2015).

REGULACIÓ COORDINADA DE LES ACUAPORINES

Les vies de senyalització i mecanismes intracel·lulars que regulen el trànsit de l'Aqp8bb al mitocondri durant l'activació dels espermatozoides de peixos són desconeguts. En la dorada, però, s'ha trobat que la inhibició de la funció de l'Aqp1aa redueix l'acumulació de l'Aqp8bb en el mitocondri, i aquest efecte pot ser revertit amb el ionòfor de Ca^{2+} A23187 (Boj *et al.* 2015a). Aquestes observacions suggereixen el paper coordinat de l'Aqp1aa i -8bb durant l'activació dels espermatozoides de dorada (Figura 4). En aquest model l'augment de $[Ca^{2+}]$ i facilitat per l'Aqp1aa exerceix un doble pa-

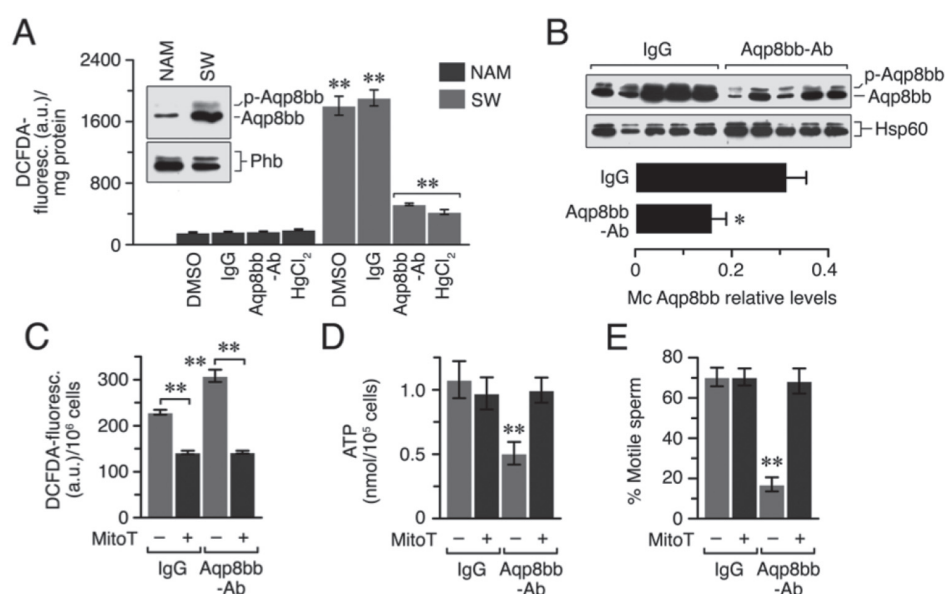


Figura 3. (A) Transport de H_2O_2 en mitocondries aïllades en presència de 0,5% de DMSO, 0,3 μ M IgG (control) o anticòs contra Aqp8bb (Aqp8b-Ab), o 10 μ M mercuri. El insert mostra un immunoblot per Aqp8bb de les mitocondries de espermatozoides immòbils i mòbils, on s'indiquen els monòmers Aqp8bb fosforilats (p-Aqp8bb) i desfosforilats. La Prohibitina b (Phb) es va utilitzar com a control. **, $P < 0,01$, respecte a les mitocondries de espermatozoides en NAM, o respecte a mitocondries tractades amb DMSO o IgG (en parèntesis quadrats). (B) Western blot que mostra la inhibició de la acumulació de Aqp8bb en la mitocondria de espermatozoides tractats amb IgG o Aqp8bb-Ab, usant la proteïna de xoc tèrmic 60 (Hsp60) com a control. *, $P < 0,05$. (C-E) Nivells de H_2O_2 (C) ATP (D) i motilitat (E) de espermatozoides activats en presència de IgG o Aqp8bb-Ab i del antioxidant mitocondrial MitoTempo (MitoT). *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$, respecte als espermatozoides tractats amb IgG, o com s'indica en parèntesi.

per, mitjançant l'activació de la motilitat flagel·lar a través de l'estimulació de l'axonema així com el mecanisme de desintoxicació mitocondrial per Aqp8bb.

Recentment les vies moleculars implicades en el control del transport de l'Aqp8bb al mitocondri han començat a ser investigades. En estudis inicials s'ha investigat el possible paper de proteïnes quinasas activades per mitògens (MAPK) que responen a estímuls d'estrès en el control del transport de Aqp8bb a la mitocondria. Utilitzant diferents inhibidors i activadors de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), p38 MAPK i glicogen sintasa quinasa 3 (GSK3) hem vist que les vies de senyalització de la JNK i GSK3 poden controlar el transport mitocondrial de la Aqp8bb (Figura 5). Així mateix hem detectat que la incubació de espermatozoides no activats amb el ionòfor de Ca^{2+} A23187 en presència de Ca^{2+} extern pot induir la fosforilació de l'Aqp8bb i la seva acumulació en la mitocondria, un procés que es pot prevenir amb un inhibidor de la proteïna quinasa C (PKC). A més, hem observat que tant la incubació d'espermatozoides immòbils amb generadors de ROS in vitro, com l'activació dels espermatozoides en aigua de mar en presència d'un quelant de Ca^{2+} , promouen el transport mitocondrial de l'Aqp8bb. Això suggereix que els nivells intracel·lulars de Ca^{2+} i ROS, són senyals primàries independents que regulen el mecanisme de desintoxicació per Aqp8bb, possiblement a través de les vies de la PKC/GSK3 i JNK, respectivament.

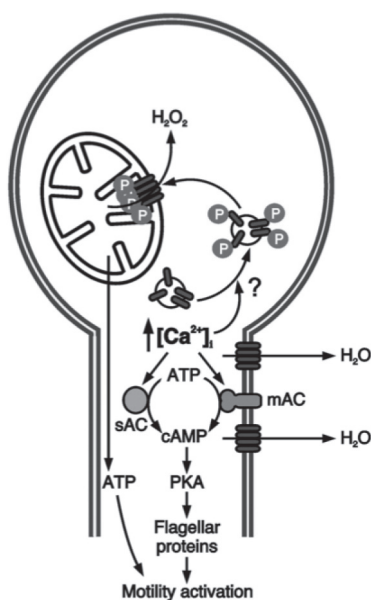


Figura 4. Model de la funció coordinada de l'Aqp1aa i -8bb durant l'activació de la motilitat dels espermatozoides. El xoc hiperosmòtic desencadena el flux de sortida d'aigua a través de l'Aqp1aa flagel·lar, que provoca una reducció del volum cel·lular i l'augment de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Això pot conduir a l'activació de l'adenilat ciclasa de la membrana i soluble (mAC i sAC,

respectivament) i de la ruta de senyalització d'AMPC/PKA (que activa la fosforilació de les proteïnes del axonema i la motilitat). Els nivells de Ca^{2+} , a través d'una via encara desconeguda, poden també induir la ràpida fosforilació de l'Aqp8bb i el seu transport al mitocondri. L'Aqp8bb inserida en la membrana interna mitocondrial pot permetre el flux de sortida de peròxid d'aquest compartiment per evitar el dany oxidatiu durant la síntesi d'ATP, i mantenir així la motilitat.

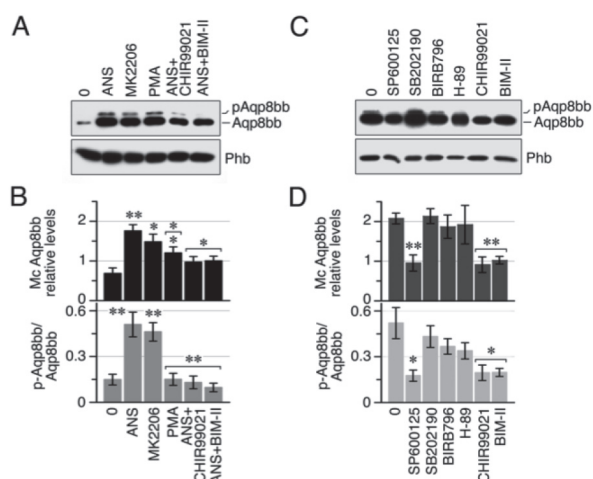


Figura 5. Efecte de moduladors de la ruta de MAPK en la translocació de Aqp8bb a la mitocondria dels espermatozoides. (A-B) En medi no activant, la traslocació de Aqp8bb és potenciada per un activador de la JNK (anisomicina; ANS), i en menor mesura per un activador de la PKC (PMA), i per un inhibidor de la PKB (MK2206) que activa la GSK3. L'acumulació de Aqp8bb en les mitocondries induïda amb ANS es redueix amb inhibidors de la PKC (BIM-II) i GSK3 (CHIR99021). (C-D) Durant l'activació, els inhibidors de JNK (SP600125), PKC i GSK3 bloquegen el trànsit de l'Aqp8bb a la mitocondria, mentre que, els inhibidors de PKA (H89) i p38 MAPK (SB2020190 i BIRB796) no tenen efecte.

CONCLUSIONS

Les dades actuals demostren que les acuaporines de teleostis marins han evolucionat per exercir múltiples funcions fisiològiques en les cèl·lules germinals masculines. Això inclou la inserció de canals Aqp1aa a la membrana flagel·lar del espermatozoide per activar la motilitat, així com la especialització de l'Aqp8bb per funcionar com un canal de H_2O_2 mitocondrial en espermatozoides activats. Aquests descobriments representen importants avenços en la nostra comprensió de les funcions de les acuaporines en les cèl·lules germinals de teleostis. No obstant això, les dades actuals es limiten principalment a una sola espècie de teleosti marí, com la dorada, i no es coneix per tant si les acuaporines poden tenir una funció fisiològica en altres llinatges de peixos. A més, la funció d'altres paràlegs d'acuaporines presents en el sperma-

tozoide de la dorada, com les Aqp1ab, -7 i -10b, encara no s'ha dilucidat. Finalment, els mecanismes moleculars que governen el trànsit intracel·lular de les acuaporines en els espermatozoides de teleostis romanen encara molt desconeguts. Tot aquest nou coneixement serà per tant fonamental per a comprendre la rellevància biològica de les acuaporines durant el desenvolupament i la funció dels espermatozoides de peixos.

AGRAÏMENTS

Aquesta recerca ha estat finançada per el Ministeri d'Economia i Competitivitat espanyol (AGL2010-15597 i AGL2013-41196-R), Generalitat de Catalunya (2009 SGR 01050 i 2014 SGR 1351), i el Consell d'Investigació de Noruega (224816/E40 i 254872/I40).

REFERÈNCIES

- Boj M, Chauvigné F, Cerdà J (2015a) Coordinated action of aquaporins regulates sperm motility in a marine teleost. *Biol Reprod* 93(2), 40.
- Boj M, Chauvigné F, Cerdà J (2015b) Aquaporin biology of spermatogenesis and sperm physiology in mammals and teleosts. *Biol Bull* 229, 93-108.
- Cerdà J, Finn RN (2010) Piscine aquaporins: an overview of recent advances. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 313, 623-650.
- Cerdà J, Chauvigné F, Finn RN (2017) The physiological role and regulation of aquaporins in teleost germ cells. *Adv Exp Med Biol* 969, 149-171.
- Chauvigné F, Boj M, Vilella S, Finn RN, Cerdà J (2013) Subcellular localization of selectively permeable aquaporins in the male germ line of a marine teleost reveals spatial redistribution in activated spermatozoa. *Biol Reprod* 89, 37.
- Chauvigné F, Boj M, Finn RN, Cerdà J (2015) Mitochondrial aquaporin-8-mediated hydrogen peroxide transport is essential for teleost spermatozoon motility. *Sci Rep* 14, 7789.
- Cosson J, Groison AL, Suquet M, Fauvel C, Dreanno C, Billard R (2008) Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers. *Reproduction* 136, 277-294.
- Madsen SS, Engelund MB, Cutler CP (2015) Water transport and functional dynamics of aquaporins in osmoregulatory organs of fishes. *Biol Bull* 229, 70-92.
- Marshall WS, Grosell M (2006) Ion transport, osmoregulation and acid-base balance. In: D.H. Evans and J.B. Claiborne (eds) *The Physiology of Fishes*, 3rd edn, CRC Press, BocaRaton, pp 177-230.
- Zilli L, Schiavone R, Storelli C, Vilella S (2008) Molecular mechanisms determining sperm motility initiation in two sparids (*Sparus aurata* and *Lithognathus mormyrus*). *Biol Reprod* 79, 356-366.
- Zilli L, Schiavone R, Chauvigné F, Cerdà J, Storelli C, Vilella S (2009) Evidence for the involvement of aquaporins in sperm motility activation of the teleost gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biol Reprod* 81, 880-888.
- Zilli L, Schiavone R, Storelli C, Vilella S (2012) Molecular mechanism regulating axoneme activation in marine fish: a review. *Int Aquatic Res* 4, 2.