



IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE RECEPTORES DE MELATONINA EN EL TRACTO REPRODUCTOR DE MORUECO

Trabajo Fin de Grado realizado en el Departamento de
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Veterinaria

Febrero 2015

David Aguilar Recarte

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE RECEPTORES DE MELATONINA EN EL TRACTO REPRODUCTOR DE MORUECO

Memoria presentada por el alumno David Aguilar Recarte para optar al título
de Graduado en Biotecnología por la Universidad de Zaragoza

Dirigida por:

Rosaura Pérez Pé

M^a Teresa Muiño Blanco

Trabajo realizado en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Veterinaria

Febrero 2015

Los resultados derivados del presente Trabajo Fin de Grado han sido presentados al siguiente congreso (Anexos):

Título: "**Identificación y cuantificación de la expresión génica de receptores de melatonina en el tracto reproductor de morueco**".

Autores: D. Aguilar, A.E. Gaspar, M. González-Arto, R. Pérez-Pé, M^aT. Muiño-Blanco, A. Casao , J.A. Cebrián-Pérez.

Congreso: VII Congreso Nacional del Instituto Universitario de Investigación en Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Zaragoza, 4 de Febrero de 2015.

Los resultados derivados del presente Trabajo Fin de Grado se presentarán en el siguiente congreso (Anexos):

Título: "**Identificación y cuantificación de la expresión génica de los receptores de melatonina MT₁ y MT₂ en el tracto reproductor del morueco**".

Autores: Aguilar, D.; González-Arto, M.; Gaspar, A.E.; Pérez-Pé, R.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A y Casao A.

Congreso: XVI Jornadas sobre Producción Animal, organizadas por AIDA, en el Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (2015).

ÍNDICE

1.- Resumen	1
Abstract	2
2.- Antecedentes	3
3.- Objetivos y planteamiento del trabajo	8
4.- Parte experimental: Material y métodos	9
<i>4.1 Expresión génica de MT₁ Y MT₂ en tejidos del tracto reproductor del macho ovino</i>	9
<i>4.1.1 Obtención de tejidos</i>	9
<i>4.1.2 Aislamiento y limpieza del RNA total</i>	9
<i>4.1.3 Síntesis de cDNA</i>	10
<i>4.1.4 Amplificación del cDNA para la identificación de MT₁ Y MT₂</i>	11
<i>4.1.5 Q-PCR</i>	12
<i>4.2 Detección de las proteínas de tejidos por Western blot</i>	13
<i>4.2.1 Extracción de proteínas de tejidos y espermatozoides</i>	13
<i>4.2.2 SDS PAGEy Western blot</i>	13
5.- Resultados	15
<i>5.1 Expresión génica de MT₁ Y MT₂ en tejidos del tracto reproductor del macho ovino</i>	15
<i>5.1.1 Obtención de RNA y cDNA</i>	15
<i>5.1.2 Resultados de RT-PCR</i>	16
<i>5.1.3 Resultados de q-PCR</i>	18
<i>5.2 Inmunodetección mediante Western blot de los receptores MT₁ y MT₂</i>	20
6.- Discusión	22
7.- Conclusiones/Conclusions	24
8.- Bibliografía	25
9.- Anexos	29

1.- RESUMEN / ABSTRACT

La hormona melatonina es una de las sustancias biológicamente activas más antiguas de los organismos vivos y desempeña una gran variedad de funciones. Una gran parte de estas funciones las ejerce principalmente interaccionando con los receptores transmembrana acoplados a proteína G, MT₁ y MT₂, los cuales intervienen en diferentes vías de transducción de señal.

La melatonina se sintetiza principalmente en la glándula pineal durante la noche, y, como consecuencia de ello, sus niveles en plasma sanguíneo son prácticamente inexistentes durante el día. Sin embargo, recientes estudios de nuestro grupo de investigación han demostrado la presencia de melatonina en plasma seminal ovino, que mantiene niveles constantes a lo largo del día aunque menores que los nocturnos. Asimismo, en dichos estudios también se ha verificado la existencia de enzimas responsables de la síntesis de melatonina en el tracto reproductor de morueco.

Una cuestión interesante sería determinar si la melatonina puede ejercer alguna acción directa sobre los tejidos del tracto genital masculino. Con este fin, en este trabajo se analizó la existencia de los dos receptores principales de melatonina, MT₁ y MT₂, en los distintos tejidos del aparato reproductor del morueco (testículo, epidídimo y glándulas accesorias). Mediante PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) se demostró la expresión génica de dichos receptores en todos los tejidos estudiados, y además la *real time-PCR* (q-PCR) permitió cuantificar las diferencias existentes en los niveles de expresión en cada uno de los tejidos. Asimismo, se demostró la presencia de estos receptores, mediante Western-Blot, en la mayoría de los tejidos en mayor o menor medida.

La relevancia de dichos resultados radica en que la presencia de los dos receptores de melatonina en el tracto reproductor masculino indicaría la existencia de mecanismos de modulación de posibles vías de trasducción de señal asociadas a ellos. Las respuestas producidas podrían incidir de algún modo en el control de los eventos de maduración, desarrollo, transporte y almacenamiento de las células espermáticas, pudiendo influenciar la calidad seminal y, consecuentemente, la capacidad fecundante de los eyaculados.

ABSTRACT

The hormone melatonin is one of the oldest active biological substances of live organisms, which carries out a wide variety of functions. Many of these functions are mainly exerted by interacting with G-protein coupled transmembrane receptors MT₁ and MT₂, which take part in different signal transduction pathways.

Melatonin is mainly synthesized by the pineal gland during the night and, therefore, its levels in blood plasma are almost non-existent during the day. However, recent studies of our research group have determined its presence in ram seminal plasma, founding constant levels during the day but lower than those in the night. Additionally, these studies have also shown the existence of enzymes responsible for the synthesis of melatonin in the ovine reproductive tract.

One issue still remaining to clarify would be whether melatonin is capable to exert some direct actions on the male genital tract tissues. For this purpose, in this study we have analyzed the existence of the main melatonin receptors, MT₁ y MT₂, in various reproductive tissues (testis, epididymis and accessory glands). RT-PCR results demonstrated the receptors gene expression in these tissues, and q-PCR assays allowed to quantify the differences between them. Moreover, the presence of these two receptors was demonstrated in most of the studied tissues by Western-blot, to a greater or lesser extent.

The importance of these results lies in the demonstration of the presence of two melatonin receptors in the male reproductive tract, which may indicate the involvement of modulation mechanisms of different associated regulation pathways. The produced responses will somehow affect the control of maturation, development, transport and storage of the spermatic cells, being able to influence seminal quality and, therefore ,the fertilizing capacity of the ejaculates.

2.- ANTECEDENTES

2.1 Melatonina y funciones

La melatonina ha estado presente en los organismos vivos desde las primeras etapas de la evolución. Debido a esta antigüedad y a su gran versatilidad química, esta pequeña molécula está involucrada en el desarrollo de una gran variedad de funciones biológicas diferentes.

Una de las más conocidas, la defensa antioxidante frente a los daños producidos por radicales libres de oxígeno, es también una de las más antiguas, ya vigente en organismos unicelulares primitivos y que no se ha visto relegada por las nuevas funciones adquiridas durante la evolución (Tan et al. 2010).

Entre esas otras funciones se encuentran la regulación del fotoperiodo y los ritmos circadianos, la actividad sexual en pájaros, peces y algunos mamíferos, la inmunomodulación, la regulación de la inflamación, la estacionalidad reproductiva en algunos mamíferos en función del fotoperiodo, así como la influencia en el reloj biológico de los seres vivos, puesto que la disminución de la producción de melatonina durante el envejecimiento es señal de senescencia en muchos organismos (Tan et al. 2010). Asimismo, diferentes estudios muestran una mejora en diversos parámetros de calidad en espermatozoide tras tratamientos *in vitro* con melatonina (Casao et al. 2010; Jang et al. 2010)

2.2 Receptores de melatonina acoplados a proteína G

La melatonina es capaz de actuar directamente sobre varias vías metabólicas atravesando la membrana celular, pero probablemente la mayoría de sus funciones se ejercen a través de receptores específicos de alta afinidad transmembrana o nucleares, particularmente la vía de transducción de señal del ciclo luz/oscuridad en organismos multicelulares (Reppert 1997). Esta función biológica mediada por receptor debe de haber surgido durante la evolución, después de su acción primaria como antioxidante (Reppert 1997; Tan et al. 2010)

MT₁ y MT₂ es la denominación oficial internacional para los receptores transmembrana de melatonina (Alexander et al. ; Dubocovich and Markowska 2005; Radogna et al. 2007), Pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs en inglés o *G-protein-coupled receptors*), están constituidos por siete proteínas transmembrana, y representan una subfamilia específica que posee secuencias cortas concretas de aminoácidos (Reppert 1997; Reppert et al. 1994) (Figura 1). Ambos receptores muestran una alta homología de secuencia de aminoácidos y están relacionados con la inhibición de la producción de AMP cíclico (AMPc) (Browning et al. 2000; Reppert 1997; Reppert et al. 1994). Las características de unión de los dos subtipos de receptores son similares, mostrando afinidades en el rango subnanomolar

por la melatonina (Dubocovich and Markowska 2005). Las vías de transducción de señales desencadenadas por MT₁ y MT₂ se han caracterizado en cultivos celulares y tejidos (Jockers et al. 2008).

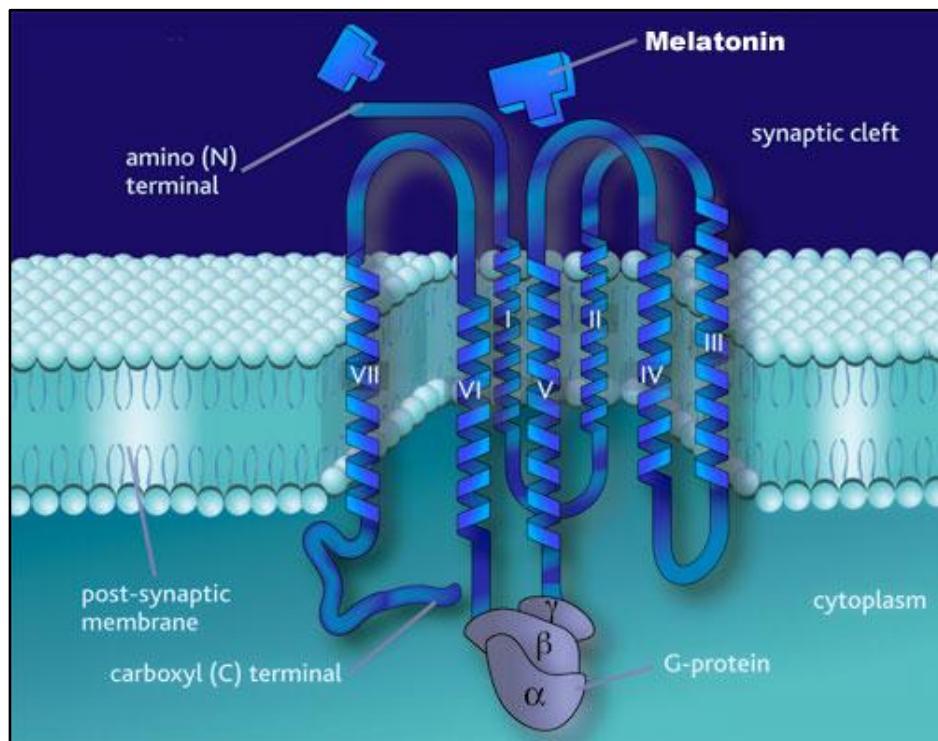


Figura 1: Estructura de un receptor transmembrana de melatonina acoplado a proteína G. Formado por 7 proteínas transmembrana y unido a una proteína G heterotrimérica.

2.3 Transducción de la señal tras la unión a receptores y efectos en el organismo

La activación de los receptores tras la unión de melatonina provoca la disociación de la subunidades G α y el complejo G $\beta\gamma$ que forman la proteína G heterotrimérica, los cuales interaccionan con varios efectores posteriores en la cascada de señalización. Tras la activación del receptor, los receptores de melatonina principalmente inhiben las adenilato ciclasas (AC) a través de proteínas G_i (inhibitorias) (Brydon et al. 1999), produciendo una disminución del AMPc, lo cual afectará al resto de efectores de la cascada.

Además de la señalización dependiente de AMPc, los receptores de melatonina pueden utilizar otros tipos de proteínas G como la proteína G_s, G_q, G_z y G₁₆ para la propagación de la señal (Chan et al. 2002). Mediante estos otros tipos de proteínas G se regularán diferentes cascadas estimulando la actividad de la fosfolipasa C o de la proteína-quinasa C, según el modo de actuación del receptor.

2.3.1 Receptor MT₁

La diversidad de la respuesta de la melatonina en el organismo se puede atribuir al hecho de que sus receptores se expresan en una amplia variedad de tejidos. El receptor MT₁ se expresa en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (SCN) y en vasos sanguíneos cardiacos, estando involucrado en la modulación de los ritmos circadianos (Browning et al. 2000; de Jonghe et al. 2010) y en la constrictión de los vasos (Ekmekcioglu 2006). Además, este receptor también se expresa en otras regiones del cerebro y tejidos periféricos (Chan et al. 2013; Dubocovich and Takahashi 1987; Hu et al. 2010; Kayumov et al. 2001; Millan et al. 2003). Además de su amplia distribución, el hecho de que los receptores MT₁ puedan acoplarse a una amplia variedad de proteínas G (activadoras o inhibidoras) (Dawson and Armstrong 1996; Reiter 1991; Sack et al. 2007; Spadoni et al. 1993), puede explicar también su diversidad de respuesta. La activación del receptor MT₁ aumenta la fosforilación de la proteína-quinasa A (PKA) disminuyendo su actividad (Jockers et al. 2008; Witt-Enderby et al. 1998) y de la proteína-quinasa C (PKC). También disminuye la fosforilación del factor nuclear CREB (Mor et al. 1998; van Dam et al. 1993) y aumenta la fosforilación de las MAP quinasas MEK 1, ME2, ERK1, ERK2 (Witt-Enderby et al. 2000) y la quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) (Chan et al. 2002).

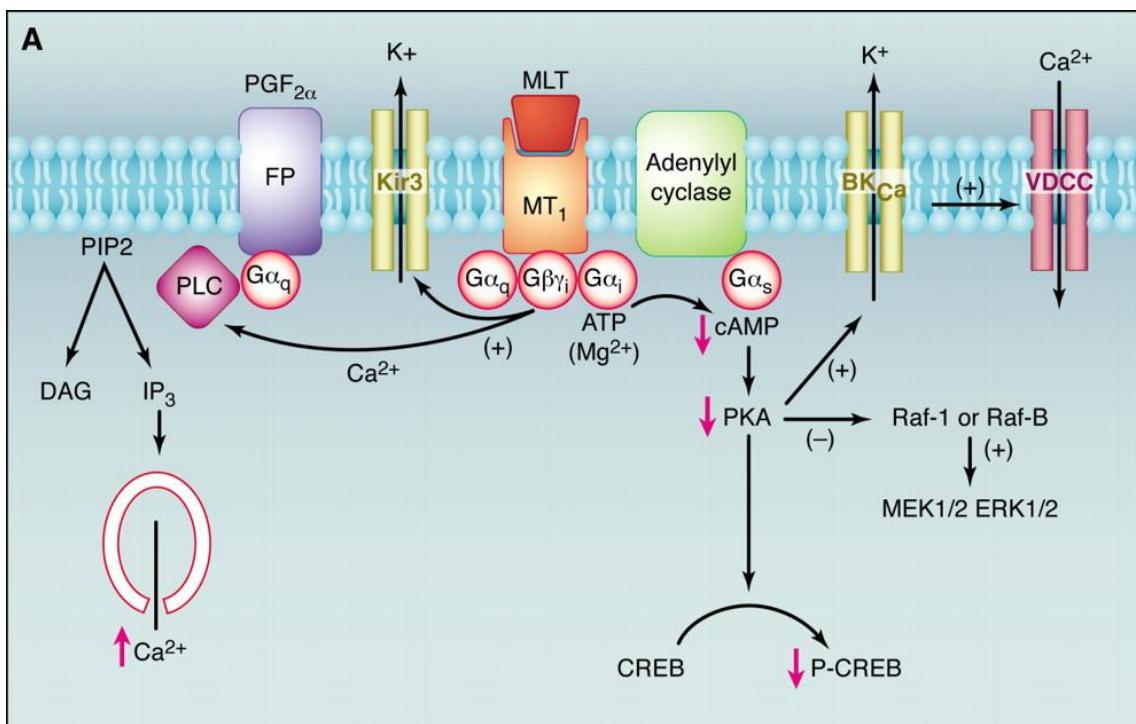


Figura 2: Representación de las principales vías de transducción de señal reguladas por el receptor MT₁ tras su unión a melatonina.

2.3.2 Receptor MT₂

Al contrario que los receptores MT₁, estos receptores tienen una localización más restringida, incluyendo cerebro, núcleo supraquiasmático del hipotálamo, retina, riñón, ovario y algunos vasos cardíacos. De forma similar al receptor MT₁, estos receptores inhiben la formación de AMPc estimulada por forskolina (Hazlerigg et al. 1991; MacKenzie et al. 2002) y estimula JNK (Chan et al. 2002) y la hidrólisis de fosfatidilinositol (PIP2) (Reiter 1991; Travnickova-Bendova et al. 2002), a través de la estimulación de la actividad de la fosfolipasa C por interacción con el complejo $\beta\gamma$ de la proteína G disociada. El resultado es la conversión de PIP2 en diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), lo cual activa la PKC y la señalización de calcio por calmodulina, estimulando de este modo la vía de las MAP quinasas, incluyendo ERK, JNK y p38 (Kyriakis et al. 1994)

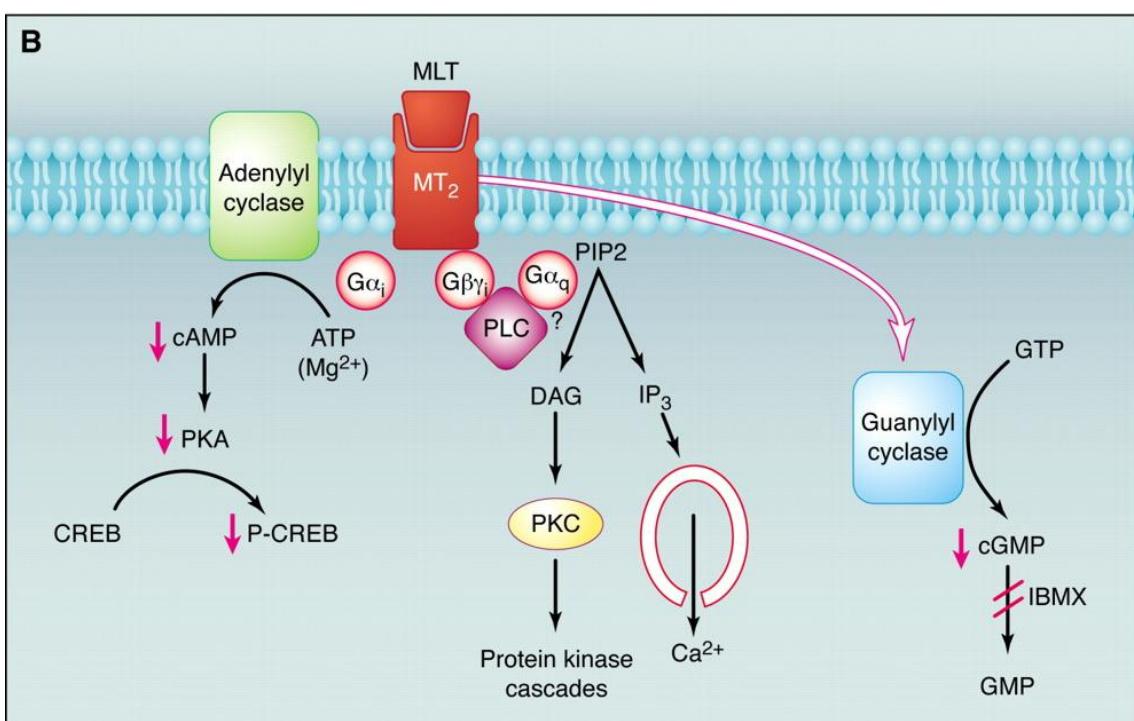


Figura 3: Representación de las principales vías de transducción de señal reguladas por el receptor MT₂ tras su unión a melatonina.

Debido a la falta de herramientas farmacológicas, sólo unas pocas funciones atribuidas a los receptores de melatonina han sido confirmadas *in vivo*. Los receptores MT₁ y MT₂ están involucrados en la actividad neuronal en el SNC con diferentes funciones. El receptor MT₁ se asocia con la inhibición de la producción de andrógenos (Frungieri et al. 2005). Parece que también está involucrado en el efecto de la melatonina sobre la expresión de algunos genes Clock en ovejas (Johnston et al. 2006), y su expresión está regulada durante el desarrollo según los ciclos de luz/oscuridad (Johnston et al. 2006; Masson-Pevet et al. 1996; Slominski et al. 2012).

El receptor MT₂ está involucrado en el ritmo circadiano (Dubocovich and Markowska 2005; Hunt et al. 2001; Liu 2007), experimentando una desensibilización al comienzo de la noche debida a su internalización tras las exposición a melatonina, como la mayoría de los GPCRs (Gerdin et al. 2004). Por lo tanto, los receptores de melatonina juegan un importante papel en la regulación del fotoperiodo. Otros resultados sugieren que la desregulación de los receptores de melatonina podría estar involucrada en la inducción de depresión (Dubocovich and Markowska 2005; Larson et al. 2006), ya que los ritmos circadianos están generalmente reducidos o incluso perturbados en pacientes depresivos (Turek 2007).

En células que expresan los dos subtipos de receptores, se pueden formar heterodímeros entre MT₁ y MT₂ generando mayor complejidad y cambios en la funcionalidad. La heterodimerización de los receptores MT₁ y MT₂ se ha demostrado en células HEK293 transfectadas (Ayoub et al. 2004). La tendencia a la formación de homodímeros MT₁ y de heterodímeros MT₁/MT₂ es mucho más alta que la de homodimerización de MT₂ (Ayoub et al. 2002), aunque los efectos funcionales de estas dimerizaciones no se conocen actualmente. Además, los receptores de melatonina tienen la capacidad de heterodimerizar con el receptor huérfano GPR50 (GPCR) (Levoye et al. 2006)

En trabajos recientes de nuestro grupo se han identificado ambos receptores MT₁ y MT₂ en la membrana plasmática del espermatozoide ovino (Casao et al. 2012) y se ha postulado que el efecto de la melatonina en la capacitación espermática parece ser mediado por receptor (Casao et al. 2012) .Aunque la vía de señalización involucrada aún no está descrita, el papel de los receptores de melatonina en la capacitación espermática en ovino puede estar basado en que su activación regula las vías de producción de AMPc, y la actividad de varias enzimas, como JNK, PKA y PKC o la vía de las MAP quinasas, componentes que participan en las vías de transducción de señal que llevan a la capacitación espermática y la reacción acrosómica (Almog et al. 2008; de Lamirande and Gagnon 1984).

3.- OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

La melatonina ejerce una gran variedad de funciones en el organismo, muchas de ellas mediadas por receptores específicos ampliamente distribuidos y localizados en diferentes tejidos.

Investigaciones anteriores demuestran la presencia de melatonina en altas concentraciones en el plasma seminal durante el día (Casao et al. 2010). También, se ha demostrado la existencia de receptores de melatonina MT₁ y MT₂ en espermatozoides de ovino (Casao et al. 2012) lo que sugiere la existencia de una regulación de los procesos que tienen lugar durante la vida de la célula espermática mediante la unión de melatonina a estos receptores. Además, recientes estudios confirman la hipótesis de la existencia de enzimas de síntesis de melatonina en el tracto reproductor de morueco (González-Arto et al. 2014), lo que implicaría un proceso de síntesis de esta hormona, independiente de la glándula pineal, a nivel de los tejidos del tracto genital masculino.

Estos resultados sugieren la hipótesis de que podría existir una regulación en el tracto reproductor masculino, en la que la melatonina, pineal o extrapineal, podría ejercer sus funciones a través de receptores específicos de membrana, modulando así los diferentes procesos de desarrollo espermático.

Por ello, como objetivo general de este trabajo se plantea analizar la posible presencia de receptores de melatonina en los tejidos y glándulas del tracto genital masculino (ovino), tanto a nivel genético, como a nivel molecular, centrando estos estudios en testículo, epidídimos y glándulas accesorias del morueco. Los receptores objeto de estudio son los principales receptores específicos de melatonina descritos hasta la fecha en mamíferos: MT₁ y MT₂. Su presencia se estudiará en los distintos tejidos del aparato reproductor del macho: testículo anterior y posterior; cabeza, cuerpo y cola de epidídimos; ampolla deferente, próstata, vesícula seminal, conducto deferente y glándulas bulbouretrales. Como control positivo de los experimentos se utilizará retina ovina, en la cual se ha descrito anteriormente la presencia de receptores de melatonina (Coge et al. 2009).

Como primer objetivo específico se propone identificar estos receptores a nivel transcripcional, tanto a nivel cualitativo, con RT-PCR, como cuantitativo, mediante una q-PCR. Para ello, en primer lugar se extraerá el RNA de los distintos tejidos, y se procederá a su purificación y retrotranscripción, obteniendo así el cDNA correspondiente, con el que se llevará a cabo la RT-PCR y q-PCR, utilizando *primers* específicos para la amplificación de los fragmentos específicos de los dos receptores.

Y como segundo objetivo específico se investigará la presencia de estos receptores a nivel molecular, mediante la técnica inmunoquímica de Western-blot. Los pasos para ello también consistirán en la extracción de las proteínas de cada tejido y su posterior detección mediante anticuerpos específicos.

4.- PARTE EXPERIMENTAL: MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 EXPRESIÓN GENICA DE MT₁ Y MT₂ EN TEJIDOS DEL TRACTO REPRODUCTOR DEL MACHO OVINO

4.1.1 Obtención de tejidos

Los diferentes tejidos del tracto genital masculino (testículo anterior (Ta), testículo posterior (Tp), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola del epidídimo (Co), ampolla del conducto deferente (A), próstata (P), vesícula seminal (Vs), conducto deferente (Cd) y glándulas bulbouretrales (Gb) se obtuvieron a partir de machos ovinos de la raza Rasa Aragonesa, pertenecientes a ANGRA y estabulados en el Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria. Los tejidos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso, evitando de este modo la contaminación, activación de RNAsas, y degradación de proteínas. Como control positivo de los experimentos se utilizó retina de cordero (RC) de la misma raza, que se obtuvo siguiendo el mismo protocolo.

4.1.2 Aislamiento y limpieza del RNA total

El RNA total fue extraído de los diferentes tejidos del tracto reproductor masculino por homogenización de 300 mg de tejido en TRI REAGENT (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) según el método descrito por (Chomczynski and Sacchi 1987). La concentración de RNA se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm en un NanoDrop ND-100 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware). También se determinó la relación entre absorbancias a 260/280 nm requiriendo que fuera mayor de 1,2 para verificar que el RNA extraído estuviera libre de proteínas. La calidad del RNA se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE con bromuro de etidio en concentración 200 ng/ml. El proceso se realizó con tampón TBE (TRIS base 89 mM, EDTA 2 mM y ácido bórico 89 mM) a 80 V durante 30 min (EPS 1000, Pharmacia Biotech), y los geles se visualizaron con luz ultravioleta (Gel Doc, Biorad Laboratorios, Hercules, California) para comprobar la integridad de las bandas del RNA ribosómico 28S Y 18S.

La eliminación de restos de DNA en el RNA se llevó a cabo por medio del kit TURBO DNA-free de Ambion. El volumen de reacción fue 50 µL compuestos por: 5 µL de tampón, 1 µL de enzima, 10 µg de RNA (se calcula el volumen necesario dependiendo de la concentración de cada muestra) y agua DEPC (Dietilpirocarbonato; libre de RNAsas) hasta completar 50 µL. Se incubó a 37 °C durante 30 minutos, tras lo cual se añadieron 5 µL de DNase Inactivation Reagent. Se dejó 2 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 1,5 minutos a 10000 xg y se recogió el sobrenadante. Se midió la concentración mediante el NanoDrop y se guardó a -80 °C.

4.1.3 Síntesis de cDNA

El cDNA se obtuvo a partir del RNA de diferentes tejidos del tracto reproductor masculino mediante retrotranscripción con el kit Super Script III First-Strand Síntesis System (Invitrogen, Carlsbad, California). Para ello, 500 ng de RNA total se sometieron a retrotranscripción usando como *primers* Oligo (dT) y la enzima SuperScript III RT. El proceso consistió en una primera desnaturización del RNA, del primer Oligo (dT) y de los dNTPs a 65 °C durante 5 min, tras lo cual se añadió la mezcla de reacción que contiene tampón de reacción, MgCl₂, DTT, RNaseOUT y la enzima SuperScript III RT. La síntesis del cDNA se llevó a cabo a 50 °C durante 50 min, terminando la reacción a 85 °C durante 5 minutos. Para eliminar las trazas de RNA no retrotranscrita a cDNA se trató con RNasa H y se incubó a 37 °C durante 20 minutos. Todos los pasos se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler (Biorad). Los cDNA obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta su uso o se utilizaron para PCR inmediatamente.

Para comprobar el estado del cDNA obtenido en todos los tejidos se realizó una PCR del gen endógeno gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Se realizó utilizando la REDTaq DNA Polymerase de SIGMA. Los *primers* utilizados fueron: (*primer* directo: **GCTGGTGCCCTTTACCAGA**; *primer* reverso: **CAGTGCATCTCCGTGAAGGT**, que amplifican un fragmento de 90 pb).

Para minimizar errores de medida se hizo una mezcla con los componentes necesarios para la PCR. . Para las 11 muestras y el control negativo se realizó la siguiente mezcla de reacción:

	1X	12X
Agua libre de nucleasas	36,9 µl	461,25 µl
Tampón 10x	5 µl	62,5 µl
dNTP mezcla 25 µM	0,4 µl	5 µl
Primer directo 10 µM	1,6 µl	20 µl
Primer reverso 10 µM	1,6 µl	20 µl
RED Taq DNA Polimerasa	2,5 µl	31,25 µl
Volumen total:	48 µl	600 µl

Tabla 1: Mezcla de reacción para la PCR de GAPDH

Cada muestra contenía 48 µL de la mezcla y 2 µL de cDNA o agua para el control negativo.

Las condiciones de la PCR en el termociclador (S1000™ Thermal Cycler with Dual 48/48 Fast Reaction Module#185-2148, Biorad, España) fueron: desnaturización a 94 °C durante 3 minutos, tras lo cual se programaron 30 ciclos de 94 °C durante 30

segundos, 58 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 45 segundos. Al terminar los ciclos se realizó una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

Una vez terminada la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE con bromuro de etidio (0.5 µl/ml) durante 45 minutos a 100 V y 2 µl de un marcador de 50 pb para comprobar el resultado.

4.1.4 Amplificación del cDNA para la identificación de MT₁ y MT₂

Las secuencias específicas para cada enzima se amplificaron mediante la técnica PCR. Para llevar a cabo las reacciones se usó la enzima RED Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich) y todas se realizaron en un termociclador MyCycler (Biorad). Para minimizar errores de pipeteo se hizo una mezcla con los compuestos necesarios para la PCR. Cada muestra contenía 48 µL de la mezcla y 2 µL de cDNA o agua para el control negativo. La composición de la mezcla fue:

	1X	12,5X
Agua libre de nucleasas	36,9 µl	461,25 µl
Tampón 10x	5 µl	62,5 µl
dNTP mezcla 25 µM	0,4 µl	5 µl
Primer directo 10 µM	1,6 µl	20 µl
Primer reverso 10 µM	1,6 µl	20 µl
RED Taq DNA Polimerasa	2,5 µl	31,25 µl
Volumen total:	48 µl	600 µl

Tabla 2: Mezcla de reacción para la amplificación de MT₁ y MT₂

Para cada receptor, los *primers* se diseñaron utilizando el programa primer-BLAST (NCBI) y comprobando por análisis BLAST (NCBI) para verificar la especificidad génica. Los *primers* utilizados fueron: MT₁ (*Primer* directo 5'-AGGAACGCAGGAAATGTGTTG-3'; *Primer* reverso 5'-CACTAAGTTGGCAATGCAGGG-3'); MT₂ (*Primer* directo 5'-CTCTCCAAGGGCAGCCAG-3'; *Primer* reverso 5'-GGATCATCACCAAACCTCCG-3'). La PCR se llevó a cabo con el cDNA obtenido anteriormente. En primer lugar se realizó la desnaturización a 95 °C durante 3 minutos, tras lo cual se sucedieron 35 ciclos de 95 °C durante un minuto, 56 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 30 segundos. Al terminar el ciclo se sucedieron 15 minutos a 72°C para la extensión de las cadenas. Las muestras no utilizadas inmediatamente se conservaron a -20 °C.

Los productos de la amplificación se separaron mediante un gel de agarosa al 2% en tampón 1xTris-borato-EDTA (TBE) con 0,5 µL/mL de bromuro de etidio, y el resultado se visualizó con luz ultravioleta.

4.1.5 Q-PCR

La *real time-PCR* (q-PCR) permite cuantificar los niveles de expresión génica mediante la determinación de la relación entre la cantidad de un gen diana y un gen endógeno de referencia con una expresión constitutiva e invariable en las diferentes condiciones experimentales o diferentes tejidos. La expresión se comparará para los distintos tejidos calculando el valor normalizado de muestras con la misma cantidad de cDNA para cada tejido.

Los genes endógenos de referencia utilizados fueron β -actina y gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Para calcular la curva de eficiencia de cada uno de los *primers* se realizaron diluciones seriadas de muestras de RNA obtenidas de testículo posterior (4 diluciones: 1/1, 1/10, 1/100 y 1/1000) y con diferentes concentraciones de *primer* directo (PF) y *primer* reverso (PR) (en nuestro caso: PF 300: PR 300, PF 400:PR400, PF 500:PR 500). La reacción se llevó a cabo utilizando la iTaq Universal SYBR Green Supermiz (Biorad, Spain), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los *primers* utilizados son los mismos que los utilizados en RT-PCR. La reacción de q-PCR se realizó en ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA).

La eficiencia de cada medida se calculó como: $E = 10(-1/S) - 1$, siendo S la pendiente de la curva estándar.

Una vez obtenida la curva de eficiencia y elegida la concentración óptima de *primers* (en este caso fue PF300/PR300 para la GAPDH y β -Actina, y PF400/PR400 para MT₁ y MT₂) se llevó a cabo la q-PCR para cada uno de los genes diana con todos los tejidos del estudio y retina de cordero como control positivo. Para la cuantificación de los resultados se utilizó el método Pfaffl (Pfaffl 2001).

4.2 DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE TEJIDOS POR WESTERN BLOT

4.2.1 Extracción de proteínas de tejidos y espermatozoides

La extracción de proteínas en los distintos tejidos se hizo siguiendo el mismo procedimiento en todas las muestras: se partió de una porción de unos 300 mg aproximadamente de cada tejido, que se mantuvo en nieve carbónica para evitar la desnaturalización de las proteínas. A continuación se añadieron 3 ml de medio de extracción (125 mM de Tris-HCl pH 6,8, 4% de SDS (v/v), 10% (v/v) de inhibidor de proteasas 10x en agua ADDE) y se homogeneizaron con el homogeneizador de tejidos Ultra Turrax (IKA T25 Digital Ultra-Turrax(R) Homogenizer, IKA, Germany / Deutschland). El homogeneizado se centrifugó a 13000 xg, 5 minutos, a 4 °C y se recogió el sobrenadante. A cada muestra se le añadió 0,02% de azul de bromofenol, 1 % de glicerol al 20% (v/v) y 5% de β-mercaptoetanol por cada 100 µl y se dividió en alícuotas. Posteriormente se congeló a -20 °C hasta su evaluación.

La extracción de proteínas de espermatozoide se realizó partiendo de muestras de semen. Se sometió a tres procesos de lavado y centrifugación en un eppendorf en 1 ml de medio PBS (136 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄) para desechar el sobrenadante, eliminando de este modo el plasma seminal de la muestra. El precipitado se diluyó en 100 µl del mismo medio de extracción descrito anteriormente, se centrifugó a 13000 xg durante 5 minutos, a 4 °C y se recogió el sobrenadante. A la muestra se le añadió azul de bromofenol, glicerol y β-mercaptoetanol en la misma concentración que la utilizada para las proteínas de los tejidos y se dividió en alícuotas. Posteriormente se congeló a -20°C hasta su evaluación.

4.2.2 SDS-PAGE y Western blot

Se utilizó el mismo protocolo para todas las proteínas estudiadas. Se utilizaron geles del 12% y 10% de acrilamida para MT₁ y MT₂ respectivamente y de grosor 1,5 mm y 15 pocillos. Las proteínas se separaron en una dimensión siguiendo el método Laemmli (Laemmli 1970), utilizando patrones de comparación de pesos moleculares, de 10 a 250 kDa (Sigmamarker, Sigma). Las condiciones de electroforesis fueron 135 V durante 90 minutos a 4 °C. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF utilizando el Trans-blot Turbo (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Una vez transferidas las proteínas, los sitios de unión no específicos se bloquearon incubando las membranas 4 horas en PBS y con 5% (p/v) de BSA.

La detección de MT₁ se realizó mediante la incubación durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario policlonal Mel-1A-R de conejo (GeneTex) y la de MT₂ mediante el anticuerpo policlonal Mel-1b de conejo (Acris Antibodies), ambos en una dilución 1:1500 en PBS-Tween-20 (0,5 % (v/v) de Tween-20, pH 7,4 en PBS, con BSA al 1% (p/v).

Al día siguiente, se llevaron a cabo tres lavados de 15 minutos con PBS-Tween-20, tras lo cual se incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo generado en burro (LI-COR biosciences, BonsaiAdv. Tech., Madrid, Spain) en una dilución 1/30000, durante una hora y 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, las membranas se lavaron de nuevo tres veces en PBS-Tween-20 y se revelaron utilizando el sistema Odyssey CLx Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA).

5.- RESULTADOS

5.1 EXPRESIÓN GENICA DE MT1 y MT2 EN TEJIDOS DEL TRACTO REPRODUCTOR DEL MACHO OVINO

5.1.1 Obtención de RNA y cDNA

En la Tabla 3 se muestran las concentraciones de RNA obtenido de cada tejido tras el proceso de extracción y limpieza:

Cuerpo de epidídimo	202,1 ng/ µl	Cabeza de epidídimo	221 ng/ µl
Cola de epidídimo	195,6 ng/ µl	Glándulas bulbouretrales	235,1 ng/ µl
Ampolla deferente	175,8 ng/ µl	Testículo anterior	217 ng/ µl
Próstata	225 ng/ µl	Testículo posterior	217,1 ng/ µl
Vesícula seminal	220,1 ng/ µl	Retina de cordero	114,2 ng/ µl
Conducto deferente	238,05 ng/ µl		

Tabla 3: Concentración de RNA obtenido en los distintos tejidos del tracto reproductor del morueco y control positivo (retina de cordero).

Tras la síntesis de cDNA a partir de este RNA extraído, se evaluó el resultado y la validez de la retrotranscripción mediante la realización de una PCR del gen constitutivo de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), para comprobar que el estado del cDNA retrotranscrita con anterioridad es adecuado para utilizar en siguientes experimentos:

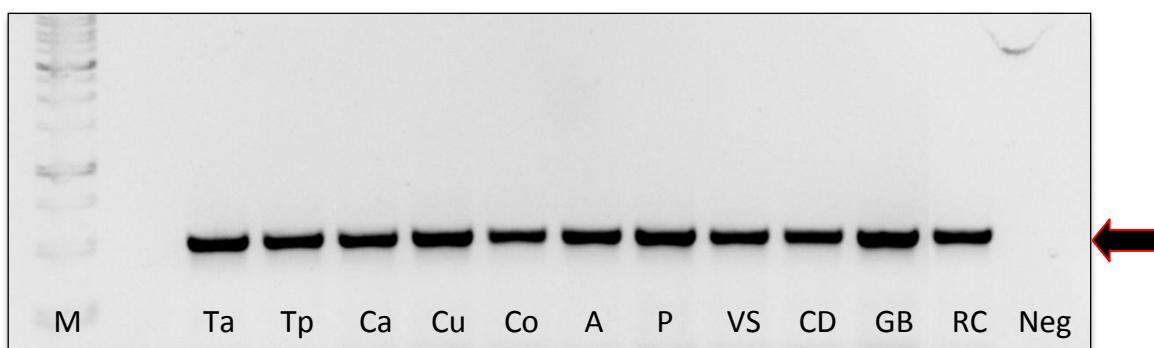


Figura 4: Expresión génica de GAPDH, evaluada por RT-PCR, en testículo anterior (Ta), testículo posterior (Tp), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola Co) de epidídimo, ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (Vs), conducto deferente (Cd), glándulas bulbouretrales (Gb), retina de cordero (RC). Neg: control negativo y M: marcador.

Como se muestra en la Figura 4, la PCR amplificó el gen de la GAPDH obteniéndose en la electroforesis posterior una banda clara y definida del fragmento en todos los tejidos excepto en el control negativo, lo cual indicó que el cDNA obtenido estaba en las condiciones correctas para trabajar. Una vez demostrada la validez del

cDNA obtenido, se pudo proceder a su utilización para la amplificación de los fragmentos correspondientes a los dos receptores de melatonina buscados, MT₁ y MT₂.

5.1.2 Resultados de RT-PCR

- Existencia de RNAm para el receptor MT₁ en los distintos tejidos

El resultado obtenido tras la PCR con los *primers* específicos para MT₁ utilizando los c-DNA conseguidos a partir de los tejidos del tracto reproductor del morueco se muestra en la Figura 5:

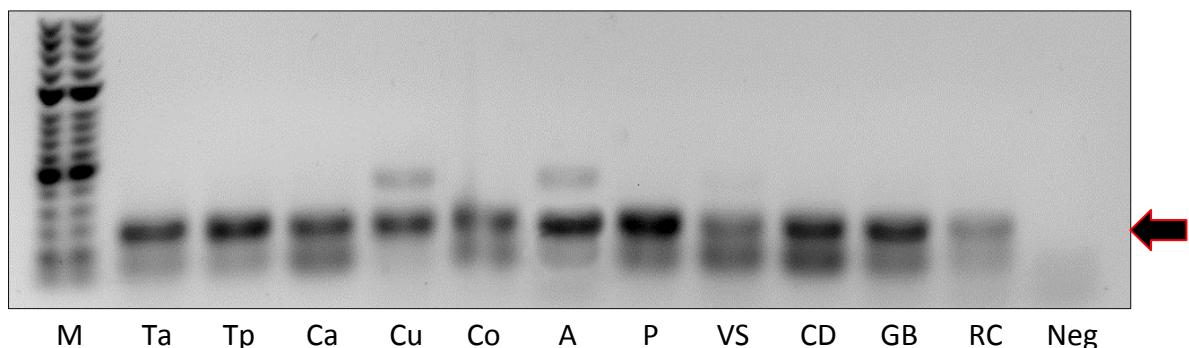


Figura 5: Expresión génica de MT₁, evaluada por RT-PCR en: testículo anterior (Ta), testículo posterior (Tp), cabeza (Ca), cuerpo (Cu), y cola (Co) de epidídimo, ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (Vs), conducto deferente (Cd), glándulas bulbouretrales (Gb), retina de cordero (RC). Neg: control negativo y M: marcador.

Mediante RT-PCR se obtuvo una banda de 136 pb en todos los tejidos estudiados, correspondiente a la amplificación del fragmento del gen MT₁. Además, no se obtuvo ningún fragmento de amplificación en el control negativo. Estos resultados demuestran la existencia de RNA mensajero codificante para la síntesis del receptor MT₁ en todos los tejidos del tracto reproductor del morueco.

Además, la RT-PCR también mostró distinta intensidad de bandas en los distintos tejidos, que podría deberse a calidad y/o cantidad de cDNA obtenido, pero también a la cantidad de receptor que se esté expresando en cada tejido. Así, estos resultados parecen indicar que la expresión génica de MT₁ es mayor en el testículo que en el resto de los tejidos del tracto reproductor, mostrando bandas más intensas también en próstata y conducto deferente, pero se hace necesario un posterior estudio cuantitativo mediante q-PCR para corroborar este dato, ya que la RT-PCR tan solo informa a nivel cualitativo.

- Existencia de RNAm para el receptor MT₂ en los distintos tejidos

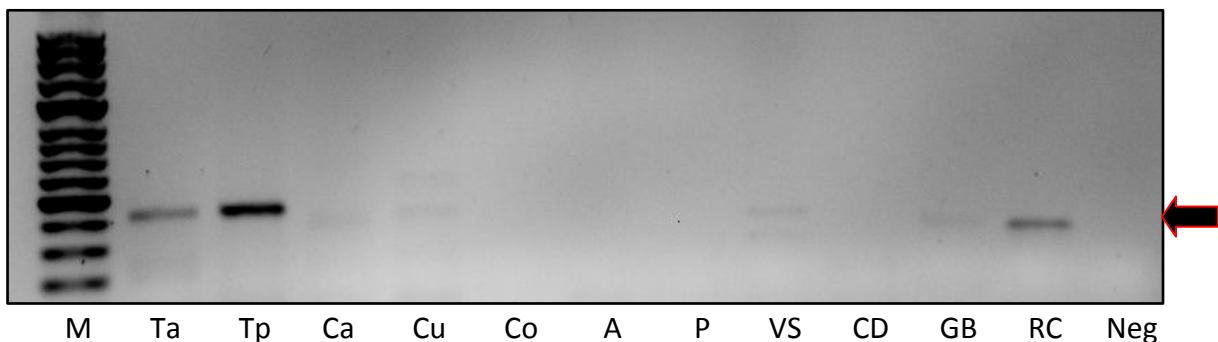


Figura 6: Expresión génica de MT₂, evaluada por RT-PCR en: testículo anterior (Ta), testículo posterior (Tp), cabeza (Ca), cuerpo (Cu), y cola (Co) de epidídimo, ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (Vs), conducto deferente (Cd), glándulas bulbouretrales (Gb), retina de cordero (RC). Neg: control negativo y M: marcador.

Mediante RT-PCR (Figura 6) se obtuvo una banda de 169 pb en alguno de los tejidos estudiados, correspondiente a la amplificación del fragmento del gen MT₂. Además, no se obtuvo ningún fragmento de amplificación en el control negativo.

Los resultados muestran una expresión génica del receptor a nivel transcripcional en testículo, tanto anterior como posterior. También se observa una banda de expresión correspondiente a la amplificación del receptor en el control positivo, es decir, en retina. En el resto de los tejidos no se observa ninguna banda definida con claridad, sin embargo, no se puede descartar algún grado de expresión debido a que sí pueden observarse algunas bandas de manera muy tenua.

Estos resultados indicarían un proceso de síntesis génica de receptor MT₂ en testículo y, en principio, muy bajo o inexistente en los demás tejidos. No obstante, éste es un estudio a nivel cualitativo, y se hace necesario analizar y cuantificar la expresión del receptor en los distintos tejidos mediante q-PCR, para obtener una información más detallada de esta expresión, como en el caso de MT₁.

5.1.3 Resultados de q-PCR

La q-PCR permitió determinar el grado de expresión génica de ambos receptores en las distintas partes y/o tejidos del tracto reproductor estudiados, utilizando la retina de cordero como control positivo. Los resultados de la q-PCR, tras la normalización mediante los dos genes de referencia utilizados, se muestran en las Figuras 7 y 8.

- Niveles de expresión de MT₁ en los distintos tejidos

Los resultados obtenidos mediante q-PCR fueron similares respecto a los obtenidos anteriormente en la RT-PCR. Como se puede observar en la Figura 7, los valores en cola de epidídimo, ampolla deferente y conducto deferente fueron notablemente elevados, y también es destacable la expresión en testículo, tanto anterior como posterior respecto al resto de tejidos, por lo que estos podrían ser los principales reguladores de su síntesis en el tracto reproductor.

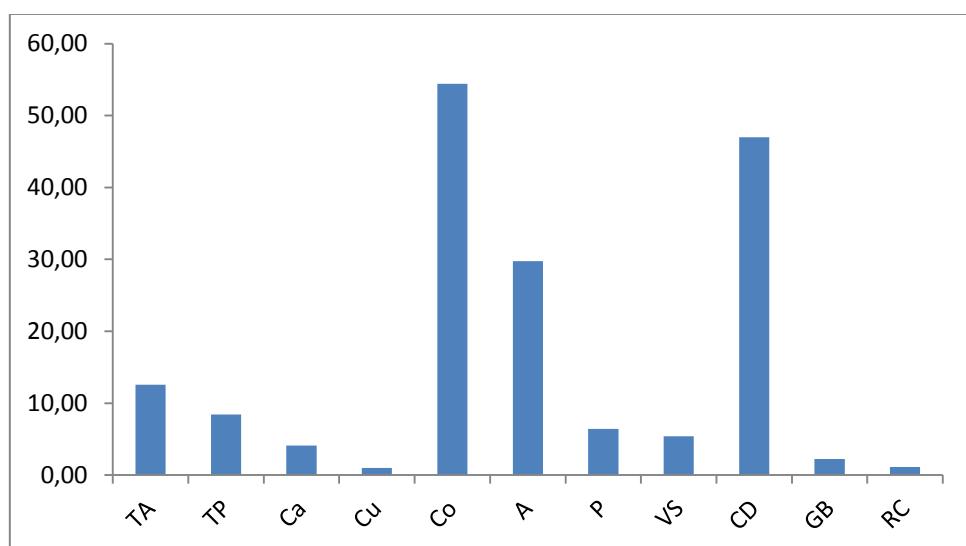


Figura 7: Expresión génica de MT₁, evaluada por q-PCR, en testículo anterior (Ta), testículo posterior (Tp), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) de epidídimo, ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (Vs), conducto deferente (Cd), glándulas bulbouretrales (Gb) y retina de cordero.

- Niveles de expresión de MT₂ en los distintos tejidos

En el caso del receptor MT₂, como se puede observar en la Figura 8, los valores de expresión más elevados fueron los correspondientes al testículo, tanto anterior como posterior, destacando sobre el resto de tejidos. Estos resultados muestran una elevada similitud con los obtenidos anteriormente mediante RT-PCR, en el que sólo se mostraban claramente definidas las bandas en testículo. En cuanto al resto de los tejidos, a pesar de que a nivel cualitativo (Figura 6) apenas se observó expresión, mediante q-PCR sí se detectaron niveles reducidos en todos ellos, lo que indicaría la síntesis en mayor o menor grado de RNA mensajero de receptor MT₂ en todos los tejidos del tracto reproductor ovino.

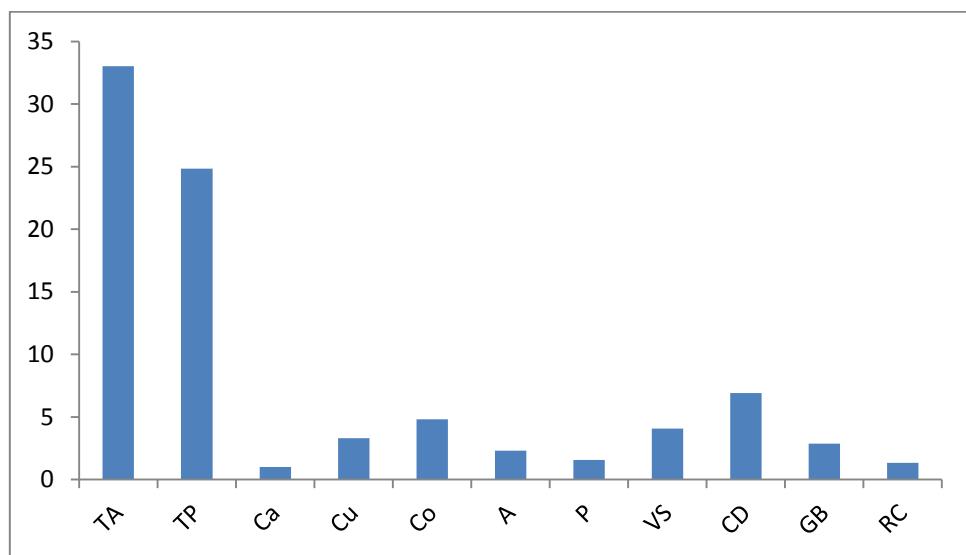


Figura 8: Expresión génica de MT₂, evaluada por q-PCR, en testículo anterior (Ta), testículo posterior (Tp), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) de epidídimo, ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (Vs), conducto deferente (Cd), glándulas bulbouretrales (Gb) y retina de cordero.

A pesar de la validez de la retina como control positivo (Coge et al. 2009), los niveles de expresión de ambos receptores en este tejido fueron más bajos que en la mayoría de los tejidos del tracto reproductor masculino, debido a que cuantitativamente respecto a los demás tejidos analizados hay menor RNA mensajero para la síntesis de receptor en retina.

5.2 INMUNODETECCION MEDIANTE WESTERN BLOTH DE LOS RECEPTORES MT₁ Y MT₂ EN TEJIDOS DEL TRACTO REPRODUCTOR DEL MORUECO

Para determinar la presencia de estos receptores estudiados en los diferentes tejidos del tracto reproductor del morueco se procedió a su identificación mediante Western-blot. Se utilizaron como control positivo proteínas extraídas de espermatozoides ovinos porque en estudios realizados previamente por nuestro grupo de investigación se demostró la existencia de los dos receptores MT₁ y MT₂ en estas células (Casao et al. 2010).

- Presencia del receptor MT₁ en los distintos tejidos

Los resultados del Western blot para MT₁ se muestran en la Figura 9:

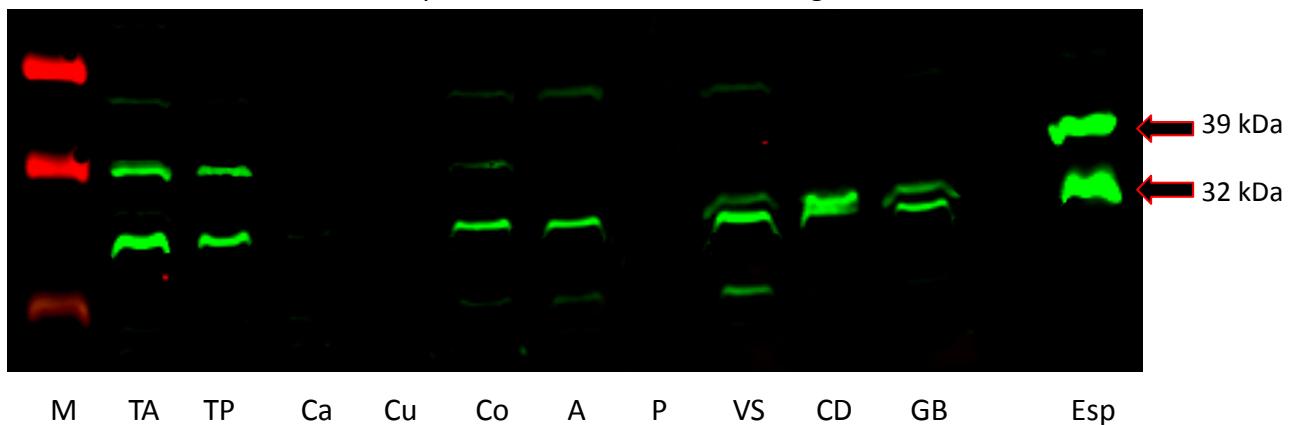


Figura 9: Presencia de MT₁, identificada mediante Western-blot con anticuerpos específicos en proteínas de testículo anterior (Ta), testículo posterior (Tp), cabeza (Ca), cuerpo (Cu), cola (Co), ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (Vs), conducto deferente (Cd), glándulas (Gb) y espermatozoide (Esp) como control positivo. M corresponde al marcador de pesos moleculares.

Como se puede observar, en la muestra de proteínas de espermatozoides se evidenciaron dos bandas claramente definidas de aproximadamente 32 kDa y 39 kDa, siendo esta última la correspondiente al peso molecular descrito para el receptor MT₁ (Reppert et al. 1994). La banda de 32 kDa correspondería al receptor activado (Casao et al. 2012).

Se observó la presencia de la banda de 39 kDa correspondiente al receptor en testículo anterior y posterior, y una banda tenue en cola de epidídimo. Además, en todos los tejidos excepto en cabeza y cuerpo de epidídimo y próstata se evidenció la banda de 32 kDa, correspondiente al receptor activado, observada también en espermatozoides.

Asimismo, se observaron unas bandas de intensidad más tenue, alrededor de 75 kDa en testículo anterior, cola de epidídimo, ampolla y vesícula seminal.

- Presencia del receptor MT₂ en los distintos tejidos

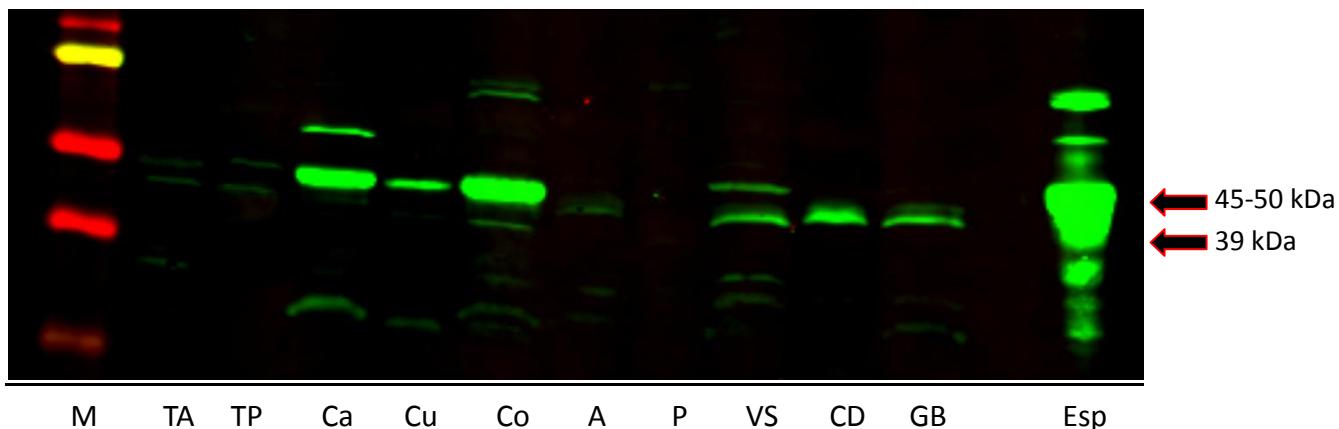


Figura 10: Presencia de MT₂, identificada mediante Western-blot con anticuerpos específicos en proteínas de testículo anterior (Ta), testículo posterior (Tp), cabeza (Ca), cuerpo (Cu), cola (Co), ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (Vs), conducto deferente (Cd), glándulas bulbouretrales (Gb) y control positivo de espermatozoide (Esp). M corresponde al marcador de pesos moleculares.

En el análisis mediante Western-blot del receptor MT₂ mostrado en la Figura 10, se observa una serie de bandas en la muestra de proteínas de espermatozoides, principalmente la de 39 kDa correspondiente al peso molecular descrito para MT₂ (Coge et al. 2009), además de una señal fuerte de doble banda entre 45-50 kDa, y una banda más débil de 75 kDa y de menor peso alrededor de 25 kDa.

En el resto de los tejidos se observa principalmente una banda en torno a los 45 kDa, sobre todo en epidídimo (cabeza, cuerpo y cola), y en vesícula seminal, conducto deferente y glándulas bulbouretrales. En testículo se observa una doble banda muy tenue de expresión del receptor en el peso de 39 kDa y de 45 kDa. También se muestran distintas bandas en algún tejido similares al patrón observado en espermatozoide, como en cabeza o cola de epidídimo, además de en vesícula seminal.

6.- DISCUSIÓN

El objetivo general del presente trabajo era investigar la existencia de receptores específicos de melatonina en los tejidos del tracto reproductor del morueco, y los resultados obtenidos permiten confirmar la presencia de los dos receptores principales descritos para melatonina en mamíferos, MT₁ y MT₂, en dichos tejidos.

En la primera parte del trabajo, correspondiendo con el primer objetivo específico, se ha demostrado la presencia de RNA mensajero para la síntesis de estos receptores en todos los tejidos del aparato reproductor ovino estudiados, y también la q-PCR ha permitido cuantificar su expresión en dichos tejidos, siendo mayoritaria en cola de epidídimo, ampolla y conducto deferente para MT₁ y en testículo para MT₂. Además, los estudios realizados mediante Western-blot, correspondientes al segundo objetivo de este trabajo, han demostrado que también existe traducción del RNA mensajero detectado por RT-PCR y q-PCR, y por tanto la síntesis de estos receptores por parte de varios de los tejidos del tracto reproductor del morueco analizados.

Sin embargo, se ha podido observar que los valores obtenidos mediante q-PCR referentes a la expresión de RNA mensajero no se correspondían en algunos tejidos con los resultados obtenidos mediante Western-blot, especialmente en el caso del receptor MT₂ en testículo, en el que los valores obtenidos por q-PCR son los más altos mientras que en Western-blot apenas hay señal visible para testículo, apreciándose solamente una banda tenue.

Esto podría deberse a que en el conjunto de todas las proteínas extraídas del testículo para el Western-blot, la proteína correspondiente al receptor MT₂ representa un porcentaje muy pequeño en el conjunto de todas las proteínas extraídas de los muchos tipos celulares presentes en el testículo (células de Sertoli, Leydig, espermatogonias, espermatocitos, espermáticas, espermatozoides... además de células de tejido conectivo y circulatorio), y que muy pocas de ellas presentan el receptor MT₂ (comunicación personal).

Otra posible explicación podría ser que en el momento de la extracción de los tejidos se expresaba RNA mensajero en testículo pero no se alcanzó el proceso de traducción para la síntesis de proteína, lo que podría implicar una regulación de expresión génica a nivel traduccional. Mediante esta regulación, se controlarían los niveles de síntesis del receptor en momentos puntuales según el requerimiento de los tejidos y la melatonina presente en éstos.

Este tipo de regulación se complementaría con otros tipos de regulación descritos como la internalización de receptores (Becker-Andre et al. 1994), un mecanismo de desensibilización de receptores que se ha descrito en humano en MT₂ (Gerdin et al. 2004) y en MT₁ en ratón (Roy et al. 2001) y ovino (Trecherel et al. 2010) tras la exposición a melatonina a corto plazo.

En el estudio mediante Western-blot del receptor MT₁, las proteínas extraídas de los tejidos revelaban una banda de 39 kDa compatible con el peso molecular descrito para el receptor y otra banda de 32 kDa que puede estar relacionada con la activación del receptor (Casao et al. 2012). Al ser receptores acoplados a proteína G, la activación del receptor produce la disociación de la proteína G en las subunidades α y $\beta\gamma$ (Dubocovich and Markowska 2005; Gilman 1995) de modo que, por consiguiente, su peso molecular disminuiría. Las bandas tenues observadas de un peso alrededor de 75 kDa podrían corresponder a la oligomerización del receptor, y estaría formado por heterodímeros MT₁/MT₂ (Ayoub et al. 2004) aunque su nivel de expresión sería pequeño.

En el análisis de MT₂ mediante Western-blot se reveló la banda de 39 kDa corespondiente al receptor (Coge et al. 2009) y otra señal fuerte que parece estar formada por dobles bandas entre 45-50 kDa. Estas últimas bandas podrían estar relacionadas con la formación de heterodímeros con otros receptores acoplados a proteína G (Pin et al. 2007) más que con la formación de homodímeros consigo mismo o heterodímeros con MT₁, debido a que en este caso no se observa apenas señal en el peso molecular de 75 kDa.

En los resultados de q-PCR en epidídimo se encontraron valores pequeños de expresión que no parecen corresponder totalmente con los resultados de Western Blot. La diferencia podría deberse a que el epidídimo contiene células espermáticas ya formadas en su interior en las que existen gran cantidad de receptores MT₂ (Casao et al. 2012), ya que el patrón de bandas es parecido al de las proteínas extraídas de espermatozoide. No obstante, esta interferencia sólo habría influido aportando una mayor intensidad a las bandas, pero no impide verificar la presencia del receptor en el tejido del epidídimo.

La función de estos receptores se complementaría con la síntesis y expresión de melatonina en el tracto reproductor de morueco, descubierta recientemente en nuestro grupo de investigación (González-Arto et al. 2014). De este modo, al efecto protector antioxidante que esta hormona puede ejercer sin unirse a ninguna estructura, se le añadirían las funciones que pueden desempeñar los receptores tras la unión a melatonina, activando las vías de transducción asociadas a estos. El efecto de la melatonina afectaría no sólo a los espermatozoides, sino que podría extenderse también a las espermatogonias y células germinales que se encuentran en los túbulos

seminíferos (Guneli et al. 2008) y los espermatozoides epididimarios (Huang et al. 2009), afectando de este modo a todo el proceso de espermatogénesis.

Esta posible regulación de la acción de la melatonina en los tejidos del tracto reproductor del morueco mediada por receptor durante la espermatogénesis influirían sobre la calidad seminal, y no solo serían aplicables al caso del morueco, sino que otras especies, incluida la humana, podrían verse influidas por los mismos mecanismos. Finalmente, los resultados de este trabajo refuerzan la idea del importante papel que desempeña la melatonina sobre la reproducción y del amplio abanico de acciones que esta hormona desarrolla a este nivel.

7.- CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

- Los experimentos llevados a cabo en este trabajo demuestran la existencia de los receptores de melatonina MT₁ y MT₂ en el tracto reproductor del morueco.
 - Ambos receptores se expresan a nivel transcripcional en todos los tejidos del tracto reproductor del morueco, mostrando niveles significativamente distintos de expresión.
 - A nivel proteico, el testículo presenta los mayores niveles de expresión de receptor MT₁, mientras que para MT₂ los mayores valores de expresión se encuentran en cabeza, cuerpo y cola de epidídimo.
-
- Experiments carried out in the present study show the existence of melatonin receptors MT₁ y MT₂ in the ovine reproductive tract.
 - Both receptors are transcriptionally expressed in all the ovine reproductive tract tissues, showing significantly different expression levels.
 - At protein level, testicle shows the highest-level expression of MT₁ receptor, while MT₂ shows its maximum expression levels in all the epididymis regions.

8.- BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, S. P., A. Mathie and J. A. Peters Guide to Receptors and Channels (GRAC), 2nd edition (2007 Revision), Br J Pharmacol. 2007 Feb;150 Suppl 1:S1-168.
- Almog, T., S. Lazar, N. Reiss, N. Etkovitz, E. Milch, N. Rahamim, M. Dobkin-Bekman, R. Rotem, M. Kalina, J. Ramon, A. Raziel, H. Breitbart, R. Seger and Z. Naor (2008). "Identification of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 MAPK as regulators of human sperm motility and acrosome reaction and as predictors of poor spermatozoan quality." J Biol Chem **283**(21): 14479-14489.
- Ayoub, M. A., C. Couturier, E. Lucas-Meunier, S. Angers, P. Fossier, M. Bouvier and R. Jockers (2002). "Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer." J Biol Chem **277**(24): 21522-21528.
- Ayoub, M. A., A. Levoye, P. Delagrange and R. Jockers (2004). "Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers." Mol Pharmacol **66**(2): 312-321.
- Becker-Andre, M., I. Wiesenbergs, N. Schaefern-Wiemers, E. Andre, M. Missbach, J. H. Saurat and C. Carlberg (1994). "Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily." J Biol Chem **269**(46): 28531-28534.
- Browning, C., I. Beresford, N. Fraser and H. Giles (2000). "Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt(1) and MT(2) receptors." Br J Pharmacol **129**(5): 877-886.
- Brydon, L., F. Roka, L. Petit, P. de Coppet, M. Tissot, P. Barrett, P. J. Morgan, C. Nanoff, A. D. Strosberg and R. Jockers (1999). "Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins." Mol Endocrinol **13**(12): 2025-2038.
- Casao, A., M. Gallego, J. A. Abecia, F. Forcada, R. Perez-Pe, T. Muino-Blanco and J. A. Cebrian-Perez (2012). "Identification and immunolocalisation of melatonin MT(1) and MT(2) receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa." Reprod Fertil Dev **24**(7): 953-961.
- Casao, A., C. Luna, R. Perez-Pe, T. Muino-Blanco and J. Cebrian-Perez (2012). Receptor mediated effect of melatonin on ram sperm calcium patterns. . 11th International Congress of the Spanish Association for Animal Reproduction, Cordoba.
- Casao, A., S. Vega, I. Palacin, R. Perez-Pe, A. Lavina, F. J. Quintin, E. Sevilla, J. A. Abecia, J. A. Cebrian-Perez, F. Forcada and T. Muino-Blanco (2010). "Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in Rasa Aragonesa rams." Reprod Domest Anim **45**(3): 425-432.
- Coge, F., S. P. Guenin, I. Fery, M. Migaud, S. Devavry, C. Slugocki, C. Legros, C. Ouvry, W. Cohen, N. Renault, O. Nosjean, B. Malpaux, P. Delagrange and J. A. Boutin (2009). "The end of a myth: cloning and characterization of the ovine melatonin MT(2) receptor." Br J Pharmacol **158**(5): 1248-1262.
- Chan, A. S., F. P. Lai, R. K. Lo, T. A. Voyno-Yasenetskaya, E. J. Stanbridge and Y. H. Wong (2002). "Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins." Cell Signal **14**(3): 249-257.
- Chan, K. H., Y. Hu, M. K. Ho and Y. H. Wong (2013). "Characterization of substituted phenylpropylamides as highly selective agonists at the melatonin MT2 receptor." Curr Med Chem **20**(2): 289-300.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.
- Dawson, D. and S. M. Armstrong (1996). "Chronobiotics--drugs that shift rhythms." Pharmacol Ther **69**(1): 15-36.

- de Jonghe, A., J. C. Korevaar, B. C. van Munster and S. E. de Rooij (2010). "Effectiveness of melatonin treatment on circadian rhythm disturbances in dementia. Are there implications for delirium? A systematic review." *Int J Geriatr Psychiatry* **25**(12): 1201-1208.
- de Lamirande, E. and C. Gagnon (1984). "Origin of a motility inhibitor within the male reproductive tract." *J Androl* **5**(4): 269-276.
- Dubocovich, M. L. and M. Markowska (2005). "Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals." *Endocrine* **27**(2): 101-110.
- Dubocovich, M. L. and J. S. Takahashi (1987). "Use of 2-[125I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(11): 3916-3920.
- Ekmekcioglu, C. (2006). "Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance." *Biomed Pharmacother* **60**(3): 97-108.
- Frungieri, M. B., A. Mayerhofer, K. Zitta, O. P. Pignataro, R. S. Calandra and S. I. Gonzalez-Calvar (2005). "Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system." *Endocrinology* **146**(3): 1541-1552.
- Gerdin, M. J., M. I. Masana and M. L. Dubocovich (2004). "Melatonin-mediated regulation of human MT(1) melatonin receptors expressed in mammalian cells." *Biochem Pharmacol* **67**(11): 2023-2030.
- Gilman, A. G. (1995). "Nobel Lecture. G proteins and regulation of adenylyl cyclase." *Biosci Rep* **15**(2): 65-97.
- González-Arto, M., T. Hamilton, E. Serrano, D. Aguilar, E. Gaspar, D. Arruga, R. Pérez-Pé, T. Muiño-Blanco, A. Casao and J. Cebrián-Pérez. (2014). Different gene expression of melatonin metabolic enzymes in ovine testis, epididymis and accessory sexual glands. XXII Congreso Internacional de la Sociedad Española de Reproducción Animal (AERA). 16-18 de Octubre de 2014., Alicante.
- Guneli, E., K. Tugyan, H. Ozturk, M. Gumustekin, S. Cilaker and N. Uysal (2008). "Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats." *Eur Surg Res* **40**(4): 354-360.
- Hazlerigg, D. G., P. J. Morgan, W. Lawson and M. H. Hastings (1991). "Melatonin Inhibits the Activation of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase in Cultured Pars Tuberalis Cells from Ovine Pituitary." *J Neuroendocrinol* **3**(6): 597-603.
- Hu, Y., M. K. Ho, K. H. Chan, D. C. New and Y. H. Wong (2010). "Synthesis of substituted N-[3-(3-methoxyphenyl)propyl] amides as highly potent MT(2)-selective melatonin ligands." *Bioorg Med Chem Lett* **20**(8): 2582-2585.
- Huang, F., H. Ning, Q. Q. Xin, Y. Huang, H. Wang, Z. H. Zhang, D. X. Xu, G. Ichihara and D. Q. Ye (2009). "Melatonin pretreatment attenuates 2-bromopropane-induced testicular toxicity in rats." *Toxicology* **256**(1-2): 75-82.
- Hunt, A. E., W. M. Al-Ghoul, M. U. Gillette and M. L. Dubocovich (2001). "Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock." *Am J Physiol Cell Physiol* **280**(1): C110-118.
- Jang, H. Y., Y. H. Kim, B. W. Kim, I. C. Park, H. T. Cheong, J. T. Kim, C. K. Park, H. S. Kong, H. K. Lee and B. K. Yang (2010). "Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development." *Reprod Domest Anim* **45**(6): 943-950.
- Jockers, R., P. Maurice, J. A. Boutin and P. Delagrange (2008). "Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new?" *Br J Pharmacol* **154**(6): 1182-1195.
- Johnston, J. D., B. B. Tournier, H. Andersson, M. Masson-Pevet, G. A. Lincoln and D. G. Hazlerigg (2006). "Multiple effects of melatonin on rhythmic clock gene expression in the mammalian pars tuberalis." *Endocrinology* **147**(2): 959-965.

- Kayumov, L., G. Brown, R. Jindal, K. Buttoo and C. M. Shapiro (2001). "A randomized, double-blind, placebo-controlled crossover study of the effect of exogenous melatonin on delayed sleep phase syndrome." *Psychosom Med* **63**(1): 40-48.
- Kyriakis, J. M., P. Banerjee, E. Nikolakaki, T. Dai, E. A. Rubie, M. F. Ahmad, J. Avruch and J. R. Woodgett (1994). "The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases." *Nature* **369**(6476): 156-160.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Larson, J., R. E. Jessen, T. Uz, A. D. Arslan, M. Kurtuncu, M. Imbesi and H. Manev (2006). "Impaired hippocampal long-term potentiation in melatonin MT2 receptor-deficient mice." *Neurosci Lett* **393**(1): 23-26.
- Levoye, A., R. Jockers, M. A. Ayoub, P. Delagrange, E. Savaskan and J. L. Guillaume (2006). "Are G protein-coupled receptor heterodimers of physiological relevance?--Focus on melatonin receptors." *Chronobiol Int* **23**(1-2): 419-426.
- Liu, Y. X. (2007). "Involvement of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 in spermatogenesis, sperm capacitation, and fertilization." *Semin Thromb Hemost* **33**(1): 29-40.
- MacKenzie, R. S., M. A. Melan, D. K. Passey and P. A. Witt-Enderby (2002). "Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure." *Biochem Pharmacol* **63**(4): 587-595.
- Masson-Pevet, M., L. Bianchi and P. Pevet (1996). "Circadian photic regulation of melatonin receptor density in rat suprachiasmatic nuclei: comparison with light induction of fos-related protein." *J Neurosci Res* **43**(5): 632-637.
- Millan, M. J., A. Gobert, F. Lejeune, A. Dekeyne, A. Newman-Tancredi, V. Pasteau, J. M. Rivet and D. Cussac (2003). "The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine2C receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways." *J Pharmacol Exp Ther* **306**(3): 954-964.
- Mor, M., S. Rivara, C. Silva, F. Bordi, P. V. Plazzi, G. Spadoni, G. Diamantini, C. Balsamini, G. Tarzia, F. Fraschini, V. Lucini, R. Nonno and B. M. Stankov (1998). "Melatonin receptor ligands: synthesis of new melatonin derivatives and comprehensive comparative molecular field analysis (CoMFA) study." *J Med Chem* **41**(20): 3831-3844.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9).
- Pin, J. P., R. Neubig, M. Bouvier, L. Devi, M. Filizola, J. A. Javitch, M. J. Lohse, G. Milligan, K. Palczewski, M. Parmentier and M. Spedding (2007). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers." *Pharmacol Rev* **59**(1): 5-13.
- Radogna, F., L. Paternoster, M. C. Albertini, C. Cerella, A. Accorsi, A. Buccini, G. Spadoni, G. Diamantini, G. Tarzia, M. De Nicola, M. D'Alessio and L. Ghibelli (2007). "Melatonin antagonizes apoptosis via receptor interaction in U937 monocytic cells." *J Pineal Res* **43**(2): 154-162.
- Reiter, R. J. (1991). "Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions." *Endocr Rev* **12**(2): 151-180.
- Reppert, S. M. (1997). "Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors." *J Biol Rhythms* **12**(6): 528-531.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver and T. Ebisawa (1994). "Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses." *Neuron* **13**(5): 1177-1185.

- Roy, D., N. L. Angelini, H. Fujieda, G. M. Brown and D. D. Belsham (2001). "Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1-7 GnRH-secreting neurons by melatonin." *Endocrinology* **142**(11): 4711-4720.
- Sack, R. L., D. Auckley, R. R. Auger, M. A. Carskadon, K. P. Wright, Jr., M. V. Vitiello and I. V. Zhdanova (2007). "Circadian rhythm sleep disorders: part I, basic principles, shift work and jet lag disorders. An American Academy of Sleep Medicine review." *Sleep* **30**(11): 1460-1483.
- Slominski, R. M., R. J. Reiter, N. Schlabritz-Loutsevitch, R. S. Ostrom and A. T. Slominski (2012). "Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions." *Mol Cell Endocrinol* **351**(2): 152-166.
- Spadoni, G., B. Stankov, A. Duranti, G. Biella, V. Lucini, A. Salvatori and F. Fraschini (1993). "2-Substituted 5-methoxy-N-acyltryptamines: synthesis, binding affinity for the melatonin receptor, and evaluation of the biological activity." *J Med Chem* **36**(25): 4069-4074.
- Tan, D. X., R. Hardeland, L. C. Manchester, S. D. Paredes, A. Korkmaz, R. M. Sainz, J. C. Mayo, L. Fuentes-Broto and R. J. Reiter (2010). "The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness." *Biol Rev Camb Philos Soc* **85**(3): 607-623.
- Travnickova-Bendova, Z., N. Cermakian, S. M. Reppert and P. Sassone-Corsi (2002). "Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(11): 7728-7733.
- Trecherel, E., M. Batailler, D. Chesneau, P. Delagrange, B. Malpaux, P. Chemineau and M. Migaud (2010). "Functional characterization of polymorphic variants for ovine MT1 melatonin receptors: possible implication for seasonal reproduction in sheep." *Anim Reprod Sci* **122**(3-4): 328-334.
- Turek, F. W. (2007). "From circadian rhythms to clock genes in depression." *Int Clin Psychopharmacol* **22**(2): S1-8.
- van Dam, H., M. Duyndam, R. Rottier, A. Bosch, L. de Vries-Smits, P. Herrlich, A. Zantema, P. Angel and A. J. van der Eb (1993). "Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein." *Embo J* **12**(2): 479-487.
- Witt-Enderby, P. A., R. S. MacKenzie, R. M. McKeon, E. A. Carroll, S. L. Bordt and M. A. Melan (2000). "Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of the human mt1 melatonin receptor." *Cell Motil Cytoskeleton* **46**(1): 28-42.
- Witt-Enderby, P. A., M. I. Masana and M. L. Dubocovich (1998). "Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor." *Endocrinology* **139**(7): 3064-3071.

9.- ANEXOS

PÓSTER CONGRESO BIFI:

EXPRESIÓN GÉNICA DE RECEPTORES DE MELATONINA EN EL TRACTO REPRODUCTOR DE MORUECO

AGUILAR RECATE, D¹, GASPAR TORRUBIA, A.E¹, GONZÁLEZ-ARTO, M, HAMILTON T. R, PÉREZ-PÉ R, MUÑO-BLANCO, T, CASAO, A., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.



Department of Biochemistry and Molecular and Cellular Biology, Instituto de Investigación de las Ciencias Ambientales de Aragón-IUCA, Faculty of Veterinary, University of Zaragoza, Spain



INTRODUCCIÓN

La hormona melatonina es una de las sustancias biológicamente activas más antiguas de los organismos vivos y desempeña una gran variedad de funciones. Una gran parte de estas funciones las ejerce principalmente interaccionando con los receptores transmembrana acoplados a proteína G, MT₁ y MT₂, los cuales intervienen en diferentes vías de transducción de señal. Nuestro grupo de investigación ha demostrado la presencia de melatonina en plasma seminal ovino, manteniendo niveles constantes a lo largo del día aunque menores que los nocturnos. Asimismo, en dichos estudios también se ha verificado la existencia de enzimas responsables de la síntesis de melatonina en el tracto reproductor del morueco. Estos resultados sugieren que podría existir una síntesis de melatonina independiente de los ritmos circadianos en el tracto reproductor del macho, que sería responsable de los niveles de dicha hormona presentes en el plasma seminal. Una cuestión que quedaría por esclarecer sería si la melatonina es capaz de ejercer alguna acción directa sobre los propios tejidos del tracto genital masculino. Con este fin, en este trabajo se analizó la existencia de los dos receptores principales de melatonina, MT₁ y MT₂, en los distintos tejidos del aparato reproductor del morueco.

MATERIAL Y MÉTODOS

ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL

Los tejidos analizados en este estudio (testículo anterior y posterior, cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, conducto deferente y ampolla, próstata, vesícula seminal y glándulas bulbouretrales) se obtuvieron a partir de dos machos ovinos de la raza Rasa Aragonesa, sacrificados en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Y se congelaron inmediatamente. El RNA total se extrajo mediante homogenización de 300 mg de cada tejido en TriReagent (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, Estados Unidos) según el método descrito por Chomczynski y Sacchi(1987). Para la retrotranscripción se partió de 500 ng de ARN y se utilizó el kit SuperScript III (Invitrogen, CA, USA).

En la RT-PCR para la identificación de MT₁ y MT₂ se utilizó la enzima RED Taq DNA Polymerase de SIGMA. Los primers utilizados fueron: MT₁ (Primer directo 5'-AGGAACCGCAGGAATGTGTTG-3'; Primer reverso 5'-CACTAAGTTGCAATGCAGGG-3'); MT₂ (Primer directo 5'-CTCTTCCAAGGGAGCCAG-3'; Primer reverso 5'-GGATCATCACAAACCTCCCG-3'). Se llevaron a cabo 35 ciclos de amplificación, cuyas condiciones fueron 95 °C durante 1 min, 56 °C durante 1 min y 72 °C durante 30 s. Al principio se procedió a una desnaturación inicial durante 3 min a 95 °C, y al final, 15 min de extensión a 72 °C.

Para q-PCR los genes endógenos de referencia fueron β-actina y GAPDH. Se utilizaron los mismos primers que en la reacción de RT-PCR para MT₁ y MT₂ y se calculó la curva de eficiencia realizando diluciones seriadas de testículo posterior y diferentes concentraciones de primer. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando la iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, España). Se utilizó el método Pfaff para determinar la expresión de los receptores relativa a los dos genes de referencia utilizados.

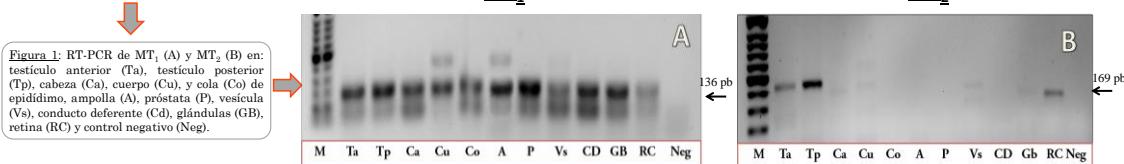
DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN-BLOTH

Se partió de una porción de aproximadamente 300 mg para cada tejido, se añadieron a continuación 3 ml de medio de extracción (125 mM de Tris-HCl pH 6.8, 4% de SDS (v/v), 10% (v/v) de inhibidor de proteasas 10x en agua ADDE).

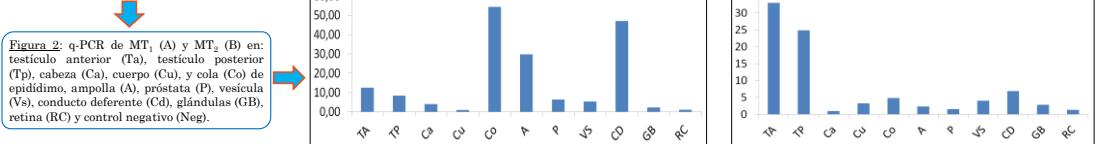
Se utilizaron geles del 12% y 10% de acrilamida para MT₁ y MT₂ respectivamente y de grosor 1,5 mm y 15 píccilos. La detección de MT₁ se realizó mediante la incubación durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario polyclonal Mel-1A-R de conejo (GeneTex) y la de MT₂ mediante el anticuerpo polyclonal Mel-1b de conejo (Acris Antibodies), ambos en una dilución 1:1500 en PBS-Tween-20 (0,5 % (v/v) de Tween-20, pH 7,4 en PBS, con BSA al 1% (v/v). Al día siguiente se llevaron a cabo tres lavados de 15 minutos con PBST y se incubó con el anticuerpo secundario donkey anti-rabbit (LI-COR biosciences, BonsaiAdv. Tech, Madrid, Spain) en una dilución 1/30000. La detección y el análisis se realizaron mediante un lector ODYSSEY (Li-Cor Biosciences).

RESULTADOS

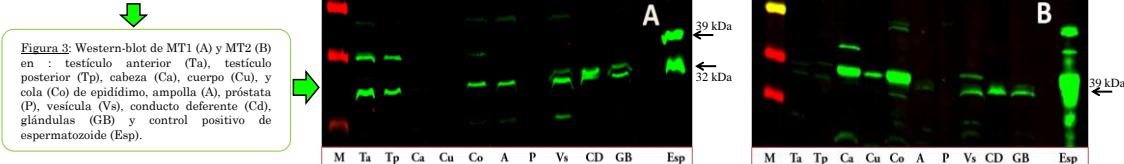
ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL CUANTITATIVO



ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL CUANTITATIVO



ANÁLISIS PROTEICO



DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio demostrarían la existencia de receptores específicos de melatonina en el aparato reproductor del morueco mediante la identificación de los dos receptores principales descritos para melatonina, MT₁ y MT₂, y se expresaría mayoritariamente en testículo en el caso del receptor MT₁ y en las diferentes partes del epidídimo en el caso de MT₂, al efecto protector antioxidante que esta hormona puede ejercer sin unirse a ninguna estructura, se le añadirían se le añadirían las funciones que pueden desempeñar los receptores tras la unión a melatonina, activando las vías de transducción asociadas a estos y no sólo afectando a los espermatozoides, sino también a todo el proceso de la espermatogénesis. Esta posible regulación de la acción de la melatonina en los tejidos del tracto reproductor del morueco mediada por receptor durante la espermatogénesis influirían sobre la calidad seminal, y no solo serían aplicables al caso del morueco, sino que otras especies, incluida la humana, podrían verse influidas por los mismos mecanismos. Finalmente, los resultados de este trabajo refuerzan la idea del importante papel que desempeña la melatonina sobre la reproducción y del amplio abanico de acciones que esta hormona desarrolla a este nivel.

1- Estos autores han contribuido por igual al desarrollo experimental

Agradecimientos: CICYT AGL2013-43328-Py DGA 2015-A26FSE.

Congreso ITEA:

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES DE MELATONINA MT₁ Y MT₂ EN EL TRACTO REPRODUCTOR DEL MORUECO

Aguilar, D. González-Arto, M., Gaspar, E., A., Pérez-Pé, R., Muñoz-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A y Casao.A

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Facultad de Veterinaria, Zaragoza. España.

martagonzalezarto@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La hormona melatonina es una de las sustancias biológicamente activas más antiguas de los organismos vivos y desempeña una gran variedad de funciones (Reiter et al. 2013). Una gran parte de estas funciones las ejerce principalmente interaccionando con los receptores transmembrana acoplados a proteína G, MT₁ y MT₂, los cuales intervienen en diferentes vías de transducción de señal (Dubocovich and Markowska 2005). La melatonina se sintetiza principalmente en la glándula pineal durante la noche, y, como consecuencia de ello, sus niveles en plasma sanguíneo son prácticamente inexistentes durante el día (Reiter. 1991). Sin embargo, recientes estudios de nuestro grupo de investigación han demostrado la presencia de melatonina en plasma seminal ovino (Casao et al. 2010), y que en este fluido la melatonina mantiene niveles constantes a lo largo del día. Estudios posteriores de nuestro grupo también han verificado la existencia de las enzimas responsables de la síntesis de melatonina en el tracto reproductor de morueco (González-Arto et al. 2014), lo que indicaría una cierta capacidad de síntesis de esta hormona en el tracto reproductor del macho. La melatonina, tanto endógena como exógena, produce una mejora no solo de la calidad seminal, sino también del volumen y la concentración del eyaculado de morueco (Rosa et al. 2012), lo que sugiere una acción de la melatonina sobre la espermatogénesis. Además, debido a su acción antioxidante (Reiter et al. 2000) y antiapoptótica (Casao et al. 2010), la melatonina presente en el tracto genital del macho podría ejercer un efecto protector sobre los espermatozoides no solo durante la espermatogénesis, sino también en el momento de la eyaculación. Con el objetivo de empezar a comprender el mecanismo de acción de la melatonina en el sistema reproductivo del macho, en este trabajo se analizó la posible existencia de los dos receptores principales de melatonina, MT₁ y MT₂, en los distintos tejidos del aparato reproductor del morueco (testículo, epidídimo y glándulas accesorias).

MATERIAL Y METODOS

Los tejidos analizados en este estudio (testículo anterior y posterior, cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, conducto deferente y ampolla, próstata, vesícula seminal y glándulas bulbouretrales) se obtuvieron a partir de dos machos ovinos de la raza Rasa Aragonesa pertenecientes a ANGRA, sacrificados en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Una vez obtenidos, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para su conservación, y el ARN total se extrajo mediante homogenización de 300 mg de cada tejido en Trioreagent (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, Estados Unidos) según el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Para la retrotranscripción se partió de 500 ng de ARN y se utilizó el kit SuperScript III (Invitrogen, CA, USA). Para amplificar las secuencias específicas de cada receptor se diseñaron primers específicos a través de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information): MT₁ (Primer directo: 5'-AGGAACGCAGGGATGTGTTG-3'; Primer reverso: 5'-CACTAAGTTGGCAATGCAGGG-3'); MT₂ (Primer directo: 5'-CTCTCCAAGGGCAGCCAG-3'; Primer reverso: 5'-GGATCATCACCAAACCTCCCG-3'). A partir de 2 µL de ADNc de cada tejido se llevaron a cabo 35 ciclos de

amplificación, cuyas condiciones fueron 95 °C durante 1 min, 56 °C durante 1 min y 72 °C durante 30 s. Asimismo, se llevó a cabo un paso de desnaturación inicial durante 3 min a 95 °C, y al final, 15 min de extensión a 72 °C. Los productos de la PCR se separaron en un gel de agarosa al 2% en un buffer Tris–borato–EDTA (TBE) con 0.5 µL/mL de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA), y se visualizaron posteriormente bajo luz ultravioleta. Como control positivo se utilizó retina de ovino (Coge et al. 2009). Para cuantificar los niveles de expresión génica de los receptores en cada uno de los tejidos, se llevó a cabo una PCR en tiempo real utilizando iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos). La cuantificación se realizó por medio del método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y se determinó la expresión relativa de dichos genes en relación a dos genes endógenos (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GaDHF): Primer directo: 5'-CAAGGTCCATCCATGACAACTTG-3'; Primer reverso: 5'-GTCCACCACCTGTTGCTGTAG-3' y actina: (Primer directo: 5'-CTCTCCAGCCTTCCTCCT-3'; Primer reverso: 5'-GGGCAGTGATCTCTTCTGC-3') por medio del método Pfaff.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La retrotranscripción del ARN obtenido en los distintos tejidos del tracto genital del morueco demostró la amplificación de fragmentos de un tamaño coincidente con el esperable para MT₁ (136 pb) en todos los tejidos estudiados (Fig. 1a) y para MT₂ (169 pb) en testículo anterior y posterior, así como en la retina (Fig. 1b). Por su parte, la PCR a tiempo real para el receptor MT₁ determinó que los niveles de expresión de este receptor eran más elevados en cola de epidídimos, ampolla y conducto deferente que en el resto de los tejidos. En el caso del receptor MT₂, los valores de expresión más elevados fueron los correspondientes al testículo, mientras que el resto de tejidos los niveles de expresión fueron menores, aunque detectable en todos ellos. (Fig. 2).

Aunque altos niveles de expresión génica de los receptores de melatonina en el testículo, sobre todo las observadas en el caso del MT₂, podrían deberse a la expresión génica de los receptores en la membrana de los espermatozoides (Casao et al. 2012) durante la espermatogénesis o la maduración espermática en el epidídimos, la presencia de estos receptores en otros tipos celulares en el testículo o el epidídimos tampoco debe descartarse, como sugiere su presencia en las glándulas accesorias. En resumen, los resultados obtenidos sugieren que la melatonina podría actuar a través de estos receptores e influenciar la calidad seminal, y consecuentemente, la capacidad fecundante de los eyaculados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Casao, A., Gallego, M., Abecia, J. A., Forcada, F., Pérez-Pé, R., Muñoz-Blanco, T. and Cebrián-Pérez, J. Á. 2012. 24(7): 953-961.
- Casao, A., Cebrián, I., Asumpcão, M.E., Pérez-Pé, R., Abecia, J.A., Forcada, F., Cebrián-Pérez, J.A., Muñoz-Blanco, T. 2010. ReprodBiolEndocrin 8 (1): 59.
- Casao, A., Mendoza, N., Pérez-Pé, R., Grasa, A., Abecia, J. A., Forcada, F., Cebrián-Pérez, J. A. and Muñoz-Blanco, T. 2010. 48(1): 39-46.
- Coge, F., Guenin, S. P., Fery, I., Migaud, M., Devavry, S., Slugocki, C., Legros, C., Ouvry, C., Cohen, W., Renault, N., Nosjean, O., Malpaux, B., Delagrange, P. and Boutin, J. A. 2009. 158(5): 1248-1262.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. 162(1): 156-159.
- Dubocovich, M. L. and Markowska, M. 2005. 27(2): 101-110.
- González-Arto, M., Hamilton, T.S.R., Serrano, E., Aguilar, D., Gaspar, E., Arruga, D., Pérez-Pé, R., Muñoz-Blanco, T., Casao, A., Cebrián-Pérez, J.A. Reprod. Domest. Anim 49 (4), 97-125.
- Reiter, R. J. 1991. 12(2): 151-180.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C. and Gitto, E. 2000. 7(6): 444-458.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Rosales-Corral, S. and Manchester, L. C. 2013. 13(3): 373-384.

• Rosa, H. J. D., Silva, C. C. and Bryant, M. J. 2012. 102(2–3): 197-201.

Agradecimientos: CICYT-FEDER AGL2013-43328-P, DGA A26FSE y Gobierno Vasco (BFI-2010-229 MOD:AE).

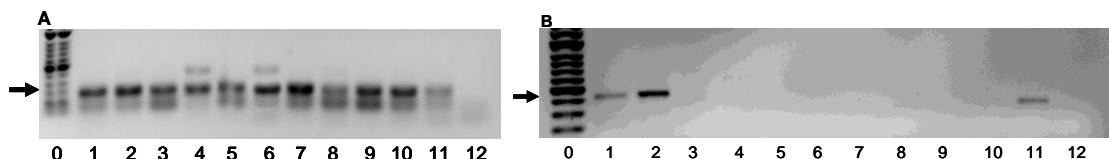


Figura 1.Expresión génica de (A) MT_1 y (B) MT_2 en testículo anterior (1) y posterior (2), cabeza (3), cuerpo (4) y cola de epidídimo (5), ampolla (6), próstata (7), vesícula seminal (8), conducto deferente (9), glándulas bulbouretrales (10), retina (11) y control negativo (12). Marcador de tamaño molecular (0); la flechas indican 100 pb (A) y 150 pb (B).

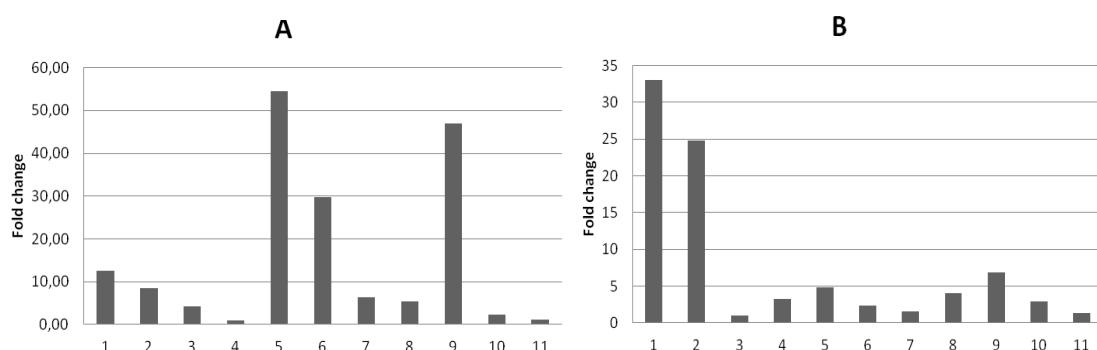


Figura 2.Cuantificación de la expresión génica de MT_1 (A) y MT_2 (B) obtenida por q-PCR en testículo anterior (1) y posterior (2), cabeza (3), cuerpo (4) y cola de epidídimo (5), ampolla (6), próstata (7), vesícula seminal (8), conducto deferente (9), glándulas bulbouretrales (10) y retina (11).

IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF MELATONIN RECEPTOR GENE EXPRESSION, MT_1 AND MT_2 IN THE RAM GENITAL TRACT

ABSTRACT: Melatonin is a ubiquitous molecule present in a wide range of organisms and involved in multiple functions. Many of these actions are mediated by MT_1 and MT_2 G-protein coupled receptor subtypes, which are involved in different signal transduction pathways. The objective of this study was to determine the gene expression of the two MT_1 and MT_2 melatonin receptors in the gonads and accessory sexual glands of ovine by RT-PCR and quantitative real time PCR. Our findings evidenced that MT_1 and MT_2 mRNA are expressed in different levels in the gonad, epididymis and sexual glands of the ram. Quantitative real time PCR showed that MT_1 expression levels are higher in epididymis tail, ampulla and vas deferens whereas MT_2 highest expression values are showed in the testis. These results suggest that melatonin may act through these receptors and influence semen quality, and consequently, the fertilizing capacity of ejaculates.

Keywords: MT1 receptor, MT2 receptor, gene expression, reproductive tract

