



# ESTUDIO DE LAS VÍAS DE DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE LA MELATONINA EN EL TRACTO REPRODUCTOR MASCULINO DE LA ESPECIE OVINA

## STUDY OF ENZYMATIC MELATONIN BREAKDOWN PATHWAYS IN MALE REPRODUCTIVE TRACT ON OVINE SPECIES.

Memoria presentada por la alumna Paula Martínez Marcos para optar al título de Graduada en Biotecnología por la Universidad de Zaragoza.

Dirigida por:

Adriana Casao Gascón

Grupo de Biología y Biotecnología de la Reproducción  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular  
Facultad de Veterinaria  
Curso 2015-2016



**Universidad**  
Zaragoza



La Dra. Adriana Casao Gascón, Profesora Contratada Doctor del  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la  
Universidad de Zaragoza

**INFORMA:**

Que la alumna Dña. Paula Martínez Marcos, ha realizado bajo mi  
dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin  
de Grado titulado "Estudio de las vías de degradación enzimática de  
la melatonina en el tracto reproductor masculino de la especie ovina".  
Este trabajo cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFG en  
Biotecnología, por lo que se considera procedente su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo la presente en  
Zaragoza a 20 de Julio de 2016.

**Adriana Casao Gascón**

# ÍNDICE

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumen                                                                                       | 1  |
| Abstract                                                                                      | 2  |
| Antecedentes                                                                                  | 3  |
| Planteamiento del trabajo y objetivos                                                         | 9  |
| Materiales y métodos                                                                          | 11 |
| <i>Expresión génica de MPO, IDO1 e IDO2 en tejidos del tracto reproductor del macho ovino</i> | 11 |
| <i>Obtención de tejidos</i>                                                                   | 11 |
| <i>Aislamiento y limpieza del ARN total</i>                                                   | 11 |
| <i>Síntesis del ADNc</i>                                                                      | 12 |
| <i>Amplificación del ADNc para la identificación de MPO, IDO1 e IDO2</i>                      | 12 |
| <i>q-PCR</i>                                                                                  | 13 |
| <i>Detección de las proteínas de tejidos por Western Blotting</i>                             | 13 |
| <i>Extracción de proteínas de los tejidos</i>                                                 | 13 |
| <i>SDS-PAGE y Western-Blot</i>                                                                | 14 |
| Resultados y discusión                                                                        | 15 |
| <i>Resultados de la extracción de ARN y proteínas de los tejidos</i>                          | 15 |
| <i>Obtención de ARN</i>                                                                       | 15 |
| <i>Comprobación de la calidad del ADNc</i>                                                    | 15 |
| <i>Obtención de proteínas</i>                                                                 | 15 |
| <i>Presencia de MPO</i>                                                                       | 15 |
| <i>RT-PCR</i>                                                                                 | 15 |
| <i>Western-blot</i>                                                                           | 16 |
| <i>Presencia de IDO (Isoformas 1 y 2)</i>                                                     | 18 |
| <i>RT-PCR</i>                                                                                 | 18 |
| <i>Western-blot</i>                                                                           | 19 |
| <i>Análisis cuantitativo de la expresión génica de MPO, IDO1 e IDO2</i>                       | 20 |
| Conclusiones                                                                                  | 22 |
| Conclusions                                                                                   | 22 |
| Bibliografía                                                                                  | 23 |
| Anexos                                                                                        | 26 |
| <i>Anexo I: Material complementario a Materiales y métodos</i>                                | 26 |
| <i>Anexo II: Material complementario a Resultados y discusión</i>                             | 28 |

## RESUMEN

La melatonina es una de las moléculas más antiguas y biológicamente activas. Se encuentra en una amplia variedad de organismos, siendo su principal función la defensa antioxidante. La melatonina es sintetizada en la glándula pineal durante la noche, y es degradada por diversos órganos como el hígado, cerebro o retina.

Estudios previos han determinado la presencia de las enzimas de síntesis de melatonina en el testículo ovino (serotonin-N-acetiltransferasa (AANAT) y N-acetilserotonin-O-metiltransferasa (ASMT)) y altas concentraciones de melatonina en el plasma seminal ovino. Sin embargo, las posibles vías de degradación de esta hormona en el tracto reproductor del macho no han sido estudiadas previamente.

Con el fin de determinar si la melatonina es degradada en el aparato reproductor del morueco, se realizaron diversos estudios de las principales vías de degradación enzimática de la hormona en los tejidos del tracto genital (testículo, epidídimo y glándulas accesorias) mediante RT-PCR, q-PCR y Western-Blot. Las enzimas que se estudiaron fueron: Mieloperoxidasa (MPO), Indoleamina-2,3-dioxigenasa 1 (IDO1) y 2 (IDO2).

Se demostró la expresión génica mediante RT-PCR de las tres enzimas en todos los tejidos estudiados, mientras que la q-PCR permitió comprobar que la expresión génica de la enzima MPO es predominante sobre IDO1 e IDO2 en casi todos los tejidos, siendo el testículo y glándulas bulbouretrales los tejidos que presentan los mayores niveles de expresión. Mediante Western-Blot, se demostró la traducción de la proteína MPO en las glándulas bulbouretrales, aunque en el caso de IDO, los resultados obtenidos no fueron concluyentes.

En conclusión, nuestros resultados indican la existencia de una ruta de degradación enzimática de la melatonina en el tracto genital. Dado que los metabolitos producidos en la degradación de esta hormona son compuestos antioxidantes, su producción en el aparato reproductor podría tener una implicación directa en la defensa de los espermatozoides ante las especies reactivas de oxígeno.

## ABSTRACT

The melatonin hormone is one of the oldest and biological active molecules. It can be found in a vast variety of organisms, and its main function is the antioxidant defense. Melatonin is synthesized in pineal gland during the night and it is broken down by several organs, like kidney and liver.

Researches carried out by our group have determined the presence of melatonin synthesizing enzymes in ovine testis (serotonin-N-acetyltransferase (AANAT) and N-acetylserotonin-O-methyltransferase (ASMT)) and high concentrations of melatonin in the ovine seminal plasma. However, the possible melatonin pathways of melatonin break-down have not been studied previously.

In order to determine whether melatonin is broken down in the reproductive tract of the ram, we conducted a series of studies about the main pathways of melatonin enzymatic break-down in genital tract tissues (testis, epididymis and accessory glands) by RT-PCR, q-PCR and Western-Blot. The enzymes studied were: Myeloperoxidase (MPO), Indolamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO1) and 2 (IDO2).

The genetic expression of the three enzymes was demonstrated in all the tissues studied, while q-PCR let verify that the genetic expression of MPO is predominant over IDO1 and IDO2 in almost all the tissues, being testis and bulbourethral glands the ones that show the highest levels of expression. MPO translation in bulbourethral glands was demonstrated by Western-Blot. However the results obtained were not conclusive in the case of IDO.

In conclusion, our results indicate the presence of melatonin enzymatic break-down in the genital tract. Given that the metabolites produced in the break-down of this hormone are antioxidant compounds, their production in the genital tract could have a direct implication in the spermatozoa defense against oxygen reactive species.

## ANTECEDENTES

### La melatonina y sus funciones

La hormona melatonina es probablemente una de las moléculas más antiguas, ya que está presente en una amplia variedad de organismos (bacterias, eucariotas unicelulares, algas, plantas, vertebrados e invertebrados) y participa en gran variedad de funciones mediante un mecanismo de acción complejo (Reiter et al. 2013). El hecho de que esta sustancia sea sintetizada en mitocondrias y cloroplastos (Tan et al. 2013), podría explicar su amplia distribución en la naturaleza.

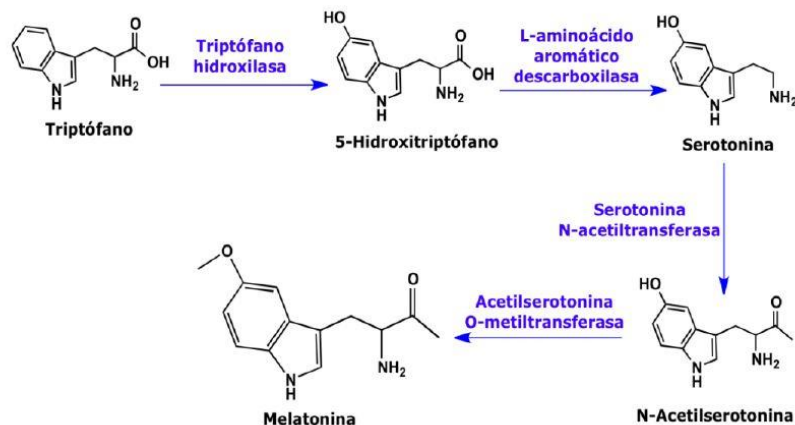
En la mayoría de los vertebrados, la melatonina circulante es sintetizada por la glándula pineal (Axelrod et al. 1965) y su secreción está controlada por el fotoperiodo, presentando un máximo de concentración nocturno y niveles basales diurnos. Este patrón de secreción regula ciclos circadianos, como la temperatura del cuerpo y el ciclo del sueño (Turek 2007), la reproducción estacional (Chemineau et al. 2008) y el metabolismo glucídico y lipídico (Zhernakova and Rybnikova 2008). Sin embargo, la principal función que se le atribuye a esta hormona, clasificada como multifuncional (Reiter et al. 2010), sería la defensa ante el estrés oxidativo (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS).

### Metabolismo de la melatonina

En animales, la melatonina está sintetizada exclusivamente a partir del aminoácido esencial triptófano, mientras que en otros organismos, como bacterias, puede seguir rutas de síntesis alternativas, y sintetizarse a partir de D-eritrosa-4-fosfato y fosfoenolpiruvato (ver revisión (Tan et al. 2014)). Como se ha comentado anteriormente, la melatonina sanguínea presente en la mayoría de los vertebrados es sintetizada por la glándula pineal (Axelrod, Wurtman et al. 1965); sin embargo, estudios recientes también demuestran la síntesis de melatonina en otros tejidos y su presencia en diversos fluidos biológicos (Acuña-Castroviejo et al. 2014). No obstante, frente a las múltiples funciones de la melatonina pineal, la principal función que se ha atribuido a esta melatonina extrapineal estaría relacionada con sus propiedades antioxidantes (Zhang and Zhang 2014).

Mientras que el metabolismo de degradación de la melatonina es un proceso muy complejo, compuesto por múltiples enzimas y vías, la ruta de síntesis de melatonina en vertebrados ha sido intensamente caracterizada.

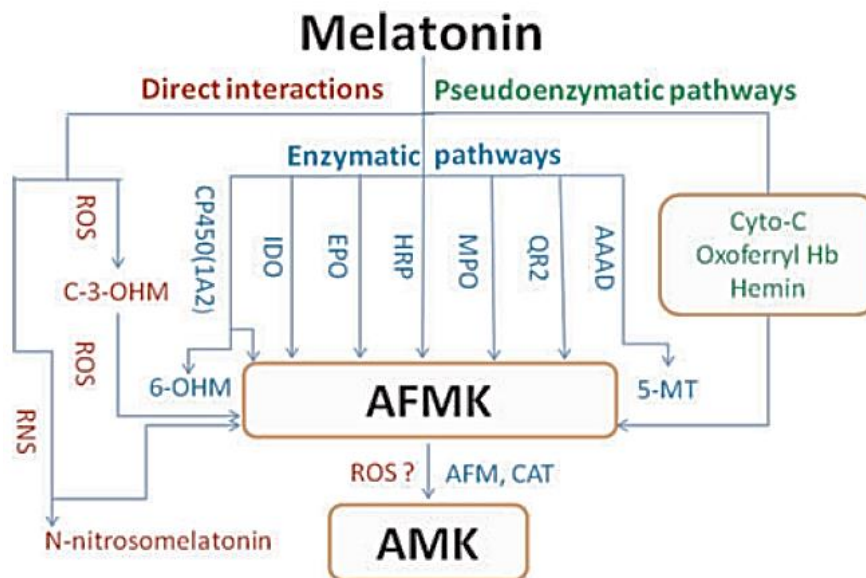
El proceso de síntesis de melatonina es una reacción de cuatro pasos en los que intervienen cuatro enzimas (Figura 1). En un primer paso, el triptófano se metaboliza a 5-hidroxitriptófano por acción de la enzima triptófano-5-monooxigenasa (T5M); a continuación, su transformación a 5-hidroxitriptamina (más conocida como serotonina) está catalizada por la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (AAAD); posteriormente, la serotonina se acetila por acción de la enzima serotonín-N-acetiltransferasa (AANAT) formando N-acetilserotonina y por último, se forma la melatonina, en una reacción catalizada por la N-Acetilserotonina O-metiltransferasa (ASMT) (Tan, Zheng et al. 2014).



**Figura 1:** Ruta de síntesis de melatonina en vertebrados (Boutin et al. 2005)

Al contrario que en la ruta de síntesis, los mecanismos metabólicos de degradación de melatonina son más complejos y menos caracterizados (ver revisión (Tan, Zheng et al. 2014)).

Existen dos mecanismos involucrados en la degradación de la melatonina: una interacción directa independiente de enzimas y una catálisis enzimática (que a su vez puede ser realizada mediante vías pseudoenzimáticas o enzimáticas) (figura 2).



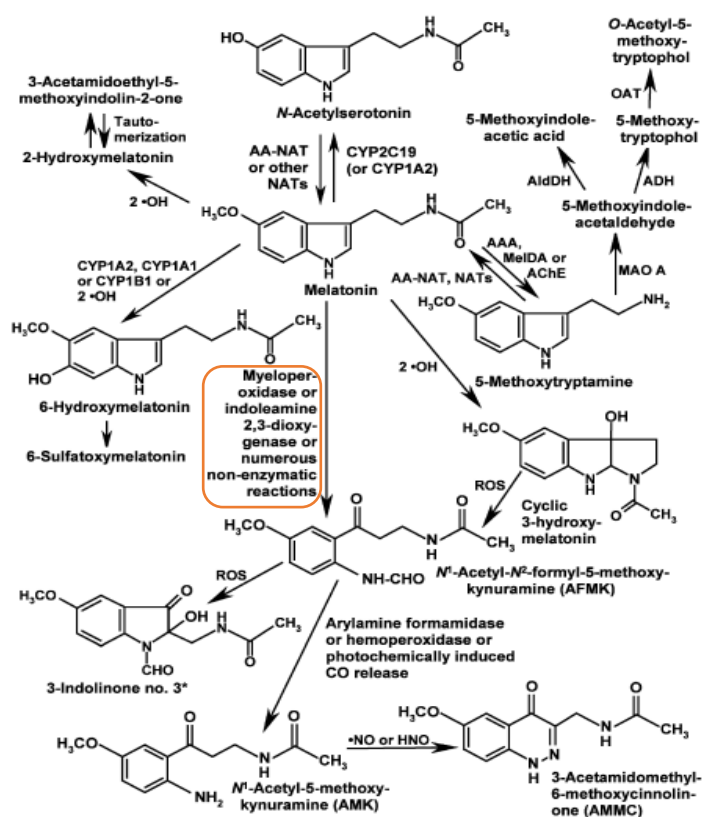
**Figura 2:** Rutas de degradación de melatonina (Tan et al. 2010). **AAA:** aril acilamidasa; **AFM:** ariamina formamidasa; **AFMK:** N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxikinuramina; **AMK:** N<sup>1</sup>-acetil-5-metoxikinuramina; **CAT:** catalasa; **C-3-OHM:** 3-hidroximelatonina cíclica; **CP450(1A2):** citocromo P450 (1A2); **Cyto-C:** Citocromo C; **EPPO:** eosinofil peroxidasa; **HRP:** Peroxidasa de rábano; **IDO:** indoleamina-2,3-dioxigenasa; **MPO:** mieloperoxidasa; **Oxoferril Hb:** Oxoferril hemoglobina; **5-MT:** 5-metoxitriptofamina; **6-OHM:** 6-hidroximelatonina; **RNS:** especies reactivas de nitrógeno; **ROS:** especies reactivas de oxígeno.

### 1. Interacción directa:

En este caso, la melatonina puede ser degradada en un proceso en el que intervienen especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno para proporcionar directamente N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxikynuramina (AFMK), metabolito con gran poder antioxidante, o 2-hidroximelatonina y 3-hidroximelatonina cíclica, que posteriormente pueden ser metabolizados a AFMK (Tan et al. 2007).

### 2. Vía pseudoenzimática

La melatonina también puede ser degradada mediante una reacción pseudoenzimática en la que intervienen el Citocromo C y la Oxoferil Hemoglobina. En ambos casos se obtiene AFMK como producto de la reacción (figura 2) (Tan, Hardeland et al. 2010).



**Figura 3:** Ruta de degradación de melatonina por vías enzimáticas (Hardeland 2008). **AAA:** aril acilamidasa; **AA-NAT:** arilalquilamina N-acetiltransferasa; **AChE:** acetilcolina esterasa; **ADH:** alcohol deshidrogenasa; **AldDh:** aldehído deshidrogenasa; **CYP:** isoformas citocromo P<sub>450</sub> (monooxigenasa o dealquilasa); **MelDA:** melatonina deacetilasa; **NATs:** N-acetiltransferasas; **OAT:** O-acetiltransferasa; **ROS:** especies reactivas de oxígeno

### 3. Vías enzimáticas:

En el hígado de los mamíferos, las principales rutas de degradación de la melatonina son llevadas a cabo por las isoformas del citocromo P450 (principalmente el citocromo CYP1A2), que, mediante actividad monooxigenasa, forma AFMK, y 6-hidroximelatonina, que es sulfatada y excretada por la orina (Tan, Manchester et al. 2007). Algunas isoformas del citocromo P450 (CYP2C19 y CYP1A2) también son capaces de demetilar la melatonina a su precursor, N-acetilserotonina (Hardeland 2008) (figura 3).

Por otro lado, la melatonina puede ser deacetilada a 5-metoxitriptamina por las enzimas aril y butiril acilamidasa o por la enzima melatonina deacetilasa, que es específica de melatonina (Hardeland 2010).

Por último, la formación de subproductos con actividad antioxidante en la degradación de la melatonina también puede realizarse por diferentes vías enzimáticas en las que participan enzimas como la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), que transforma la melatonina en AFMK. Esta misma reacción está también catalizada por las enzimas mieloperoxidasa (MPO), eosinofil peroxidasa (EPPPO) o catalasa (CAT) (Ferry et al. 2005) (Figuras 1 y 2). De todas ellas, la principales vías de degradación de la melatonina están catalizadas por MPO e IDO, y a pesar de que ambas enzimas tienen alta afinidad por el sustrato, la oxidación llevada a cabo mediante MPO parece ser la que tiene mayor importancia (Boutin, Audinot et al. 2005).

Por otro lado, estudios previos indican que la enzima IDO llevaría a cabo dos reacciones: la primera de ellas, como dioxigenasa independiente de hidrógeno, catalizaría la oxidación del L-triptófano para formar N-formilkinureina (NFK), y su segunda función sería como peroxidasa, para la que utilizaría hidrógeno como co-sustrato y oxidaría la melatonina formando AFMK (Boutin, Audinot et al. 2005). Recientemente se ha descrito la presencia de otro gen con gran homología con IDO (ahora IDO1), denominado IDO2 (Fatokun et al. 2013). Las proteínas codificadas por ambos genes muestran sitios catalíticos muy conservados cuando son alineadas y parece que desarrollan una función muy similar, por lo que se ha sugerido que la posible existencia de ambos genes se debe a una regulación muy coordinada de ambos (Fatokun, Hunt et al. 2013).

### Productos metabólicos de la melatonina

Como se ha visto, los productos metabólicos enzimáticos y no enzimáticos originados por la degradación de la melatonina se solapan, siendo difícil determinar cuál de ellos se degrada por cada vía. Además, el principal metabolito producido por la oxidación de la melatonina, AFMK, también puede ser metabolizado por una arilamina formamidasa o catalasa para formar N<sup>1</sup>-acetil-5-metoxikinuramina (AMK), otra amina biológicamente activa y también con gran actividad antioxidante. (Tan, Manchester et al. 2007).

Estos dos compuestos podrían explicar algunas de las acciones de la melatonina *in vivo*, ya que numerosas reacciones que tienen como sustrato la melatonina derivan en la formación de AFMK, que tiene gran capacidad antioxidante. Además, este compuesto es frecuentemente el principal producto en diversos sistemas de oxidación, especialmente cuando dichas rutas están diseñadas para no generar radicales libres (Tan et al. 2003). De hecho, cuanto mayor es

el estado oxidativo celular, mayores cantidades de AFMK son producidas (Tan, Manchester et al. 2007).

En el caso del AMK, ha sido tradicionalmente considerado un producto de reacción final, porque aparece en la orina. Sin embargo, es improbable que no tenga ninguna función en el organismo, ya que se ha observado que este metabolito es fácilmente oxidable y que reacciona con las especies reactivas de nitrógeno (Ressmeyer et al. 2003). De hecho, sus niveles en orina son muy bajos, por lo que se estima que la mayor parte del AMK que se produce es consumido en el organismo (Tan, Manchester et al. 2007).

El proceso por el que la melatonina y sus metabolitos derivados inactivan las especies reactivas de nitrógeno y oxígeno es a través de una cascada de reacciones, y de esta forma, una única molécula de melatonina puede inactivar hasta 10 moléculas de ROS/RNS. Esto proporciona a la melatonina una alta efectividad a bajas concentraciones para proteger a los organismos del estrés oxidativo y por tanto, es frecuente encontrar melatonina en órganos que están frecuentemente expuestos a altos niveles estrés oxidativo (Tan, Manchester et al. 2007).

### **Melatonina en la reproducción de la especie ovina**

Una de las principales funciones de la melatonina, además de su función antioxidante, es la regulación de la reproducción en especies estacionales. El principal motivo de la reproducción estacional en las distintas especies es asegurar que la descendencia nace en primavera/verano, permitiendo una abundante alimentación de las crías y así su supervivencia (ver revisión (Cebrián-Pérez et al. 2014)).

En la regulación de la reproducción en especies estacionales de día corto, como la ovina, la secreción de melatonina nocturna producida por la glándula pineal, estimula el eje hipotálamo/hipofisario/gonadal. Así, el aumento de niveles nocturnos de melatonina estimula la secreción de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) por parte del hipotálamo, que actúa sobre la hipófisis anterior, donde aumenta la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), responsables de la actividad ovárica en la hembra y de la producción de esperma en el macho (Malpaux et al. 1997, Malpaux et al. 1999)

En el caso de la hembra, también se ha observado una acción directa de la melatonina en el ovario y en el desarrollo del folículo preovulatorio, donde su principal función parece ser la actuación como molécula antioxidante en el fluido folicular durante el desarrollo de los ovocitos (Takada et al. 2012). Así, la presencia de la melatonina inhibiría la apoptosis y el daño en el ADN causado por las ROS (Takada, Junior et al. 2012) en estos gametos, que son una de las causas de infertilidad más comunes.

Por el contrario, en el morueco la estacionalidad reproductiva está menos marcada que en la oveja, ya que la producción de espermatozoides es continua durante todo el año. A pesar de este hecho, también se ha observado un descenso del comportamiento sexual y de la calidad seminal en la época no reproductiva (Karagiannidis et al. 2000, Avdi et al. 2004). Esta pérdida de la función reproductiva en el macho también está asociada a la no estimulación del eje hipotálamo-hipófisis-testículo por la melatonina (Lincoln et al. 1990). De hecho, tratamientos con melatonina exógena en época no reproductiva aumentan la espermatogénesis y la fertilidad del morueco (Palacín et al. 2008).

Al igual que en la hembra ovina, en el macho la melatonina también parece tener una acción directa sobre los espermatozoides. Diversos estudios han mostrado un efecto beneficioso de la melatonina en los espermatozoides en diversas especies, incluida la ovina. La incubación de estas células con melatonina exógena, mejora parámetros de viabilidad y motilidad (Ortiz et al. 2011), y reduce el daño oxidativo y los niveles intracelulares de ROS y RNS (du Plessis et al. 2010). Además, la incubación de espermatozoides con melatonina también muestra una disminución de parámetros apoptóticos en muchas especies, entre ellas la ovina (Casao et al. 2010).

Como se ha comentado anteriormente, la melatonina está presente en otros fluidos biológicos aparte del plasma sanguíneo (Acuña-Castroviejo, Escames et al. 2014). Uno de los fluidos en los que se ha observado la presencia de melatonina es el plasma seminal ovino (Casao et al. 2010), donde esta hormona alcanza altas concentraciones durante el día, siendo más elevadas incluso que las concentraciones sanguíneas nocturnas. Por tanto, la melatonina presente en el plasma seminal podría actuar como un protector del eyaculado frente al daño oxidativo.

Estos altos niveles de melatonina en el plasma seminal podrían deberse a una baja degradación de esta hormona en el tracto reproductor del macho o a una síntesis extrapineal de la misma en estos tejidos. Este último punto se ha demostrado muy recientemente, con la presencia de las enzimas de síntesis de melatonina en los tejidos del tracto reproductor del macho ovino (Gonzalez-Arto et al. 2016), principalmente en el testículo.

Así, la función de la melatonina secretada por los testículos podría ser la misma que la que tiene el fluido folicular preovulatorio, protegiendo a los espermatozoides del daño oxidativo y la fragmentación del ADN durante la espermatogénesis en los túbulos seminíferos y su maduración en el epidídimo, y evitando de este modo una posible infertilidad (Agarwal et al. 2008).

## **PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS**

La melatonina es una hormona ampliamente distribuida en los organismos y desempeña una gran diversidad de funciones. Su degradación ha sido atribuida principalmente al hígado, retina y cerebro (Hirata et al. 1974, Cahill and Besharse 1989). Como resultado de su degradación, se producen los metabolitos AFMK y posteriormente AMK, que también desempeñan una importante función antioxidante (Tan, Manchester et al. 2007).

Investigaciones anteriores han demostrado la presencia de melatonina en altas concentraciones en el plasma seminal del morueco durante el día (Casao, Cebrián et al. 2010), y también la presencia de las enzimas de síntesis de la hormona en los tejidos del tracto reproductor del morueco (Gonzalez-Arto, Hamilton et al. 2016), sobre todo en el testículo. Sin embargo, apenas hay datos sobre la posible ruta de degradación de esta hormona en el sistema reproductor del macho.

La síntesis de espermatozoides conlleva una estricta regulación de las especies reactivas de nitrógeno y oxígeno para evitar el daño oxidativo de los futuros gametos (Sarabia et al. 2009), por lo que la presencia tanto de la melatonina como de los metabolitos procedentes de su degradación podría ser fundamental para su correcto desarrollo.

Por tanto, en este trabajo se intenta empezar a identificar las rutas de degradación de la melatonina en el tracto genital del macho ovino, centrándonos en la vía enzimática. Para ello intentaremos corroborar la siguiente hipótesis:

La melatonina es degradada por vía enzimática en alguno de los tejidos y/o glándulas del sistema reproductor del macho ovino, lo que liberaría los metabolitos antioxidantes AFMK y AMK que actuarían directamente en el aparato genital y los espermatozoides.

En concreto, en este trabajo se plantean los siguientes objetivos:

1. Determinar la posible degradación de la melatonina por la vía enzimática en los tejidos del tracto reproductor del morueco, mediante la identificación de las enzimas implicadas.

2. Dado que en la degradación enzimática de la melatonina hay varias enzimas implicadas, principalmente MPO, IDO1 e IDO2, identificar cuál de ellas es la predominante en estos tejidos.

Para ello, se analizará la posible presencia de las enzimas implicadas en la degradación de melatonina en los tejidos y glándulas del tracto genital masculino ovino, a nivel genético y molecular, centrando estos estudios en testículo, epidídimo y glándulas accesorias del morueco. Trabajos previos del grupo han demostrado la ausencia en estos tejidos de CYP1A2 (datos sin publicar), por lo que las enzimas a estudiar son las otras tres más relevantes en la degradación de la melatonina, y que catalizan su transformación en N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxikinuramina (AFMK): mieloperoxidasa (MPO), indoleamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO1) e indoleamina 2,3-dioxigenasa 2 (IDO2). Su presencia se estudiará en los distintos tejidos del aparato reproductor del macho: testículo, cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, ampolla, próstata, vesícula seminal, conducto deferente y glándulas bulbouretrales.

A nivel transcripcional, esta identificación se hará tanto a nivel cualitativo, con RT-PCR, como cuantitativo con q-PCR, para determinar los niveles de expresión génica de cada una de ellas. Para ello, en primer lugar se extraerá el ARN de los tejidos, y se procederá a su purificación y retrotranscripción, obteniendo el ADNc correspondiente, con el que se llevará a cabo la RT-PCR y q-PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para las tres enzimas.

La presencia de estas enzimas a nivel molecular se realizará mediante la técnica Western-Blot. Para ello, se extraerán las proteínas de cada tejido y su detección se realizará mediante anticuerpos específicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **EXPRESIÓN GÉNICA DE MPO, IDO1 E IDO2 EN TEJIDOS DEL TRACTO REPRODUCTOR DEL MACHO OVINO**

#### **OBTENCIÓN DE TEJIDOS**

El estudio de la expresión génica y cuantificación de proteínas se realizó en los diferentes tejidos del tracto genital masculino (testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) de epidídimo, ampolla del conducto deferente (A), próstata (P), vesícula seminal (VS), conducto deferente (CD) y glándulas bulbouretrales (GB), que se obtuvieron a partir de dos machos ovinos de raza Rasa Aragonesa, sacrificados en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Zaragoza. Los tejidos se almacenaron a -80 °C hasta su uso, con el objetivo de evitar activación de RNasas, y degradación de proteínas. Como control positivo se utilizó hígado de cordero (H), que se obtuvo posteriormente siguiendo el mismo protocolo.

#### **AISLAMIENTO Y LIMPIEZA DEL ARN TOTAL**

El ARN total se extrajo de los diferentes tejidos del tracto reproductor masculino por homogeneización de 300 mg de tejido en TRI REAGENT (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) según el método descrito por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987). La concentración de ARN se obtuvo midiendo la absorbancia a 260 nm en un NanoDrop ND-100 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Se comprobó que el ratio de absorbancias 260/280 nm fuera alrededor de 2 para determinar su pureza. La calidad del ARN se confirmó también mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE (10,8 g/L TRIS base, 0,4% de EDTA y 5,5 g/L de ácido bórico) con bromuro de etidio a una concentración final de 200 ng/mL. Los geles se corrieron en TBE a 80 V durante 30 min (EPS 100, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) y se visualizaron en luz ultravioleta (Gel Doc, Biorad Laboratorios, Hercules, California) para comprobar la presencia de las bandas de ARN ribosómico 28S y 18S.

Se realizó la limpieza de trazas de ADN por medio del kit TURBO DNA-free de Ambión (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). El volumen de reacción fue 50 µL y estaba compuesto por 5 µL de tampón 10X, 1 µL de DNasa, 10 µg de ARN (volumen variable en función de la concentración de las muestras) y agua DEPC hasta completar 50 µL. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos, tras lo cual se añadieron 5 µL de DNase Inactivation Reagent para inactivar la DNasa y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla se centrifugó un minuto y medio a 10.000 x g y se recogió el sobrenadante. La concentración de ARN se determinó de nuevo mediante espectrofotometría y se almacenó a -80 °C, o se utilizó inmediatamente para retrotranscripción.

## SÍNTESIS DE ADNc

El ADNc se obtuvo a partir del ARN obtenido de los tejidos del tracto reproductor masculino mediante retrotranscripción con el kit “Super Script III First-Strand Syntesis System” (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos). Para ello 500 ng de ARN total se sometieron a retrotranscripción usando como primers Oligo-(dT)<sub>20</sub> y la enzima Super Script III RT. El proceso consistió en una primera desnaturalización del ARN, junto con el primer Oligo-(dT)<sub>20</sub> (5 µM) y 1 mM de una mezcla de dNTPs a 65 °C durante 5 min, tras lo cual se añadió la mezcla de reacción que contenía 2 µL de tampón de RT 10X, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> mM, 2 µL de DTT 0,1 M, y 1 µL de cada una de las enzimas RNaseOUT y Super Script III RT. La síntesis del ADNc se llevó a cabo a 50 °C durante 5 min, y se terminó la reacción a 85 °C durante 5 min. Para eliminar las trazas de ARN no retrotranscritas a ADNc, la mezcla se trató con RNasa H durante 20 min a 37 °C. Todos los pasos se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler (Biorad Laboratories, Hercules, California). Los ADNc obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta su uso o se utilizaron para PCR inmediatamente.

Para comprobar el estado del ADNc obtenido en todos los tejidos se realizó una PCR del gen endógeno GAPDH (gliceraldehído fosfato deshidrogenasa), con cebadores de secuencias específicas para su amplificación (Anexo I, tabla 1) y utilizando el kit “REDTaq DNA Polymerase” (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos).

Todos los cebadores específicos para las enzimas utilizados en este proyecto (Anexo I, tabla 1) se diseñaron utilizando los programas Primer3 y Beacon Designer© Free Edition.

La mezcla de reacción utilizada para la amplificación se muestra en el Anexo I, tabla 2. En cada PCR se utilizaron 48 µL de mezcla de reacción y 2 µL de ADNc o agua libre de DNAsas y RNAsas (Ambión, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) para el control negativo.

Las condiciones de la reacción de PCR en el termociclador fueron: desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos, tras lo cual se suceden 30 ciclos consistentes en 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, alineamiento a 58 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 45 segundos. Al terminar los ciclos se realizó una extensión final de 5 minutos a 72°C.

Terminada la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE con bromuro de etidio a una concentración final de 200 ng/mL durante 45 minutos a 100 V y 2 µL de marcador de peso molecular 50 pb para comprobar el resultado.

## AMPLIFICACIÓN DEL ADNc PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MPO, IDO1 E IDO2.

Las secuencias específicas para cada enzima estudiada se amplificaron mediante la técnica PCR. Los reactivos y la mezcla de reacción utilizada fueron los mismos que para la amplificación de GAPDH (Anexo I, tabla 2).

La reacción de PCR se llevó a cabo con el ADNc de cada uno de los tejidos obtenidos anteriormente, y los genes se amplificaron con cebadores con secuencias específicas para cada gen (Anexo I, tabla 1), siguiendo el protocolo que se muestra en el Anexo I, tabla 3.

Los productos de la amplificación obtenidos tras la PCR se separaron mediante un gel de agarosa al 3% en TBE con bromuro de etidio a una concentración final de 200 ng/mL durante 45 minutos a 100 V y 2  $\mu$ L de marcador de peso molecular de 50 pb. El resultado se visualizó con luz ultravioleta.

### **CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MPO, IDO1 E IDO2 MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL (q-PCR)**

La PCR a tiempo real nos permite la cuantificación de los niveles de expresión génica mediante la determinación del ratio entre la cantidad de un gen diana y un gen endógeno de referencia con una expresión constitutiva e invariable en las diferentes condiciones experimentales. La expresión se comparará calculando el valor normalizado de muestras con la misma cantidad de ADNc para cada tejido.

Los genes endógenos utilizados en nuestro trabajo fueron  $\beta$ -actina y GAPDH. La reacción se llevó a cabo utilizando la enzima iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad Laboratories, Hercules, California), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los cebadores utilizados son los mismos que los utilizados en RT-PCR (Anexo I, tabla 1) con una concentración óptima de 300 mM para la GAPDH y  $\beta$ -Actina y 200 mM para MPO, IDO1 e IDO2. La reacción de q-PCR se realizó en ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Se realizaron 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 min a 60 °C, precedidos por un paso de desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C. Finalmente se realizó una curva de *melting* consistente en 15 segundos a 95 °C, 1 min a 60 °C y 15 segundos a 95 °C.

El ADNc de cada tejido se analizó por triplicado +para cada uno los genes, y para minimizar errores de pipeteo se hizo una mezcla de reacción con los compuestos necesarios para la q-PCR. Cada muestra se compuso por 18  $\mu$ L de mezcla de reacción y 2  $\mu$ L de ADNc o agua en el caso del control negativo. La composición de la mezcla de reacción utilizada para la q-PCR de los distintos genes se muestra en el Anexo I, tabla 4.

Para el cálculo de la expresión génica de cada una de las enzimas de interés se utilizó el método  $\Delta\Delta C_t$ , y los resultados se expresaron como *fold change* ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ).

### **DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE TEJIDOS POR WESTERN BLOTTING**

#### **EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LOS TEJIDOS**

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 de cada tejido mantenido a -80 °C y se añadieron a continuación 3 mL de tampón de extracción (125 mM de Tris-HCl pH 6,8, 4% (v/v) SDS, 10% (v/v) de inhibidor de proteasas 10X (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos)) y se homogeneizaron con el homogeneizador de tejidos Ultra Turrax (IKA T25 Digital Ultra-Turrax® Homogenizer, Staufen, Alemania). El homogeneizado se centrifugó a 13.000 x g durante 5 minutos a 4 °C y se recogió el sobrenadante. La concentración de proteínas de cada muestra se evaluó mediante el método Bradford y se congelaron a -20°C hasta su evaluación.

## SDS-PAGE y Western-Blot

Se utilizó el mismo protocolo para todas las proteínas estudiadas. Cada muestra se diluyó hasta contener 10 µg de proteínas en tampón de carga (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 2,5% (v/v), azul de bromofenol 0,002% (v/v), 5% de β-mercaptoetanol y 10% de glicerol. Se utilizó agua como control negativo (proporción 1:1 con tampón de carga). Las muestras se cargaron en geles con el 10% de acrilamida, de grosor 1 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 (Biorad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos). Las condiciones de electroforesis fueron 130 V durante 90 min. a 4 °C.

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF utilizando el sistema Trans-blot Turbo (Biorad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos). Una vez transferidas las proteínas, los sitios no específicos de unión de las membranas se bloquearon incubándolas un mínimo de 2 horas en PBS (136 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0,1% (p/v) de Tween 20) con BSA al 5% (p/v).

La detección de MPO se realizó mediante la incubación durante una noche a 4 °C con el anticuerpo primario policlonal Anti-Myeloperoxidase antibody (Abcam, Reino Unido). La detección de las isoformas deIDO se realizó mediante el anticuerpo anti-IDO (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Estados Unidos), ambos generados en conejo y a una dilución 1:1500 en T-PBS (0,1% de Tween-20 (p/v) en PBS) con BSA al 1% (p/v).

Al día siguiente, se llevaron a cabo tres lavados de las membranas de 15 minutos con T-PBS, tras lo cual se incubaron con el anticuerpo secundario *donkey anti-rabbit* (LI-COR biosciences, Lincoln, NE, Estados Unidos) a una dilución 1/30000 (v/v) en T-PBS con BSA al 1% (p/v) durante una hora y cuarto a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, las membranas se lavaron de nuevo tres veces en T-PBS y se revelaron utilizando el sistema Odyssey CLx Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, Estados Unidos).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

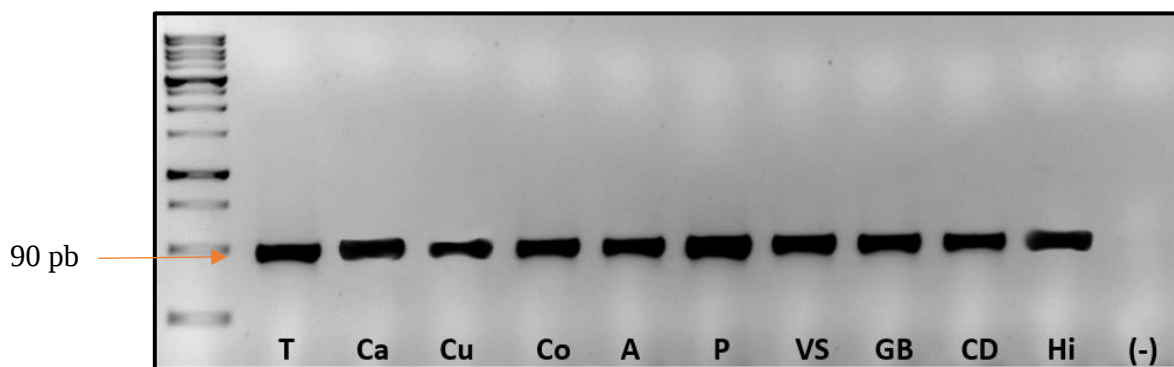
### RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN DE ARN Y PROTEÍNAS DE TEJIDOS

#### OBTENCIÓN DE ARN

Las concentraciones de ARN de cada tejido obtenidas tras su extracción y limpieza se indican en el Anexo II, tabla 5.

#### COMPROBACIÓN DE CALIDAD DEL ADNc

Tras la limpieza del ARN y su retrotranscripción, se comprobó la calidad del ADNc obtenido mediante una PCR del gen constitutivo GAPDH (figura 4). Mediante esta prueba se corrobora el buen estado del material genético obtenido, con el que se realizarán las diferentes pruebas para estudiar la expresión génica de las enzimas de nuestro proyecto.



**Figura 4:** Expresión génica de GAPDH, evaluada por RT-PCR, en testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) de epidídimo, ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (VS), conducto deferente (CD), glándulas bulbouretrales (GB), hígado (Hi) y control negativo (-).

El resultado de esta PCR nos confirmó el buen estado del ADNc retrotranscrito de todos los tejidos, ya que se obtiene una única banda definida, correspondiente a la amplificación de un fragmento específico del gen GAPDH en todas las muestras excepto en el control negativo. Una vez realizada esta validación, se puede utilizar este ADNc para la amplificación de los genes de degradación de melatonina en los tejidos.

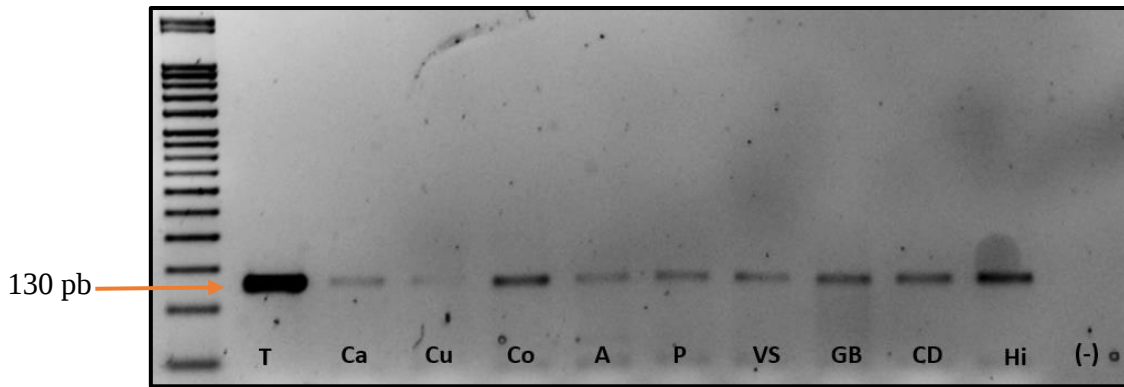
#### OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS

Las concentraciones de proteínas obtenidas tras su extracción en los distintos tejidos del tracto reproductor del morueco y en el hígado se muestran en el Anexo II, tabla 6.

### PRESENCIA DE MPO

#### RT-PCR

El resultado obtenido en la RT-PCR con los primers específicos para la amplificación del gen de MPO a partir de los ADNc del tracto reproductor del morueco se muestra en la figura 5.



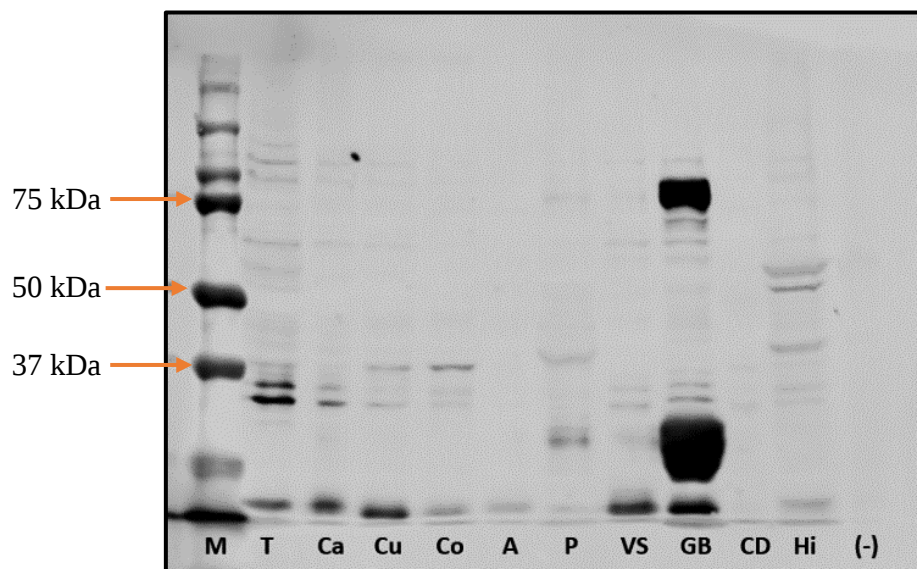
**Figura 5:** Expresión génica de MPO, evaluada por RT-PCR, en testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) de epidídimo, ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (VS), conducto deferente (CD), glándulas bulbouretrales (GB), hígado (Hi) y control negativo (-).

Se obtuvo una banda de 130 pb en todos los tejidos estudiados con diferencias de intensidad, correspondiente a la amplificación del fragmento de gen de MPO, y no se obtuvo amplificación en el control negativo. Así, se demuestra la existencia de ARNm codificante para la síntesis de MPO en todos los tejidos del tracto reproductor del morueco.

Las diferentes intensidades de banda observadas, podrían deberse a la calidad y cantidad de ADNc obtenido o a diferencias en la expresión génica de esta enzima en cada tejido, sugiriendo que el testículo expresa más MPO que el resto de los tejidos, incluyendo el hígado, nuestro control positivo. Es necesario un estudio por q-PCR para corroborarlo.

### WESTERN-BLOT

La presencia de MPO en los tejidos del tracto reproductor se realizó mediante un Western-Blot con anticuerpos anti-MPO. Los resultados se muestran en la figura 6:



**Figura 6:** Presencia de MPO, identificada mediante Western-Blot con anticuerpos específicos en proteínas de testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) de epidídimo, ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (VS), conducto deferente (CD), glándulas bulbouretrales (GB) e hígado (Hi) y agua como control negativo (-).

La proteína MPO ovina ha sido caracterizada. Es por ello que para este ensayo se utilizó un anticuerpo policlonal anti-MPO frente a la proteína humana. La MPO humana es un homodímero en el que cada monómero está formado por una cadena pesada y una cadena ligera. En la especie humana, se han identificado tres isoformas de MPO (Miyasaki et al. 1991). Sus pesos moleculares son de 83 kDa (isoforma canónica), 73 kDa y 87 kDa (UniProtKB-P05164 (PERM\_HUMAN)).

Estudios previos en equino (Ponthier et al. 2014) atribuyen al precursor inactivo de la enzima un peso molecular de 86 kDa, y de 64 kDa para la forma activa. En ellos, se demuestra la presencia del precursor inactivo en el esperma equino, además de un bandeo inespecífico por debajo de los 30 kDa, que no se corresponde al esperado para MPO.

En nuestros resultados del Western-Blot, mostrados en la figura 6, únicamente se aprecia un bandeo equivalente al peso molecular de la isoforma canónica de la enzima MPO en las glándulas bulbouretrales. Además, dicha banda es muy intensa, lo que indicaría que la enzima MPO se traduce en dicho tejido en alta medida. En las glándulas bulbouretrales también se aprecia un bandeo no esperado por debajo de los 30kDa. Estos resultados se corresponderían con los observados en la especie equina (Ponthier, Franck et al. 2014).

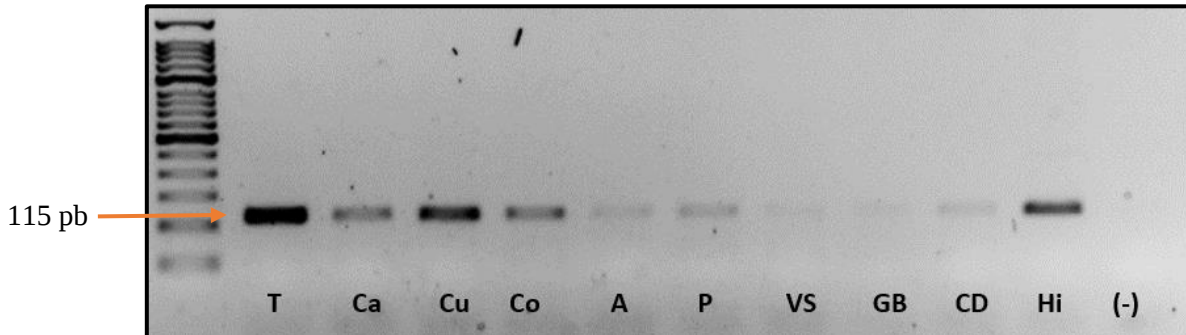
En cuanto al resto de los tejidos, en el hígado se aprecia una banda de 64kDa, que se correspondería con la presencia de la enzima MPO activa. La próstata muestra bandas de tamaño similar a las encontradas en las glándulas bulbouretrales, de 80 kDa y menores de 30 kDa, pero mucho menos intensas, mientras que el bandeo en los otros tejidos es todavía menos intenso y puede que inespecífico.

Por tanto, el Western-Blot sugiere la posible traducción de la proteína MPO en próstata y glándulas bulbouretrales, aunque en este último tejido la traducción es mucho más evidente. La presencia de MPO ha sido evidenciada previamente en la próstata humana (Roumeguere et al. 2012), pero no hay ninguna referencia en la literatura sobre su presencia en las glándulas bulbouretrales.

Además, también se observa un bandeo relativamente intenso de unos 38, 32 y 30 kDa en el testículo y el epidídimo (variable en cabeza, cuerpo y cola). En este último caso, y tal vez también en el caso del testículo, dichas bandas podrían deberse a la presencia de MPO en los espermatozoides, identificada previamente por nuestro grupo mediante inmunofluorescencia (resultados no publicados). Aunque el tamaño de estas bandas no corresponde a lo esperado, podría corresponder a una modificación posterior de esta enzima durante la maduración espermática, ya que el espermatozoide es una célula altamente especializada que sufre importantes modificaciones morfológicas y bioquímicas durante su maduración epididimaria (Senger 1997). En cualquier caso, varias bandas de un tamaño similar a las obtenidas en este trabajo también han sido detectadas en espermatozoides equinos (Ponthier, Franck et al. 2014).

**PRESENCIA DE IDO (ISOFORMAS 1 Y 2)****RT-PCR**

Los resultados obtenidos en la amplificación por RT-PCR para el gen IDO1 se muestran en la figura 7:

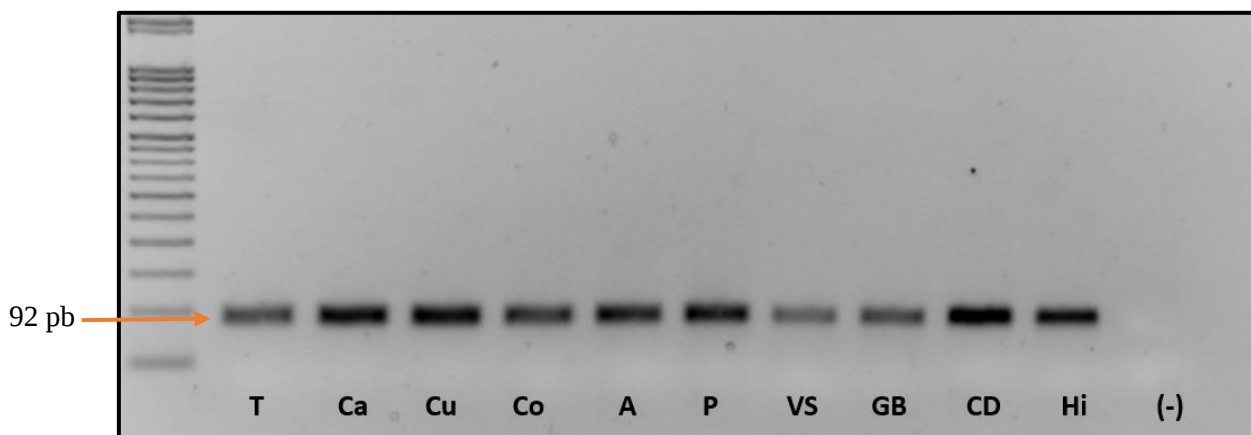


**Figura 7:** Expresión génica de IDO1, evaluada por RT-PCR, en testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) de epidídimo, ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (VS), conducto deferente (CD), glándulas bulbouretrales (GB), hígado (Hi) y control negativo (-).

En la figura 7 se observa la amplificación de un fragmento de 115 pb, correspondiente a la presencia del gen IDO1 en todos los tejidos del tracto genital del morueco junto con el control positivo y ausencia de amplificación en el control negativo.

Con respecto a la intensidad de la banda observada en los distintos tejidos del tracto reproductor, se observa una mayor amplificación en el testículo y en las distintas partes del epidídimo, junto con el control positivo. Al igual que lo observado en la figura 5, dicha intensidad podría deberse a una expresión diferencial de la enzima en los tejidos estudiados, que tendrá que ser corroborada en el estudio de expresión génica mediante q-PCR.

El resultado obtenido tras la amplificación por RT-PCR del ADNc de los tejidos con primer específicos para IDO2 se muestra en la figura 8.



**Figura 8:** Expresión génica de IDO2, evaluada por RT-PCR, en testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) de epidídimo, ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (VS), conducto deferente (CD), glándulas bulbouretrales (GB), hígado (Hi) y control negativo (-).

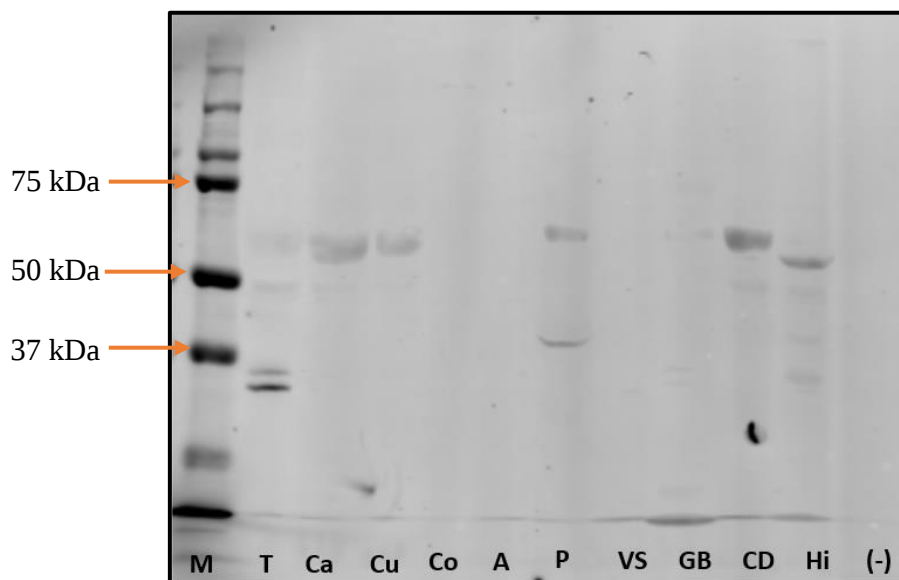
Como se aprecia en la figura 8, la RT-PCR muestra una única banda de amplificación de 92 pb, correspondiente al fragmento esperado para el gen IDO2, en todos los tejidos estudiados así como su ausencia en el control negativo, validando de este modo el ensayo.

En este caso se observa que las bandas obtenidas muestran intensidades más homogéneas, aunque destaca que el testículo muestra una intensidad de banda menor que la mayor parte de los tejidos, al contrario de lo que se observaba en IDO1 (figura 7).

Los resultados obtenidos mediante RT-PCR indicarían la presencia de ARNm de las enzimas MPO, IDO1 e IDO2 en todos los tejidos del tracto reproductor del morueco estudiados. Sin embargo, dado que este tipo de análisis únicamente muestra resultados cualitativos, es necesario cuantificar la expresión de estos genes mediante q-PCR.

### WESTERN-BLOT

Al igual que en el caso de la enzima MPO, las enzimas IDO1 e IDO2 en la especie ovina no han sido caracterizadas, por lo que la determinación de la presencia de dichas las enzimas se realizó con un anticuerpo anti-IDO humano, que además identificaría secuencias específicas de ambas, por su alta similitud. Los resultados se muestran en la figura 9.



**Figura 9:** Presencia de las enzimas IDO1 e IDO2, identificadas mediante Western-Blot con anticuerpos específicos en proteínas de testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) de epidídimo, ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (VS), conducto deferente (CD), glándulas bulbouretrales (GB), hígado (Hi) y agua como control negativo (-).

Los resultados obtenidos tras la inmunodetección (figura 9), muestran un bandeo relativamente intenso en el testículo, pero con un peso molecular menor al esperado para la especie humana, que sería de 45 kDa para IDO1 y 47 kDa para IDO2 (Fatokun, Hunt et al. 2013).

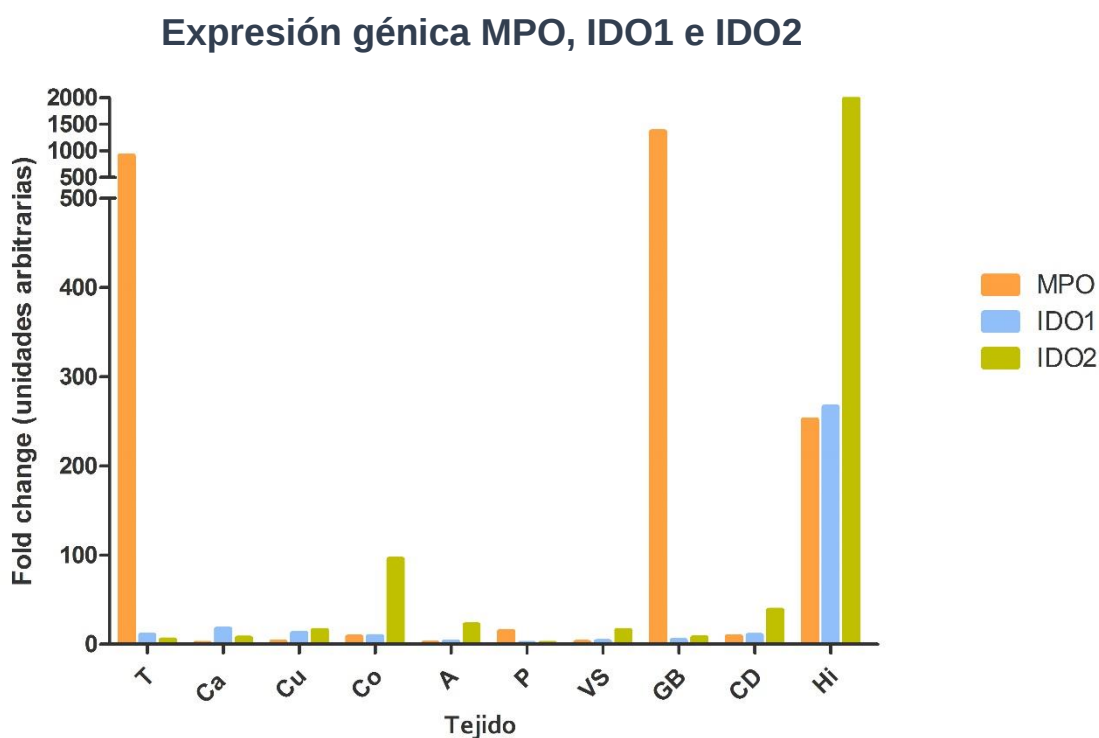
Sin embargo, ambas proteínas registran diferentes pesos moleculares en función de la especie estudiada (por ejemplo, IDO2 tiene un peso molecular de 42 kDa en ratón (Fatokun, Hunt et al. 2013)), por lo que este resultado podría sugerir que las enzimas IDO1 e IDO2 de

la especie tienen un peso molecular inferior al registrado en las especies humana y murina, las únicas caracterizadas en la actualidad. Por tanto, el doble bandeo en el testículo podría relacionarse con la presencia de las dos isoformas (IDO1 e IDO2) en este tejido.

En el caso del hígado, también puede observarse una banda muy tenue a la misma altura a la que se aprecia una de las proteínas asociadas con una de las isoformas de IDO, en concreto, la que tendría un peso molecular mayor. Además, también se pueden apreciar varias bandas de mayor tamaño. Estudios previos habían determinado tanto la transcripción como la traducción del gen IDO (sin especificar isoforma) en el epidídimo del ratón. (Britan et al. 2006).

### **ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MPO, IDO1 E IDO2**

Los resultados de q-PCR, que nos permite comparar no solo la expresión génica de cada una de las enzimas de estudio entre los distintos tejidos del tracto reproductor del morueco, sino también las diferencias de expresión génica de MPO, IDO1 e IDO2 en cada uno de los tejidos, se muestran en la figura 10.



**Figura 10:** Cuantificación de la expresión génica de MPO, IDO1 e IDO2, evaluada por q-PCR en testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) de epidídimo, ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (VS), conducto deferente (CD), glándulas bulbouretrales (GB), hígado (Hi). Los resultados se muestran como *fold change* ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) de un único experimento de q-PCR (N=1).

Los resultados del análisis muestran una expresión diferencial de los genes de estudio entre los distintos tejidos del tracto reproductor del morueco, así como del control positivo (hígado).

En el caso de MPO, su expresión es mucho más elevada en el testículo y glándulas bulbouretrales que la del resto de los tejidos del tracto genital, llegando a ser mayor en ambos casos que la observada en el hígado (control positivo). Además, tanto en el testículo como en las glándulas bulbouretrales, la expresión génica de MPO es muy superior a la cuantificada para IDO1 e IDO2. Estos resultados se correlacionan con los observados en el Western-Blot (figura 6), de modo que se puede corroborar no sólo la elevada expresión génica de esta enzima en las glándulas bulbouretrales cuantificada por q-PCR (figura 10), sino que también esta enzima está presente en dicho tejido.

En el resto de los tejidos del tracto reproductor, la expresión génica de las enzimas de degradación de la melatonina IDO1 e IDO2 es relativamente baja.

En algunos tejidos del tracto reproductor (cola de epidídimo, ampolla, vesícula seminal y conducto deferente) la expresión génica de la enzima IDO2 predomina sobre el resto de las enzimas estudiadas, aunque, excepto en el caso de la cola del epidídimo, estas diferencias no son tan marcadas como las observadas para la MPO en el testículo y glándulas bulbouretrales. La cabeza de epidídimo es el único tejido en que se observa una mayor expresión de IDO1, con respecto al resto de las enzimas estudiadas.

La expresión génica para IDO2 en algunos tejidos murinos ya había sido descrita, observándose los mayores niveles de ARNm en hígado, seguido de testículo y epidídimo (Ball et al. 2007). Estudios posteriores corroboraron la presencia de ambas isoformas de IDO en el epidídimo de dicha especie (Fukunaga et al. 2012).

Estos resultados se asemejarían en cierta medida a los obtenidos en la q-PCR de nuestro estudio, con niveles relativamente bajos de expresión génica de ambas isoformas de IDO en los tejidos del tracto genital comparado con el hígado, donde se expresa mayoritariamente IDO2. Sin embargo, en nuestro caso también se obtiene una mayor expresión de IDO2 en la cola de epidídimo con respecto al resto de tejidos del tracto genital, donde la expresión génica de esta enzima es muy baja. Estas variaciones obtenidas podrían deberse a diferencias de expresión entre especies o a que las muestras se han obtenido en diferentes condiciones.

En dichos estudios realizados en ratón (Ball, Sanchez-Perez et al. 2007), también se observa una mayor traducción proteica en el epidídimo, seguido de hígado, y testículo. En nuestro estudio, con el anticuerpo utilizado en Western-Blot, únicamente se aprecia la presencia de la proteína en el testículo, a pesar de los bajos niveles de expresión génica obtenidos. Por el contrario, los altos niveles de expresión génica obtenidos en el epidídimo y en el control positivo (hígado) no son reflejados en el Western-Blot, por lo que sería necesario utilizar otros anticuerpos para corroborar los resultados obtenidos. De este modo, la expresión diferencial de los genes de degradación de melatonina en los distintos tejidos del tracto reproductor del morueco, y la presencia de la enzima MPO en testículo y glándulas bulbouretrales, sugiere que la principal vía de degradación enzimática de la melatonina en el tracto reproductor del morueco está mediada por MPO

## **CONCLUSIONES**

- 1) Los experimentos que se han llevado a cabo en este proyecto demuestran la existencia de la ruta de degradación enzimática de la melatonina en el tracto reproductor del morueco.
- 2) Existe expresión génica de las enzimas MPO, IDO1 e IDO 2 en todos los tejidos del tracto reproductor del morueco.
- 3) La isoforma canónica de la enzima MPO se expresa principalmente en las glándulas bulbouretrales.
- 4) A pesar de existir expresión génica de las enzimas IDO e IDO2 (principalmente IDO1 en la cola de epidídimo), no se aprecian resultados concluyentes de la expresión de estas proteínas mediante Western-Blot.
- 5) Los resultados de q-PCR sugieren que la principal vía de degradación enzimática de la melatonina en el tracto reproductor del morueco está mediada por MPO.

## **CONCLUSIONS**

- 1) Experiments carried out by our research group show the existence of the melatonin break-down pathway in the reproductive tract of the ram.
- 2) There is genetic expression of MPO, IDO1 and IDO2 in all tissues of the reproductive tract of the ram.
- 3) The canonical isoform of MPO is mainly expressed in bulbourethral glands.
- 4) Although there is genetic expression of IDO1 and IDO2 enzymes (mainly IDO1 in tail of the epididymis), protein expression by Western-Blot does not show conclusive results.
- 5) q-PCR results suggest that the main melatonin enzymatic break-down pathway in the reproductive tract of the ram is carried out by MPO.

## BIBLIOGRAFÍA

Acuña-Castroviejo, D., G. Escames, C. Venegas, M. E. Díaz-Casado, E. Lima-Cabello, L. C. López, S. Rosales-Corral, D.-X. Tan and R. J. Reiter (2014). "Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions." Cellular and Molecular Life Sciences **71**(16): 2997-3025.

Agarwal, A., K. Makker and R. Sharma (2008). "Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update." Am J Reprod Immunol **59**(1): 2-11.

Avdi, M., G. Banos, K. Stefos and P. Chemineau (2004). "Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams." Theriogenology **62**(1-2): 275-282.

Axelrod, J., R. J. Wurtman and S. H. Snyder (1965). "CONTROL OF HYDROXYINDOLE O-METHYLTRANSFERASE ACTIVITY IN THE RAT PINEAL GLAND BY ENVIRONMENTAL LIGHTING." J Biol Chem **240**: 949-954.

Ball, H. J., A. Sanchez-Perez, S. Weiser, C. J. Austin, F. Astelbauer, J. Miu, J. A. McQuillan, R. Stocker, L. S. Jermini and N. H. Hunt (2007). "Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice." Gene **396**(1): 203-213.

Boutin, J. A., V. Audinot, G. Ferry and P. Delagrèze (2005). "Molecular tools to study melatonin pathways and actions." Trends in Pharmacological Sciences **26**(8): 412-419.

Britan, A., V. Maffre, S. Tone and J. R. Drevet (2006). "Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis." Cell Tissue Res **324**(2): 301-310.

Cahill, G. M. and J. C. Besharse (1989). "Retinal melatonin is metabolized within the eye of xenopus laevis." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(3): 1098-1102.

Casao, A., I. Cebrián, M. E. Asumpção, R. Pérez-Pé, A. Abecia, F. Forcada, A. Cebrián-Pérez and T. Muñio-Blanco (2010). "Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes." Reprod Biol Endocrinol **8**: 59.

Casao, A., N. Mendoza, R. Perez-Pé, P. Grasa, J. A. Abecia, F. Forcada, J. A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco (2010). "Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate." J Pineal Res **48**(1): 39-46.

Cebrián-Pérez, J. A., A. Casao, M. González-Arto, T. R. dos Santos Hamilton, R. Pérez-Pé and T. Muñio-Blanco (2014). "Melatonin in Sperm Biology: Breaking Paradigms." Reproduction in Domestic Animals **49**: 11-21.

Chemineau, P., D. Guillaume, M. Migaud, J. C. Thiery, M. T. Pellicer-Rubio and B. Malpoux (2008). "Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications." Reprod Domest Anim **43 Suppl 2**: 40-47.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Analytical Biochemistry **162**(1): 156-159.

du Plessis, S. S., K. Hagenaar and F. Lampiao (2010). "The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS." Andrologia **42**(2): 112-116.

Fatokun, A. A., N. H. Hunt and H. J. Ball (2013). "Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2) and the kynurenine pathway: characteristics and potential roles in health and disease." Amino Acids **45**(6): 1319-1329.

- Ferry, G., C. Ubeaud, P. H. Lambert, S. Bertin, F. Coge, P. Chomarat, P. Delagrangé, B. Serkiz, J. P. Bouchet, R. J. Truscott and J. A. Boutin (2005). "Molecular evidence that melatonin is enzymatically oxidized in a different manner than tryptophan: investigations with both indoleamine 2,3-dioxygenase and myeloperoxidase." Biochem J **388**(Pt 1): 205-215.
- Fukunaga, M., Y. Yamamoto, M. Kawasoe, Y. Arioka, Y. Murakami, M. Hoshi and K. Saito (2012). "Studies on tissue and cellular distribution of indoleamine 2,3-dioxygenase 2: the absence of IDO1 upregulates IDO2 expression in the epididymis." J Histochem Cytochem **60**(11): 854-860.
- Gonzalez-Arto, M., T. R. Hamilton, M. Gallego, E. Gaspar-Torrubia, D. Aguilar, E. Serrano-Blesa, J. A. Abecia, R. Perez-Pe, T. Muino-Blanco, J. A. Cebrian-Perez and A. Casao (2016). "Evidence of melatonin synthesis in the ram reproductive tract." Andrology **4**(1): 163-171.
- Hardeland, R. (2008). "Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites." Cell Mol Life Sci **65**(13): 2001-2018.
- Hardeland, R. (2010). "Melatonin metabolism in the central nervous system." Curr Neuropharmacol **8**(3): 168-181.
- Hirata, F., O. Hayaishi, T. Tokuyama and S. Seno (1974). "In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin." J Biol Chem **249**(4): 1311-1313.
- Karagiannidis, A., S. Varsakeli, C. Alexopoulos and I. I. Amarantidis (2000). "Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece." Small Rumin Res **37**(1-2): 125-130.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lincoln, G. A., C. E. Lincoln and A. S. McNeilly (1990). "Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep." J Reprod Fertil **88**(2): 623-633.
- Malpoux, B., J. C. Thiery and P. Chemineau (1999). "Melatonin and the seasonal control of reproduction." Reprod Nutr Dev **39**(3): 355-366.
- Malpoux, B., C. Viguie, D. C. Skinner, J. C. Thiery and P. Chemineau (1997). "Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe." Brain Res Bull **44**(4): 431-438.
- Miyasaki, K. T., J. P. Song and R. K. Murthy (1991). "Secretion of myeloperoxidase isoforms by human neutrophils." Anal Biochem **193**(1): 38-44.
- Ortiz, A., J. Espino, I. Bejarano, G. M. Lozano, F. Monllor, J. F. Garcia, J. A. Pariente and A. B. Rodriguez (2011). "High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility." J Pineal Res **50**(2): 132-139.
- Palacín, I., J. Abecia, F. Forcada, A. Casao, J. Cebrian, T. Muiño, C. Palacios and J. M. Pontes (2008). "Effects of exogenous melatonin treatment on out-of-season ram fertility." Italian Journal of Animal Science **7**(2): 199.
- Ponthier, J., T. Franck, S. Parrilla-Hernandez, A. Niesten, G. de la Rebiere, D. Serteyn and S. Deleuze (2014). "Concentration, Activity and Biochemical Characterization of Myeloperoxidase in Fresh and Post-Thaw Equine Semen and their Implication on Freezability." Reproduction in Domestic Animals **49**(2): 285-291.
- Reiter, R. J., D. X. Tan and L. Fuentes-Broto (2010). "Melatonin: a multitasking molecule." Prog Brain Res **181**: 127-151.

- Reiter, R. J., D. X. Tan, S. Rosales-Corral and L. C. Manchester (2013). "The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives." Mini Rev Med Chem **13**(3): 373-384.
- Ressmeyer, A. R., J. C. Mayo, V. Zelosko, R. M. Sainz, D. X. Tan, B. Poeggeler, I. Antolin, B. K. Zsizsik, R. J. Reiter and R. Hardeland (2003). "Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction." Redox Rep **8**(4): 205-213.
- Roumeguere, T., P. Delree, P. Van Antwerpen, S. Rorive, L. Vanhamme, L. de Ryhove Lde, D. Serteyn, E. Wespes, M. Vanhaerverbeek and K. Z. Boudjeltia (2012). "Intriguing location of myeloperoxidase in the prostate: a preliminary immunohistochemical study." Prostate **72**(5): 507-513.
- Sarabia, L., I. Maurer and E. Bustos-Obregon (2009). "Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA." Ecotoxicol Environ Saf **72**(2): 663-668.
- Senger, P. L. (1997). Pathways to pregnancy and parturition, Current Conceptions, Inc., 1615 NE Eastgate Blvd.
- Takada, L., A. M. Junior, G. Z. Mingoti, J. C. C. Balieiro, J. Cipolla-Neto and L. A. Coelho (2012). "Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during in vitro maturation (IVM) and on in vitro embryo development." Research in Veterinary Science **92**(1): 124-127.
- 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.
- Tan, D. X., R. Hardeland, L. C. Manchester, B. Poeggeler, S. Lopez-Burillo, J. C. Mayo, R. M. Sainz and R. J. Reiter (2003). "Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical." J Pineal Res **34**(4): 249-259.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, X. Liu, S. A. Rosales-Corral, D. Acuna-Castroviejo and R. J. Reiter (2013). "Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes." J Pineal Res **54**(2): 127-138.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, M. P. Terron, L. J. Flores and R. J. Reiter (2007). "One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?" J Pineal Res **42**(1): 28-42.
- Tan, D. X., X. Zheng, J. Kong, L. C. Manchester, R. Hardeland, S. J. Kim, X. Xu and R. J. Reiter (2014). "Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions." Int J Mol Sci **15**(9): 15858-15890.
- Turek, F. W. (2007). "From circadian rhythms to clock genes in depression." Int Clin Psychopharmacol **22 Suppl 2**: S1-8.
- Zhang, H. M. and Y. Zhang (2014). "Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions." J Pineal Res **57**(2): 131-146.
- Zhernakova, N. I. and S. N. Rybnikova (2008). "[The role of melatonin in pathogenesis of diseases of digestive system]." Klin Med (Mosk) **86**(4): 14-18.

## ANEXOS

**ANEXO I: Material complementario a materiales y métodos**

**Tabla 1:** Secuencias de cebadores directo y reverso para las amplificaciones por PCR realizadas en el proyecto y tamaño de los fragmentos amplificados.

| Gen           | Cebador directo                        | Cebador reverso                         | Tamaño fragmento |
|---------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|------------------|
| <b>GAPDH</b>  | 5'- GCT GGT GCC CTT TTA<br>CCA GA -3'  | 5'- CAG TGC ATC TCC<br>GTG AAG GT -3'   | 90 pb            |
| <b>MPO</b>    | 5'- CTC GGC GAA CAT TCC<br>CTG TT-3'   | 5'- CGG TTG TGC TCC<br>CTC ACA AA-3'    | 130 pb           |
| <b>IDO1</b>   | 5'- TAT CTT CCA GCC TGC<br>GCA AA -3'  | 5'- CAA GGG GCC TTT<br>CCA AC -3'       | 115 pb           |
| <b>IDO2</b>   | 5'- TCC CTC CTA TCC TTG<br>TTC ACT C-3 | 5'-GGT GTC CAA GTT<br>CCT GAT TTC C -3' | 92 pb            |
| <b>Actina</b> | 5'- CTC TTC CAG CCT TCC<br>TTC CT-3'   | 5'- GGG CAG TGA TCT<br>CTT TCT GC-3'    | 178 pb           |

**Tabla 2:** Mezcla de reacción utilizada para la amplificación de GAPDH mediante PCR.

|                                                | 1X      | 13,5X     |
|------------------------------------------------|---------|-----------|
| <b>H<sub>2</sub>O (Libre de DNasa y RNasa)</b> | 36,9 µL | 498,15 µL |
| <b>Buffer 10X</b>                              | 5 µL    | 67,5 µL   |
| <b>dNTPs (10 mM)</b>                           | 0,4 µL  | 5,4 µL    |
| <b>PF (2,5 nM)</b>                             | 1,6 µL  | 21,6 µL   |
| <b>PR (2,5 nM)</b>                             | 1,6 µL  | 21,6 µL   |
| <b>Red Taq Polymerase</b>                      | 2,5 µL  | 33,75 µL  |
| <b>TOTAL</b>                                   | 48 µL   | 648 µL    |

**Tabla 3:** Condiciones de amplificación (tiempos, temperaturas y ciclos) para la amplificación de los genes para MPO, IDO1 e IDO2 mediante PCR en los tejidos del tracto reproductor del morueco.

| MPO         |          |        | IDO1        |          |        | IDO2        |          |        |
|-------------|----------|--------|-------------|----------|--------|-------------|----------|--------|
| Temperatura | Tiempo   |        | Temperatura | Tiempo   |        | Temperatura | Tiempo   |        |
| 95°C        | 3 min    |        | 95°C        | 3 min    |        | 95°C        | 3 min    |        |
| x37         | 95°C     | 30 seg | x35         | 95°C     | 30 seg | x40         | 95°C     | 30 seg |
|             | 53°C     | 30 seg |             | 57°C     | 30 seg |             | 51°C     | 30 seg |
|             | 72°C     | 45 seg |             | 72°C     | 45 seg |             | 72°C     | 45 seg |
| 72°C        | 5 min    |        | 72°C        | 5 min    |        | 72°C        | 8 min    |        |
| 4°C         | infinito |        | 4°C         | infinito |        | 4°C         | infinito |        |

**Tabla 4:** Mezcla de reacción para la cuantificación de la expresión génica de los genes para MPO, IDO1, IDO2, actina y GAPDH mediante q-PCR.

| <b>200mM<br/>(MPO, IDO1,<br/>IDO2)</b> | <b>1X</b> | <b>35X</b> | <b>300mM<br/>(GAPDH,<br/>ACTINA)</b> | <b>1X</b> | <b>35X</b> |
|----------------------------------------|-----------|------------|--------------------------------------|-----------|------------|
| <b>SYBR Green</b>                      | 10 µL     | 350 µL     | <b>SYBR Green</b>                    | 10 µL     | 350 µL     |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>                  | 7,2 µL    | 252 µL     | <b>H<sub>2</sub>O</b>                | 6,8 µL    | 238 µL     |
| <b>PF (2,5 nM)</b>                     | 0,4 µL    | 14 µL      | <b>PF</b>                            | 0,6 µL    | 21 µL      |
| <b>PR (2,5 nM)</b>                     | 0,4 µL    | 14 µL      | <b>PR</b>                            | 0,6 µL    | 21 µL      |
| <b>TOTAL</b>                           | 18 µL     | 630 µL     | <b>TOTAL</b>                         | 18 µL     | 630 µL     |

## **ANEXO II: Material complementario a Resultados y Discusión**

**Tabla 5:** Concentraciones de ARN obtenidos en los distintos tejidos del tracto genital del morueco y en el hígado.

| Tejido              | Concentración de ARN | Tejido                   | Concentración de ARN |
|---------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|
| Testículo           | 232,1 ng/μl          | Próstata                 | 174,7 ng/μl          |
| Cabeza de epidídimo | 210,2 ng/μl          | Vesícula seminal         | 220,1 ng/μl          |
| Cuerpo de epidídimo | 128,1 ng/μl          | Glándulas bulbouretrales | 235,1 ng/μl          |
| Cola de epidídimo   | 182,8 ng/μl          | Conducto deferente       | 177,9 ng/μl          |
| Ampolla deferente   | 179,2 ng/μl          | Hígado                   | 238,2 ng/μl          |

**Tabla 6:** Concentración total de proteínas obtenidas de los distintos tejidos del tracto reproductor del morueco y el hígado, cuantificadas por el método Bradford.

| Tejido              | Concentración de proteínas totales | Tejido                   | Concentración de proteínas totales |
|---------------------|------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| Testículo           | 1,730 μg/μl                        | Próstata                 | 5,516 μg/μl                        |
| Cabeza de epidídimo | 1,935 μg/μl                        | Vesícula seminal         | 2,176 μg/μl                        |
| Cuerpo de epidídimo | 1,973 μg/μl                        | Glándulas bulbouretrales | 2,963 μg/μl                        |
| Cola de epidídimo   | 3,923 μg/μl                        | Conducto deferente       | 3,136 μg/μl                        |
| Ampolla deferente   | 4,585 μg/μl                        | Hígado                   | 1,753 μg/μl                        |