



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza



**Estudio de las vías metabólicas de la
melatonina en el tracto reproductor masculino
de las especies equina y porcina
Study of the metabolic pathways
of melatonin in the male reproductive tract
of equine and porcine species**

Trabajo Fin de Máster

Autora:

Patricia Nadal Barón

Directora:

Adriana Casao Gascón

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Máster en Biología Molecular y Celular

Septiembre 2017

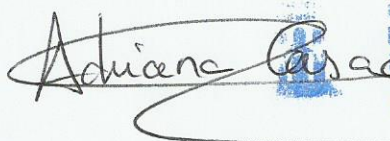


La Dra. Adriana Casao Gascón, Profesora Contratada Doctor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

INFORMAN:

Que la alumna Dña. Patricia Nadal Barón, ha realizado bajo mi dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin de Master titulado "Estudio de las vías metabólicas de la melatonina en el tracto reproductor masculino de las especies equina y porcina". Este trabajo cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFM del Máster Universitario en Biología Molecular y Celular, por lo que consideran procedente su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo la presente en Zaragoza a 11 de Septiembre de 2017.


Departamento de
Bioquímica y Biología
Molecular y Celular
Universidad Zaragoza

Adriana Casao Gascón

AGRADECIMIENTOS

Quiero emplear estas líneas para agradecer al grupo de Biología y Fisiología de la Reproducción por hacerme sentir como en casa y transmitirme la pasión por la ciencia y la investigación desde el primer momento que pisé el laboratorio.

En primer lugar, a la Dra. Adriana Gascón por dirigir este trabajo, por introducirme en el mundo de la genómica y por tu atención y tus enseñanzas, que han sido una indispensable y gran ayuda a lo largo de todo el trabajo.

También quiero agradecer a Tere y Pepín, por vuestra cercanía, por transmitirme vuestra gran experiencia y vuestros consejos, que me han ayudado a confiar más en mí. A Rosaura, por tu ayuda, por transmitirme esa actitud positiva y enseñarme a fijarme en la importancia de cada pequeño detalle.

No puedo dejar de dedicarle unas palabras al resto de miembros del grupo, Silvia, Carlos, Melissa, Sara, Adrián, María, Sara por vuestro apoyo, vuestros consejos y vuestra ayuda así como por los buenos ratos en el laboratorio.

Por último, quiero agradecer a los grandes amigos que me llevo de estos años universitarios por los buenos ratos compartidos. A mi familia, en especial a mis tíos y a mi madre por estar siempre ahí, apoyándome, por vuestra paciencia y por transmitirme ese afán de superación desde pequeña.

A todos ellos, muchísimas gracias.

ABREVIATURAS

AAAD: L-aminoácido aromático descarboxilasa

AANAT: Serotonin-N-acetiltransferasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

AFMK: N¹-acetil-N²-formil-5-metoxikinuramina

AMK: N¹-acetil-5-metoxikinuramina

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ARN: Ácido ribonucleico

ASMT: N-acetilserotonina-O-metiltransferasa

BSA: Albumina sérica bovina

EPPO: Eosinofil peroxidasa

FSH: Hormona folículo-estimulante

GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G

IDO: Indoleamina 2,3-dioxigenasa

MEK: Quinasa activada por mitógenos

MPO: Mieloperoxidasa

MT1: Receptor transmembrana de melatonina 1

MT2: Receptor transmembrana de melatonina 2

NOS: Especies reactivas de nitrógeno

PKA: Proteína quinasa A

PBS: Tampón fosfato salino

PBST: Tampón fosfato salino con Tween

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SNC: Sistema nervioso central

TPH: Triptófano-5- hidroxilasa

Índice

1. RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 El aparato reproductor masculino	3
2.2 Funciones y origen de la melatonina	6
2.3. Metabolismo de la melatonina	7
2.3.1. Vías de síntesis	7
2.3.2. Vías de degradación	9
2.4. Receptores de melatonina.....	10
2.5. Distribución de la melatonina en el organismo.....	14
2.6. El papel de la melatonina en la reproducción	15
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1. Obtención de tejidos.....	21
4.2. Aislamiento y limpieza del ARN total.....	21
4.3. Síntesis de ADNc	22
4.4. Amplificación del cDNA por PCR.....	23
4.5. Cuantificación de la expresión génica: PCR cuantitativa	25
4.6. Detección de las proteínas por Western-Blot	26
4.6.1. Extracción de proteínas de los tejidos	26
4.6.2. SDS-PAGE y Western-Blot	27
4.7. Análisis Estadístico	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5.1. Extracción de RNA y retrotranscripción.....	29

5.2. Análisis de la expresión génica y proteica en el cerdo	30
5.2.1. Identificación de los receptores de melatonina	30
5.2.2. Identificación de las enzimas de síntesis de la melatonina	36
5.3. Análisis de la expresión génica y proteica en el burro	40
5.3.1. Identificación de los receptores de melatonina	40
5.3.2. Identificación de las enzimas de síntesis de la melatonina	45
5.4. Discusión final	50
6. CONCLUSIONES.....	52
CONCLUSIONS	53
7. BIBLIOGRAFÍA	54
8. ANEXOS.....	60

1. RESUMEN

La melatonina es una hormona ubicua con una gran variedad de funciones biológicas, como la defensa antioxidante o la modulación del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal en muchos mamíferos. Se sintetiza principalmente en la glándula pineal durante la noche, gracias a las enzimas arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AANAT) y N-acetilserotonin-O-metiltransferasa (ASMT), las dos últimas de su ruta de síntesis. A pesar de su corta vida media, nuestro grupo ha descrito la presencia de melatonina durante el día en el plasma seminal de especies con diferente estacionalidad como la equina, reproductor de días largos y la porcina, no estacional. Asimismo, la melatonina tiene efectos beneficiosos sobre los órganos reproductores y los receptores de melatonina MT₁ y MT₂ están presentes en los espermatozoides equinos y porcinos.

En consecuencia, el objetivo principal de este trabajo fue identificar la presencia, a nivel transcripcional y proteico, de los receptores de melatonina MT₁ y MT₂ y las enzimas AANAT y ASMT en el tracto reproductor masculino del cerdo y del burro, y analizar las diferencias de expresión génica entre los diferentes órganos por PCR cuantitativa.

Los resultados indicaron que los receptores MT₁ y MT₂ se encuentran ampliamente distribuidos en el tracto reproductor masculino de ambas especies, tanto a nivel transcripcional como proteico. No obstante, no se detectaron diferencias significativas de expresión génica entre los diferentes órganos en ninguna de las dos especies. En cuanto a las enzimas de síntesis de melatonina, se confirmó la expresión génica y la presencia de AANAT en el tracto reproductor porcino, siendo la próstata el órgano con mayor expresión génica ($p < 0,05$). Sin embargo, no se pudo detectar la expresión génica de ASMT en el tracto reproductor porcino, aunque se identificó a nivel proteico. En cambio, en la especie equina, AANAT y ASMT están presentes tanto a nivel transcripcional como proteico siendo el testículo donde ambas presentan mayor expresión génica ($p < 0,05$).

Por tanto, nuestros resultados sugieren que los órganos del tracto reproductor de cerdo y burro podrían ser una de las fuentes de melatonina identificada en el plasma seminal de estas especies, al menos durante el día y que esta hormona podría modular la funcionalidad de los órganos reproductivos por medio de receptores de membrana.

ABSTRACT

Melatonin is an ubiquitous hormone with a great variety of biological functions. Among them, it stands out is antioxidant role or the modulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, which is involved in the regulation of reproductive seasonality in most mammals. This hormone is synthesized mainly in the pineal gland at night, by the enzymes arilalquilamine-N-acetiltransferase (AANAT) y N-acetilserotonine-O-metiltransferase (ASMT), the last two ones of its synthesis pathway. Despite its short - half-life, our group has detected melatonin in the seminal plasma of species with different seasonality such as the donkey, a long-day breeder, and the pig, a no seasonal species. Moreover, melatonin receptors, MT₁ and MT₂, are present in the sperm of these species, and there have been described beneficial effect of melatonin on the male reproductive tract.

Consequently, the principal objective of this project was to identify the presence of MT₁ and MT₂ melatonin receptors, and the enzymes AANAT y ASMT, in the male reproductive tract of the boar and the donkey, and to evaluate the differences on genic expression between the different organs of the reproductive tract by quantitative PCR (q-PCR).

The results indicated that MT₁ and MT₂ are widely distributed in the male reproductive tract of both species at a transcriptional and protein level. However, no significant gene expression differences among organs were detected. Regarding melatonin-synthesizing enzymes, both the gene expression and the presence of AANAT in the boar reproductive tract was confirmed, being the prostate the organ with the highest gene expression ($p < 0.05$). However, ASMT gene expression could not be detected, although it was identified at a protein level by Western-blot. Otherwise, in the donkey, AANAT and ASMT are present at a transcriptional and protein level, being the testicle the organ with both have a significantly higher expression ($p < 0.05$).

This way, our results suggest that the male reproductive organs of the donkey and the boar could be one of sources of the melatonin found in the seminal plasma, at least during the day, and that this hormone could modulate the functionality of the reproductive organs through melatonin membrane receptors.

2. INTRODUCCIÓN

El uso de mamíferos domésticos para su aprovechamiento económico ha sido constante a lo largo de la historia. Su empleo tanto como fuente de alimento, como ocurre con la especie porcina, o como instrumento de trabajo y ocio, como en las especies equinas burro y caballo, ha suscitado interés por la mejora de las técnicas reproductivas. Sin embargo, estos estudios se han centrado principalmente en las hembras, cuando comprender los factores que influyen en la fisiología reproductiva del macho resulta fundamental como base para mejorar la eficacia de estas técnicas.

2.1 El aparato reproductor masculino

El aparato reproductor masculino es el encargado de la producción de los gametos masculinos o espermatozoides así como de su deposición en el tracto reproductor femenino dónde fecundarán al gameto femenino u óvulo dando lugar a la generación de nuevos individuos.

El aparato reproductor masculino se encuentra formado por órganos internos: los testículos, el epidídimo, las glándulas accesorias, los conductos deferentes y el conductor eyaculador (la uretra) y por órganos externos: el escroto y el órgano copulador o pene.

Los **testículos** son considerados los órganos reproductivos primarios en el macho porque en ellos tiene lugar la producción de los espermatozoides y de testosterona. El testículo se encuentra cubierto por una cápsula testicular, la túnica albugínea, formada por tejido conectivo y fibras de músculo liso, cuyas contracciones rítmicas permiten el bombeo de los espermatozoides hacia los conductos deferentes.

El testículo se encuentra formado por un gran número de tubos microscópicos los denominados túbulos seminíferos. En su interior, se encuentra el epitelio germinal, donde se produce la espermatogénesis mediante la proliferación y división meiótica de las espermatogonias o células germinales masculinas (Senger, 2003). Entre ellas, y también dentro de los túbulos seminíferos, también se encuentran las células de Sertoli capaces de responder a los estímulos hormonales de la FSH (hormona folículo-estimulante) procedente de la hipófisis. La unión de la FSH a sus receptores en las células

de Sertoli estimula la síntesis de ADN, la producción de la proteína de unión a andrógenos y la producción de diferentes sustancias energéticas, que favorecen la espermatogénesis (Dimitriadis *et al.*, 2015). Además, las células de Sertoli conforman la barrera hematotesticular que protege a las espermatogonias del sistema inmune.

Fuera de los tubulos seminíferos, se encuentran las células de Leydig junto con el tejido vascular, linfático y conectivo. Su principal función es la producción de testosterona como respuesta a la hormona hipofisaria LH (hormona luteinizante). Esta testosterona actúa sobre su receptor en las células de Sertoli y favorece la espermatogénesis (Senger, 2003).

Los túbulos seminíferos convergen en los conductos eferentes que desembocan en el **epidídimo**. La función principal del epidídimo es proporcionar un entorno adecuado para la maduración final de los espermatozoides. Está organizado en tres regiones diferentes, las denominadas cabeza, cuerpo y cola del epidídimo. En este órgano, se producen cambios en la membrana plasmática del espermatozoide que facilitaran su supervivencia en el tracto reproductor femenino y su unión al oocito, además de la condensación de su material genético y la reducción de su citoplasma mediante la pérdida de la gota citoplasmática, la adquisición de la motilidad y la capacidad fecundante (Senger, 2003). Asimismo, en el epidídimo se ha detectado la presencia de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa o la catalasa que mantienen los niveles de especies oxidantes para evitar el daño de los espermatozoides (Vernet *et al.*, 2004).

El movimiento de los espermatozoides a lo largo del epidídimo se produce por las contracciones rítmicas del músculo liso que rodea a este órgano. De este modo, los espermatozoides son transportados y almacenados en la cola del epidídimo y en el conducto deferente, hasta que durante la cópula son vertidos a la uretra y se produce la eyaculación.

Las glándulas accesorias, junto con el epidídimo y el conducto deferente son responsables de la producción y secreción de diferentes sustancias que constituyen el plasma seminal, la parte no celular del semen. Durante la eyaculación, las secreciones de las glándulas sexuales accesorias son vertidas a la luz de la uretra pélvica junto con el

fluido epididimal (Senger, 2003). Existen cuatro glándulas accesorias diferentes, que son la ampolla, la próstata, un par de vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales, con diferencias importantes en las distintas especies animales en cuanto a presencia, tamaño y contribución a la composición del plasma seminal. De este modo, el cerdo carece de ampolla si bien sus glándulas bulbouretrales son de mayor tamaño que en el resto de especies (Figura 1.1) mientras que el burro presenta las cuatro glándulas accesorias (Figura 2.2) (Senger, 2003).

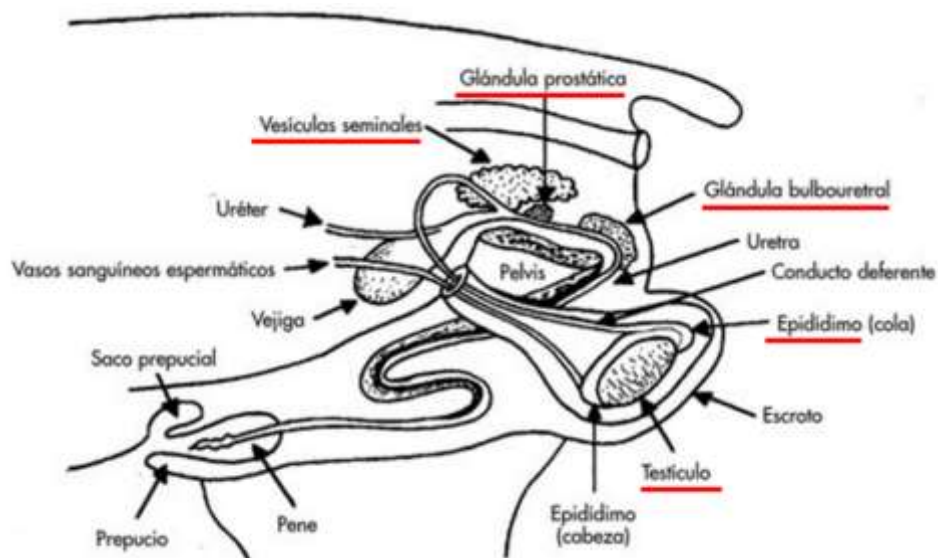


Figura 2.1. Esquema del tracto reproductor masculino de cerdo (vista lateral). Los órganos estudiados en este proyecto se encuentran subrayados en rojo.

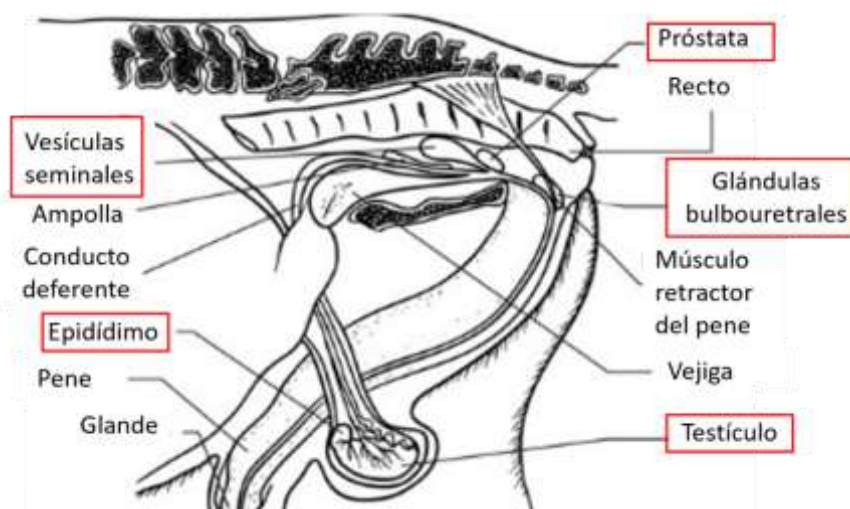


Figura 2.2. Esquema del tracto reproductor masculino de burro (vista lateral). Los órganos estudiados en este proyecto se encuentran enmarcados en rojo.

El plasma seminal no sólo actúa como vehículo para los espermatozoides eyaculados, sino que también es su soporte metabólico, aportándoles energía desde su formación

hasta su posterior transporte por el tracto genital de la hembra, en forma de carbohidratos. Además, en él también se encuentran otras sustancias como lípidos, proteínas y enzimas antioxidantes importantes tanto para la maduración final del espermatozoide y, para el mantenimiento de su estado discapacitado hasta llegar al tracto reproductor femenino, como de su motilidad y viabilidad así como para la protección frente al frío y frente a la respuesta inflamatoria de la hembra tras la cópula (Senger, 2003). Además, en algunas especies como el cerdo y el caballo, se han detectado factores coagulantes que minimizan la pérdida de espermatozoides tras esta cópula (Zervos *et al.*, 2010).

Entre las moléculas presentes en plasma seminal, se encuentra la melatonina, detectada en varias especies de mamíferos domésticos como el cerdo, el burro, el caballo y el morueco (Casao *et al.*, 2010a; Gonzalez-Arto *et al.*, 2016b). Esto sugiere que comprender el papel de esta hormona en la reproducción puede ser clave para la mejora de las técnicas de manejo reproductivo de ganado y otros mamíferos domésticos o salvajes.

2.2 Funciones y origen de la melatonina

La melatonina es una molécula ampliamente distribuida y con una gran variedad de funciones que está presente en una multitud de organismos, incluyendo bacterias, eucariotas unicelulares, plantas y animales invertebrados y vertebrados (Tan *et al.*, 2010).

El origen de la melatonina se estima que tuvo lugar hace 2.500-3.500 millones de años, durante el periodo en el que se produjo la transición de metabolismo anaeróbico al aeróbico, después de que la rotura del agua por el fotosistema II evolucionara en las cianobacterias (Tan *et al.*, 2014). Recientemente, se ha sugerido que la melatonina podría ser sintetizada en las mitocondrias y los cloroplastos de la mayoría de células eucariotas, lo que explicaría su ubicuidad. Además, su presencia estaría relacionada con su función primaria, la protección frente al estrés oxidativo al ser capaz de interactuar con especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS) (Tan *et al.*, 2013).

Debido a su antigüedad, a lo largo de la evolución esta molécula ha adquirido nuevas funciones en los organismos multicelulares debido a su versatilidad química, si bien su

estructura se ha mantenido invariable. Entre ellas, destaca la regulación de los ritmos circadianos como el ciclo del sueño y la temperatura corporal en los vertebrados (Turek, 2007). Asimismo, también regula la tolerancia ambiental en plantas y hongos, la actividad sexual en aves y peces y señala el fotoperiodo en vertebrados estacionales (Tan *et al.*, 2010). De igual manera, interviene en el control del metabolismo glucídico y lipídico (Zhernakova *et al.*, 2008), protege del estrés oxidativo (Zhang *et al.*, 2014) y la carcinogénesis (Tamura *et al.*, 2008) y presenta propiedades inmunorreguladoras y anti-inflamatorias (Pena *et al.*, 2007). También se ha observado una síntesis disminuida de melatonina con la edad lo que la relaciona con el reloj biológico y los procesos de senescencia que influirían en todas las funciones anteriormente mencionadas (Tan *et al.*, 2010).

Se ha investigado intensamente cual fue el proceso evolutivo que llevo a la adquisición de tal variedad de funciones, gran parte de ellas relacionadas con la señalización del fotoperiodo. Se cree que está relacionado con su función primaria puesto que en las bacterias fotosintéticas se produce una mayor cantidad de ROS y NOS en la fase lumínica que en la fase oscura de la fotosíntesis (Tan *et al.*, 2010), lo que supone un consumo diferencial de melatonina, al ser utilizada en cantidades mayores durante el día para la detoxificación de los radicales libres (Tan *et al.*, 2014). Cuando se produjo la evolución a organismos multicelulares, estos no podían responder directamente a los cambios fotoperiódicos y requerían que la información lumínica fuera señalizada por una molécula capaz de viajar por todo el organismo para sincronizar las actividades celulares; como la melatonina ya reflejaba pasivamente el ciclo diurno-nocturno, los organismos multicelulares la adoptaron como sistema de señalización (Tan *et al.*, 2010).

2.3. Metabolismo de la melatonina

2.3.1. Vías de síntesis

Las vías metabólicas de la melatonina han sido intensamente estudiadas. No obstante, mientras que las rutas de síntesis están bien caracterizadas, su degradación es un proceso más complejo, en el que múltiples enzimas e intermediarios están involucrados y en consecuencia es menos conocido.

En animales, la síntesis de melatonina se produce exclusivamente a partir del aminoácido esencial triptófano (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2014). Sin embargo, otros organismos entre los que se incluyen bacterias, protistas, hongos, algas y plantas son capaces de sintetizar melatonina por rutas alternativas que parten de fosfoenolpiruvato y la D-eritrosa-4-fosfato (Tan *et al.*, 2014).

La ruta general de síntesis en vertebrados comprende 4 etapas (Figura 2.3). En primer lugar el triptófano es convertido en 5-hidroxitriptófano por la enzima triptófano-5-hidroxilasa (TPH; EC 1.14.16.4); a continuación, la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (AAAD; EC 4.1.128) cataliza su conversión a 5-hidroxytriptamina (comúnmente conocida como serotonina); posteriormente, la serotonina es acetilada a N-acetilserotonina por acción de la serotonina-N-acetiltransferasa (AANAT; EC 2.3.1.87) y por último, la enzima N-acetilserotonina-O-metiltransferasa (ASMT; EC 2.1.1.4) cataliza la transformación final a melatonina (Boutin *et al.*, 2005). La enzima ASMT era conocida anteriormente como hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT).

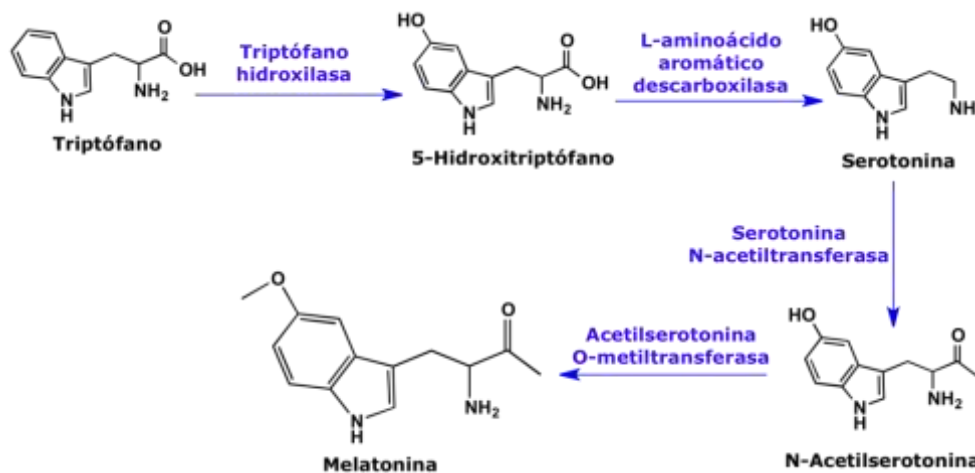


Figura 2.3. Representación de la ruta de síntesis de melatonina en vertebrados. (Adaptado de (Carpentieri *et al.*, 2012).

En esta ruta clásica de síntesis, existen dos etapas limitantes. Una de ellas es debida al carácter saturable de la TPH y la otra, a la actividad de AANAT que regula el ritmo de secreción de melatonina, al estar controlada a nivel de expresión génica y/o actividad enzimática por los mecanismos de señalización de los ritmos circadianos (Hardeland, 2008). No obstante, estudios recientes han sugerido que la etapa final, catalizada por ASMT sería la única limitante durante la noche al exceder la concentración de N-acetilserotonina a la de melatonina en este periodo (Liu *et al.*, 2005).

Las enzimas AANAT y ASMT se han detectado en la glándula pineal de cerdo tanto a nivel genético como proteico (Romerowicz-Misielak *et al.*, 2015). La secuencia de AANAT se ha predicho computacionalmente tanto en el cerdo como en el burro, mientras que la secuencia ASMT se ha predicho únicamente en el burro. En el anexo I tablas 1 y 2, se encuentra el número de acceso de dichas secuencias en la base de datos GenBank (*National Institute of Health*, EEUU).

2.3.2. Vías de degradación

La ruta principal de degradación de melatonina en el hígado es catalizada por la familia de citocromos P450, principalmente el CYP1A2, por medio de una 6-hidroxilación. Posteriormente, es sulfatada y excretada en la orina en forma de 6-sulfatoximelatonina. Además, otras isoformas de P450 también pueden catalizar la O-demetilación de la melatonina a su precursor (N-acetil-5-hidroxitriptamina), que a su vez es glucoronizado o sulfatado y excretado en la orina, si bien su importancia es menor cuantitativamente (Tan *et al.*, 2007).

Existen otras vías de degradación enzimática de la melatonina por medio de las enzimas indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), mieloperoxidasa (MPO) y eosinofil peroxidasa (EPPO) y catalizan la transformación de la melatonina en N¹-acetil-N²-formil-5-metoxikinuramina (AFMK) y N¹-acetil-5-metoxikinuramina (AMK)(Ferry *et al.*, 2005).

La melatonina también se puede metabolizar hasta AFMK por medio de reacciones pseudoenzimáticas en las que intervienen la oxiferril-hemoglobina y el citocromo C. Además, se han caracterizado otras vías no enzimáticas en las que la melatonina se transforma a AFMK por la interacción directa con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Hardeland, 2008).

Estas rutas degradativas de la melatonina (Figura 2.4) generan metabolitos bioactivos, como la AMK y la AFMK, que podrían estar implicados en las acciones atribuidas a la melatonina lo que suscita gran interés por su actividad antioxidante (Reiter *et al.*, 2013b).

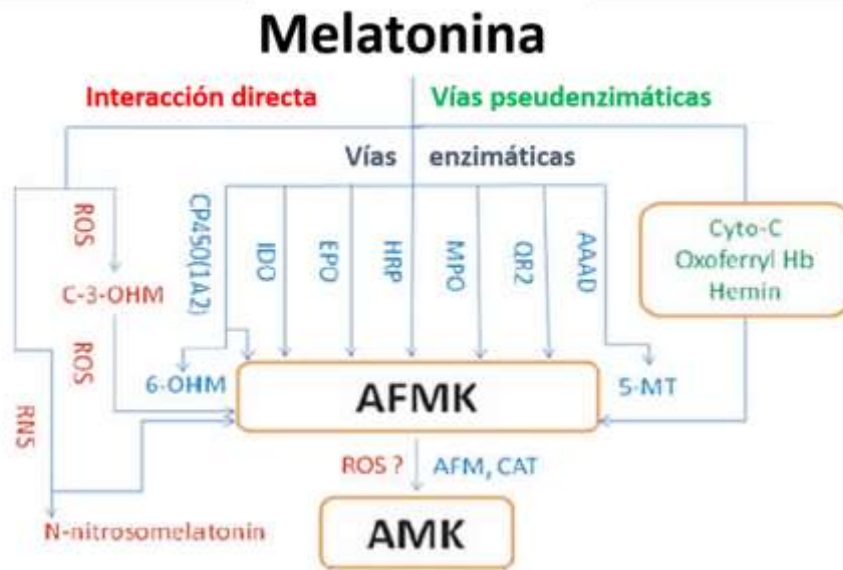


Figura 2.4. Vías de catabolismo de melatonina. **AAA:** aril acilamidasa; **AFM:** ariamina formamidasa; **AFMK:** N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinuramina; **AMK:** N1-acetil-5-metoxikinuramina; **CAT:** catalasa; **C-3-OHM:** 3-hidroximelatonina cíclica; **CP450(1A2):** citocromo P450 (1A2); **Cyto-C:** Citocromo C; **EPPO:** eosinofil peroxidasa; **HRP:** Peroxidasa de rábano; **IDO:** indoleamina-2,3-dioxigenasa; **MPO:** mieloperoxidasa; **Oxoferryl Hb:** Oxoferril hemoglobina; **5-MT:** 5-metoxitriptofamina; **6-OHM:** 6-hidroximelatonina; **RNS:** especies reactivas de nitrógeno; **ROS:** especies reactivas de oxígeno. Adaptado de (Tan *et al.*, 2010)

2.4. Receptores de melatonina

Aunque la versatilidad química de la melatonina le permite actuar directamente atravesando la membrana plasmática, parte de sus funciones principales, como la señalización del ciclo de luz y oscuridad, estarían mediadas por receptores nucleares o transmembrana (Reppert, 1997). Evolutivamente, la capacidad de actuar por medio de receptores también habría sido adquirida posteriormente a su función primaria antioxidante (Tan *et al.*, 2010).

Hasta la fecha, se han identificado en mamíferos dos receptores transmembrana de melatonina de alta afinidad, denominados MT₁ y MT₂ de acuerdo a la nomenclatura oficial (Dubocovich *et al.*, 2005). Ambos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, *G protein coupled receptors*) formados por 7 hélices α transmembrana y en concreto, a la subfamilia que presenta secuencias cortas de aminoácidos específicos (Reppert *et al.*, 1994). La homología existente entre ambos receptores es del 60% (Slominski *et al.*, 2012).

Los receptores MT₁ y MT₂ se expresan en varios tejidos. Se han identificado receptores funcionales de MT₁ en el sistema nervioso central (SNC), principalmente en el núcleo supraquiasmático donde ejerce las funciones de modulación de los ritmos circadianos (Dubocovich *et al.*, 2005), en el sistema cardiovascular donde regula la vasoconstricción (Browning *et al.*, 2000; Dubocovich *et al.*, 2005), en el sistema gastrointestinal, la piel y la retina (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2014; Dubocovich *et al.*, 2005; Slominski *et al.*, 2012).

La expresión del receptor MT₂ se encuentra más limitada siendo el núcleo supraquiasmático, el cerebelo y la retina los tejidos con mayor expresión. No obstante, también se han identificado receptores MT₂ en el pulmón, el tejido coronario y la aorta, en los adipocitos y en las células del sistema inmune (Dubocovich *et al.*, 2005).

Los receptores MT₁ y MT₂ también se han identificado en el tracto reproductor de los mamíferos. En la hembra, se han identificado en las células de la granulosa y en las células luteales del ovario (Soares *et al.*, 2003) y en el miometrio (Schlabritz-Loutsevitch *et al.*, 2003). En el macho, los receptores de melatonina se han detectado en el testículo (Izzo *et al.*, 2010) y en el epidídimo (Shiu *et al.*, 2000) si bien estudios recientes de nuestro grupo también han mostrado la existencia de los receptores de melatonina en las glándulas sexuales accesorias del morueco (Gonzalez-Arto *et al.*, 2017).

Las rutas de transducción originadas por la unión de melatonina a los receptores MT₁ y MT₂ se han caracterizado en varios cultivos celulares primarios y en diferentes tejidos (Jockers *et al.*, 2008). La transducción de señal de los receptores MT₁ y MT₂ esta mediada por la familia de proteínas G. Son proteínas heterotriméricas formadas por las subunidades G α , G β , y G γ . La estimulación de los receptores MT₁ y MT₂ por la melatonina induce un cambio conformacional en el receptor que permite su acoplamiento a las proteínas G, lo que se produce la disociación de la subunidad G α y el complejo G $\beta\gamma$. Estas subunidades pueden interactuar con varios efectores de la cascada de señalización, siendo una de sus principales consecuencias la inhibición de las adenilato ciclasas por medio de subunidades G α_i de tipo inhibitorio, lo que provoca la disminución de la producción de AMPc (Bruce, 2015).

El receptor MT₁ se acopla a una gran variedad de proteínas G tanto inhibitoras de la cascada de señalización (G α_2 , G α_3) como activadoras (G α_s , G α_z , G α_q , G α_{16}). Por medio

de estos sistemas, la melatonina inhibe la generación de AMPc (Morgan *et al.*, 1989) lo que estimula la fosforilación de la proteína quinasa A (PKA) y el factor de transcripción nuclear CREB (Witt-Enderby *et al.*, 1998) y en consecuencia su pérdida de actividad. La activación del receptor incrementa la fosforilación de las proteínas quinasas 1 y 2 activadas por mitógenos (MEK1 y MEK2), las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1 y ERK2) (Witt-Enderby *et al.*, 2000) y la quinasa N-terminal de c-Jun (Chan *et al.*, 2002). Los receptores MT₁ pueden regular el flujo de iones como los canales de potasio activados por calcio (Geary *et al.*, 1998) y que son los responsables de su acción vasoconstrictora.

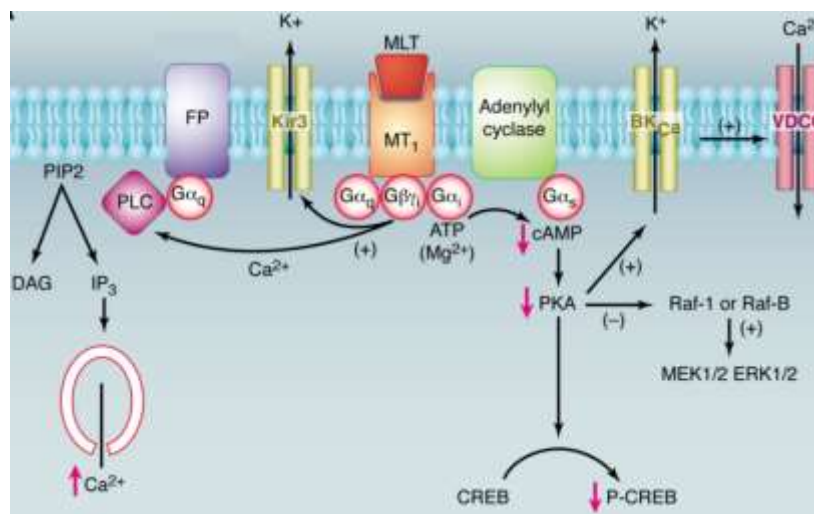


Figura 2.5. Esquema de las principales vías de transducción de señal reguladas por la unión de melatonina al receptor MT₁. **ATP:** Adenosin trifosfato, **Ca²⁺:** Ion calcio, **BK:** Canal de potasio, **CREB:** Factor de transcripción CREB, **DAG:** Diacilglicerol, **ERK:** Quinasa regulada por señales extracelulares, **Gαi:** Subunidad G alfa inhibitoria, **Gαq:** Subunidad G alfa activadora, **IP₃:** Inositol trifosfato, **K⁺:** Ión potasio, **MEK:** Quinasa activada por mitogenos, **MLT:** Melatonina, **MT₁:** Receptor melatonina 1, **PIP₂:** Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, **PLC:** Fosfolipasa C, **PKA:** Proteína quinasa A, **Raf:** Quinasa específica de serinas y treonina, **VDCC:** Canal de calcio dependiente de voltaje. (Masana *et al.*, 2001)

Por otra parte, el receptor MT₂ se acopla, fundamentalmente, a proteínas G inhibitorias (Jockers *et al.*, 2008). Su activación inhibe la formación de AMPc estimulada por forskolina, inhibe las guanilil ciclasas (Boutin *et al.*, 2005) e incrementa la actividad de la fosfolipasa C por medio del complejo Gβγ lo que provoca la hidrolisis del fosfatidilinositol. La activación de esta última ruta induce un aumento de calcio intracelular que lleva a la activación de las MAP-quinasas.

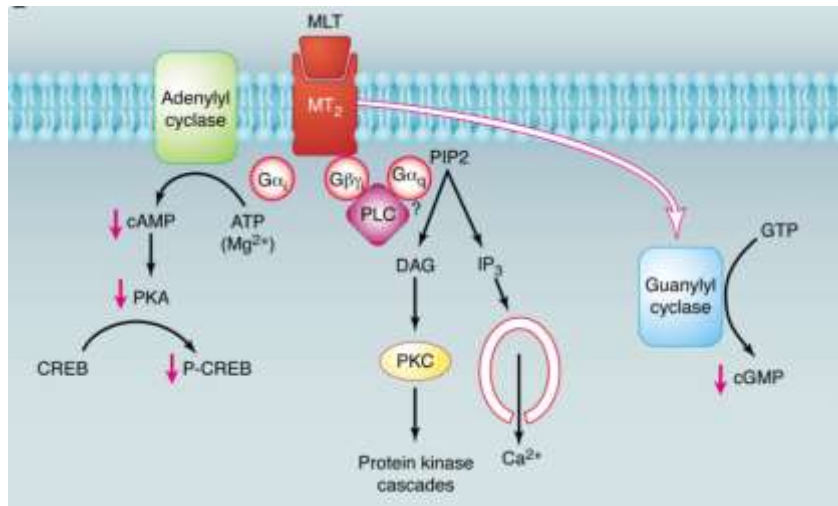


Figura 2.6. Esquema de las principales vías de transducción de señal reguladas por la unión de melatonina al receptor MT_2 . **ATP:** Adenosín trifosfato, **Ca²⁺:** Ion calcio, **cGMP:** Guanosín monofosfato cíclico, **CREB:** Factor de transcripción CREB, **DAG:** Diacilglicerol, **G_{αi}:** Subunidad G alfa inhibitoria, **G_{αq}:** Subunidad G alfa activadora, **GTP:** Guanosín trifosfato **IP₃:** Inositoltrifosfato, **MLT:** Melatonina, **MT₂:** Receptor melatonina 2, **PIP₂:** Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, **PKA:** Proteína quinasa A, **PKC:** Proteína quinasa C (Masana *et al.*, 2001)

La co-expresión de los receptores MT_1 y MT_2 en algunos tipos celulares permite su heterodimerización. Dicha capacidad se ha demostrado en células HEK293 transfectadas con ambos receptores (Ayoub *et al.*, 2002) donde se ha observado una mayor tendencia a la formación del homodímero MT_1 y del heterodímero MT_1/MT_2 que del homodímero MT_2 (Ayoub *et al.*, 2002). No obstante, los efectos funcionales de esta heterodimerización son desconocidos (Jockers *et al.*, 2008). Asimismo, los receptores de melatonina son capaces de heterodimerizar con el receptor huérfano GPR50, lo que puede regular la activación de MT_1 , si bien su acción sobre MT_2 es desconocida (Levoye *et al.*, 2006).

Se han atribuido gran variedad de funciones a los receptores MT_1 y MT_2 pero únicamente unas pocas han sido comprobadas *in vivo*, debido principalmente a la falta de herramientas farmacológicas. A nivel del SNC, la activación del receptor MT_1 inhibe diferentes actividades neuronales (Pandi-Perumal *et al.*, 2008) y la producción de andrógenos (Frungeri *et al.*, 2005). El receptor MT_2 modula los ritmos circadianos al internalizarse tras la exposición a la melatonina al comienzo de la noche (Dubocovich *et al.*, 2005; Hunt *et al.*, 2001). El estudio con ratones knock-out de MT_1 y/o MT_2 indica que no existen grandes diferencias fenotípicas en estos animales, y la mayoría eran de tipo etológico. En concreto, estos ratones presentan una mayor tendencia al

comportamiento depresivo lo que sugiere que la alteración en la regulación de estos receptores participa indirectamente en la instalación de la depresión (Pandi-Perumal *et al.*, 2008).

2.5. Distribución de la melatonina en el organismo

La melatonina circulante en el plasma sanguíneo es secretada principalmente por la glándula pineal, donde la luz inhibe su síntesis mientras que la oscuridad estimula dicho proceso (Axelrod *et al.*, 1965). La transducción de las señales lumínicas se produce mediante el fotorpigmento melanopsina presente en las células ganglionares de la retina y que convierte determinadas longitudes de onda (460-480 nm) en una señal nerviosa que se transmite a través del tracto retino-hipotalámico hasta el núcleo supraquiasmático. Esta “región” envía la información hasta la glándula pineal por medio de las fibras noradrenérgicas del sistema nervioso autónomo simpático (Tan *et al.*, 2014).

En consecuencia, la melatonina presenta su nivel máximo de concentración en el plasma sanguíneo durante la noche mientras que se encuentra a niveles basales durante el día, lo que determina tanto los ritmos circadianos como el ciclo de vigilia y sueño (Odo *et al.*, 2014) o la temperatura corporal (Castanho *et al.*, 2014).

Tradicionalmente, la glándula pineal se consideraba como el único sitio de síntesis de melatonina aunque diferentes trabajos posteriores han demostrado la existencia de una síntesis de melatonina extrapineal así como la presencia de las enzimas de síntesis AANAT y ASMT en multitud de tejidos. Entre ellos, se encuentran el cerebro, la retina, la cóclea, la piel, el tracto gastrointestinal, el hígado, el riñón, el bazo, el corazón, la médula ósea, la placenta, el ovario y el testículo (ver revisión Acuna-Castroviejo *et al.*, 2014). Asimismo, también se ha detectado la presencia de melatonina en diferentes fluidos biológicos como la orina (Claustrat *et al.*, 2005), la saliva (McIntyre *et al.*, 1987), la bilis (Messner *et al.*, 2001), el fluido folicular (Brzezinski *et al.*, 1987), y el plasma seminal (Luboshitzky *et al.*, 2002), en algunos de ellos a concentración superior a la del plasma sanguíneo (Casao *et al.*, 2010a).

La mayoría de los tejidos con síntesis extrapineal de melatonina carecen de regulación fotoperiódica y de variación circadiana y, además, la melatonina producida en ellos no

es liberada a la circulación sanguínea (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2014). Esto sugiere que la función principal de esta melatonina extrapineal sería la de actuar localmente como agente antioxidante frente a las ROS y NOS producidas por los procesos metabólicos aeróbicos y que ocurren durante el día, cuando no hay secreción pineal de melatonina (Zhang *et al.*, 2014).

La concentración de melatonina en sangre puede alcanzar valores superiores a 115 pg/mL en los mamíferos (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2014). Un estudio de la concentración de esta hormona en sangre en la especie porcina estableció un rango entre 2 y 14 pg/mL (Andersson, 2001) mientras que en las especies equinas, la concentración de melatonina varía entre 4 y 20 pg/mL en función del momento del día (Guillaume *et al.*, 2006).

Asimismo, estudios previos de nuestro grupo de investigación determinaron que la concentración de melatonina en el plasma seminal de cerdo varía en un amplio rango entre 1,07 y 26,71 pg/mL y entre 0,67 y 6,47 pg/mL en el burro (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016b) con altas variaciones entre individuos de la misma especie. En consecuencia, la melatonina presente en el plasma seminal de estas especies se encuentra en un orden de magnitud similar a la concentración sanguínea. Esto contrasta con lo que ocurre en otras especies de mamíferos domésticos como la ovina, en la que la concentración de melatonina en el plasma seminal durante el día es superior a la concentración en sangre, lo que sugirió la existencia de una síntesis extrapineal de melatonina en el tracto reproductor del morueco que finalmente fue probada (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016a).

2.6. El papel de la melatonina en la reproducción

La melatonina juega un papel fundamental en la regulación de la reproducción en las especies estacionales mediante la regulación del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal. La reproducción estacional es esencial para asegurar la supervivencia de la descendencia, puesto que potencia que el nacimiento tenga lugar en primavera/verano, cuando hay mayor disponibilidad de alimento y mejores condiciones climatológicas (Cebrian-Perez *et al.*, 2014).

La señal lumínica percibida por la retina es transformada en una señal endocrina por la glándula pineal, lo que se traduce en el incremento de la liberación de melatonina durante la noche. La melatonina actúa a nivel del hipotálamo y regula la secreción

pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) que a su vez estimula la actividad ovárica en la hembra y la producción espermática en el macho (Malpaux *et al.*, 1997). No obstante, la melatonina ejerce acciones opuestas sobre el hipotálamo en función de la especie. Mientras que en los reproductores de días largos, con estación reproductiva en primavera-verano, como las especies equinas (Argo *et al.*, 1991) o el hámster sirio (Turek *et al.*, 1976), el aumento de melatonina nocturna inhibe la secreción de GnRH; en los reproductores de días cortos como las especies ovinas (Malpaux *et al.*, 1997) y caprinas (Delgadillo *et al.*, 1992), cuya estación reproductiva ocurre en otoño/invierno, la melatonina estimula dicho eje.

En algunas especies domesticas en la que se han introducido técnicas de manejo intensivo, como ocurre en la especie porcina, la estacionalidad se ha reducido. Actualmente, el cerdo doméstico se considera una especie no estacional (Claus *et al.*, 1985), si bien se ha observado cierta disminución estacional de los índices reproductivos entre junio y septiembre más marcada en animales explotados en instalaciones abiertas que en aquellos mantenidos en edificios cerrados o climatizados (Martinat-Botte *et al.*, 1984). Además, se ha observado una variación de la concentración de melatonina en el plasma seminal de cerdo entre estaciones (Barranco *et al.*, 2017). Cabe destacar que el jabalí que pertenece a la misma especie que el cerdo doméstico pero a diferente subespecie (*Sus scrofa scrofa* y *Sus scrofa domesticus*, respectivamente) es un reproductor de días cortos.

En general, la estacionalidad reproductiva es más marcada en las hembras que en los machos en los que la producción de espermatozoides es continúa a lo largo del año. Sin embargo, en las especies ovinas y equinas se ha observado una disminución de la calidad seminal y cambios en el comportamiento sexual durante la estación no reproductiva (D'Alessandro *et al.*, 2003; Hoffmann *et al.*, 1999).

La melatonina también influye sobre la fisiología y el desarrollo de los órganos del tracto reproductor masculino. Así, esta hormona promueve el desarrollo de las espermatogonias al estimular la producción del factor neurotrófico GDNF por las células de Sertoli (Niu *et al.*, 2016) y, además, su acción parece estar mediada por los receptores de melatonina (Yang *et al.*, 2014). Además, la melatonina materna transferida al feto

durante la gestación es necesaria para el desarrollo somático de los órganos reproductivos (Diaz *et al.*, 1999).

Por otra parte, diferentes estudios *in vitro* han demostrado que la incubación de los espermatozoides de diversas especies de mamíferos con melatonina ejerce efectos beneficiosos a nivel funcional. El tratamiento *in vitro* con melatonina mejora la motilidad espermática en la especie bovina (Ashrafi *et al.*, 2013) y humana (Espino *et al.*, 2011), y la viabilidad en la especie ovina (Casao *et al.*, 2010a) y porcina (Jang *et al.*, 2010). Otros parámetros como los niveles de ROS y NOS (Rao *et al.*, 2008), la peroxidación lipídica de la membrana espermática (Gadella *et al.*, 2008), los marcadores de apoptosis (Casao *et al.*, 2010b) y la fragmentación del ADN (Sarabia *et al.*, 2009) también disminuyen por acción de la melatonina.

Estas acciones de la melatonina se ha relacionado con sus propiedades antioxidantes (Reiter *et al.*, 2000), lo que la convierten en una molécula ideal para preservar la calidad seminal en medios de refrigeración y criopreservación, empleados en técnicas de inseminación artificial (Martin-Hidalgo *et al.*, 2011) (Ashrafi *et al.*, 2013).

Además, la melatonina parece estar implicada en la modulación de la capacitación espermática (conjunto de cambios que sufre el espermatozoide en el tracto reproductor femenino y que le permiten adquirir la capacidad fecundante) en la especie ovina a través del receptor MT₂ (Casao *et al.*, 2010b).

Dado que los efectos beneficiosos de la melatonina se han demostrado en espermatozoides procedentes de especies no estacionales, estacionales de días cortos y estacionales días largos, es muy probable que su mecanismo de acción esté relacionado con su actividad antioxidante (Cebrian-Perez *et al.*, 2014). Estas acciones las ejercería bien atravesando directamente la membrana plasmática o bien a través de los receptores de melatonina. Recientemente, nuestro grupo ha mostrado la existencia de los receptores MT₁ y MT₂ en espermatozoides varias especies de mamíferos domésticos incluidas la especie equina y la porcina (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016b).

Asimismo, la identificación de enzimas de síntesis AANAT y ASMT en el tracto reproductor de morueco parecen indicar que la melatonina presente en el plasma seminal podría ser sintetizada en dicho sistema (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016a). No

obstante, las variaciones estacionales en la concentración de melatonina en el plasma seminal detectadas tanto en la especie ovina (Casao *et al.*, 2010a) como porcina (Barranco *et al.*, 2017) sugieren que la glándula pineal y los mecanismos de regulación del fotoperiodo también podrían estar implicados.

De este modo, la identificación de la presencia de los receptores de melatonina y las enzimas de síntesis en el tracto de reproductor de otras especies distintas a la ovina corroboraría la importancia de la melatonina en procesos como la espermatogénesis, la maduración espermática, el mantenimiento de la funcionalidad espermática o la adquisición de la capacidad fecundante. Asimismo, mejoraría la comprensión de su papel en la regulación de la reproducción y constituiría una herramienta fundamental para la mejora de las biotecnologías reproductivas.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La melatonina es una hormona ampliamente distribuida (Tan *et al.*, 2014). En los mamíferos se sintetiza principalmente en la glándula pineal y está presente en un gran número de órganos y tejidos, ejerciendo diversas funciones (Tan *et al.*, 2010) entre ellas la regulación de la reproducción estacional (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2014).

Esta hormona tiene una vida media muy corta y se metaboliza rápidamente en el torrente circulatorio (Hardeland, 2008), aunque se ha detectado su presencia en otros fluidos biológicos (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2014) como el plasma seminal. Estudios previos de nuestro grupo han descrito la presencia de melatonina en el plasma seminal de diferentes especies como la ovina, la equina y la porcina (Casao *et al.*, 2010a; Gonzalez-Arto *et al.*, 2016b). Asimismo, se han identificado las enzimas responsables de la síntesis de melatonina (AANAT y ASMT) en el tracto reproductor masculino de la especie ovina, lo que sugiere la hipótesis de que la melatonina presente en el plasma seminal podría tener un origen extrapineal (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016a).

Por otra parte, los receptores de melatonina se encuentran presentes en los espermatozoides de diversas especies, independientemente de su tipo de reproducción estacional, como la especie porcina y el burro (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016b), lo que sugiere la existencia de mecanismos regulatorios de la melatonina a lo largo de la vida de las células espermáticas. Igualmente, la melatonina ejerce efectos beneficiosos a nivel fisiológico sobre los espermatozoides de diversas especies de mamíferos (ver revisión de (Cebrian-Perez *et al.*, 2014) y sobre el desarrollo y la funcionalidad de diferentes órganos del tracto reproductor masculino (Diaz *et al.*, 1999; Niu *et al.*, 2016).

En base a los antecedentes expuestos, la **hipótesis** que se plantea en este trabajo es que la melatonina, presente en el plasma seminal del cerdo y del burro, podría ser sintetizada en alguno de los órganos del tracto reproductor de estas especies, y además, ejercer sus funciones de modulación a través de receptores específicos de membrana presentes en el tracto reproductor.

Por consiguiente, los **objetivos** del presente trabajo fueron los siguientes:

1. Identificar la presencia a nivel génico y proteico de los receptores específicos de membrana para la melatonina MT₁ y MT₂ en el tracto reproductor de cerdo y burro, y evaluar la existencia de diferencias en la expresión génica entre los diferentes órganos.
2. Identificar la presencia de enzimas implicadas en la síntesis de melatonina (AANAT y ASMT) en el tracto reproductor de cerdo y burro y analizar la posible variación en expresión génica entre los diferentes órganos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Obtención de tejidos

El estudio de la expresión génica y proteica se realizó en diferentes órganos del tracto reproductor masculino de cerdo y burro: testículo (T), epidídimo (cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co)), próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB). Los órganos se obtuvieron a partir de los aparatos reproductores de 3 verracos sacrificados en otoño y tres burros sacrificados en primavera en la Universidad Autónoma de Barcelona, y que se enviaron a la Universidad de Zaragoza en hielo seco. Las muestras del tracto reproductor de cerdo y de burro se almacenaron a -80 °C hasta su uso, con el objetivo de evitar la activación de RNAsas y degradación de proteínas.

Como control en los análisis a nivel proteico se emplearon muestras de testículo (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016a) y espermatozoides ovinos (Casao *et al.*, 2012). Las muestras de testículo ovino procedían de un macho de *Rasa Aragonesa* sacrificado en el matadero de Mercazaragoza. Las muestras de espermatozoides ovinos se obtuvieron de machos adultos de raza *Rasa Aragonesa*, donados por ANGRA (Asociación Nacional de Ganaderos de *Rasa Aragonesa*) y estabulados en el Servicio de Experimentación animal (SEA) de la Universidad de Zaragoza. Tanto el testículo como los espermatozoides ovinos se conservaron siguiendo el mismo protocolo.

4.2. Aislamiento y limpieza del ARN total

El ARN total de los diferentes órganos del tracto reproductor masculino se extrajo mediante homogenización de 100 mg de cada tejido en TRI REAGENT (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) a través del método tiocianato-fenol-cloroformo (Chomczynski *et al.*, 1987). La concentración de ARN se estimó a partir del valor de absorbancia a 260 nm medido en un NanoDrop ND-100 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

La pureza de la muestra se comprobó mediante el ratio de absorbancias 260/280 nm, el cuál debía encontrarse alrededor de 2. Asimismo, la calidad de ARN extraído se verificó confirmando la presencia de las bandas de ARN ribosómico 28S y 18S. Para ello, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE (10,8 g/L TRIS base, 0,4% EDTA

y 5,5 g/L de ácido bórico) con bromuro de etidio a una concentración final de 200 ng/mL. Las condiciones de la electroforesis fueron 80 V durante 30 minutos y el gel se visualizó en luz ultravioleta (Gel Doc, Biorad Laboratories, Hércules, California).

Las trazas de ADN se limpiaron por medio del kit *TURBO DNA-free* de Ambion (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). El volumen de reacción fue de 50 µl y estaba compuesto por 10 µg de ARN, 5 µl de tampón *TURBO DNase 10X*, 1 µl de enzima *TURBO DNase* (2 U/µl) y agua DNase/RNase Free (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) hasta completar el volumen final. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 20 min. Seguidamente, se añadieron 5 µl de *DNase Inactivation Reagent* para inactivar la enzima y se incubó durante 2 minutos más a temperatura ambiente. La presencia de las bandas de ARN ribosómico 28S y 18S se comprobó nuevamente por electroforesis así como la concentración de ARN mediante espectrofotometría. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su retrotranscripción.

4.3. Síntesis de ADNc

El ADNc se obtuvo mediante retrotranscripción del ARN obtenido de los órganos del tracto reproductor masculino con el kit *Super Script III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos). Para ello, a 500 ng de RNA total se añadió una mezcla de dNTPs a una concentración final de 1 mM, y cebadores Oligo-(dT) 20 a una concentración final de 5 µM. La mezcla se desnaturalizó a 65 °C durante 5 minutos y seguidamente, se añadieron 10 µl de la mezcla de reacción (Tris-HCl 40 mM pH 8,4, KCl 100 mM, MgCl₂ 10mM, DTT 20 mM, *RNase OUT* 4 U/µl, *Super Script III RT* 20 U/µl). La síntesis del ADNc constó de una primera etapa de incubación a 50 °C durante 50 minutos y una etapa final a 85 °C durante 5 minutos. Las trazas de ARN no retrotranscritas se eliminaron mediante un tratamiento con *RNase H* (0,2 U/µl) durante 20 minutos a 37 °C. El proceso completo de retrotranscripción se realizó en el termociclador MyCycler (Biorad laboratories, Hercules, California). El ADNc obtenido se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

La correcta retrotranscripción del ADNc de los tejidos del tracto reproductor se verificó mediante la amplificación por PCR del gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

(GAPDH), cuya expresión es constitutiva en ambas especies. Los cebadores utilizados amplifican un fragmento de 90 pb. Sus secuencias se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Secuencias de cebadores directo y reverso del gen GAPDH para las amplificaciones por PCR realizadas en el proyecto.

Especie	Cebador directo (5'-secuencia-3')	Cebador reverso (5'-secuencia-3')	Tamaño (pb)
Cerdo	5'-GGTCGGAGTGAACGGATTT-3'	5'-ATGTAGTGGAGGTCAATGAAGG-3'	114
Burro	5'-CCCAGCAAGAGAAGGAGAAAG-3'	5'-GTCTGAGATGGAAACTGTGGAG-3'	106

El mix de reacción de la PCR estaba compuesto por 2,5 µl de la enzima *REDTaq DNA polimerase* 0,05 U/µl (Sigma-Aldrich), 5 µl de tampón *REDTaq DNA polymerase 10X* (100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 11 mM MgCl₂ y 0,1% de gelatina), 80 µM de dNTPs y 0,32 µM de cebadores de GAPDH. Se añadieron 48 µl de mezcla de reacción a 2 µl del ADNc previamente obtenido o de agua DNase/RNase Free (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) en el caso del control negativo.

Las condiciones de reacción de la PCR consistieron en un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos, al que se suceden 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, alineamiento a 58 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 45 segundos. Por último, se realizó una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

Los productos de PCR se separaron en gel de agarosa al 3% en tampón TBE con *SYBER Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) diluido 1:10000 durante 45 minutos a 80 V y se visualizaron en luz ultravioleta. Se empleó el marcador de pesos moleculares 50 bp Dye Plus DNA Ladder (Takara JoreaBiomedical Inc, Seoul, Coreal del Sur).

4.4. Amplificación del cDNA por PCR

Las secuencias específicas para cada gen estudiado se amplificaron mediante la técnica PCR en el caso del gen de ASMT, al no estar la secuencia del gen descrita en las bases de datos y qPCR, en el caso del gen de AANAT, MT₁ y MT₂.

Los cebadores para cada uno de los genes estudiados fueron diseñados utilizando los programas primer-BLAST (NCBI) y Beacon Designer© Free Edition, y comprobados por análisis BLAST (NCBI) para verificar la especificidad génica. La secuencia de los cebadores empleados para cerdo y para burro se muestra en las tablas 4.2 y 4.3, respectivamente. En el caso del gen ASMT de la especie porcina, cuya secuencia de nucleótidos no está descrita en las bases de datos, se emplearon cebadores diseñados para la amplificación de dicho gen en especies cercanas filogenéticamente, como la ovina y bovina, y unos cebadores descritos en la literatura para la amplificación del gen ASMT en la glándula pineal porcina (Romerowicz-Misielak *et al.*, 2015). En el anexo I tablas 1 y 2, se muestra el número de acceso en la base de datos GenBank de las secuencias empleadas para el diseño de los cebadores específicos para cada uno de los genes de interés.

Tabla 4.2. Secuencias de cebadores directo y reverso para las amplificaciones por PCR realizadas en el proyecto a partir del ADNc del tracto reproductor de cerdo

Gen	Cebador directo (5'-secuencia-3')	Cebador reverso (5'-secuencia-3')	Tamaño
MT ₁	5'-CAGACTGAAACCACAGGACTT-3'	5'-TTAGAGGAGCCCAGCAAATG-3'	83 pb
MT ₂	5'-AGGGTCTGTCTTCGCTGTTA-3'	5'-CCCTATGCTCCTTGATTCTCTTG-3'	94 pb
AANAT	5'-CGTGGGAGAGAGACAAAGAAA-3'	5'-CATCTGCCCTCTTGGTAGTG-3'	127 pb
ASMT ovino	5'-CTGCAGAGACTGTATCGGGC-3'	5'-CAGTGCATCTCCGTGAAGGT-3'	104 pb
ASMT bovino	5'-TCACACGCAAGGAAATGGATAG-3'	5'-GAGTACAGCAGCGTGGTCAG-3'	110 pb
ASMT porcino	5'-CATGGTGTCCCAGTTCTCT-3'	5'-CAGCTTCAGGGACACACAGA-3'	Desconocido
β-actina	5'-TCTGGCACACACCTTCTA-3'	5'-TCTTCTCACGGTTGGCTTTG-3'	102 pb

Tabla 4.3. Secuencias de cebadores directo y reverso para las amplificaciones por PCR realizadas en el proyecto a partir del ADNc del tracto reproductor de burro.

Gen	Cebador directo (5'-secuencia-3')	Cebador reverso (5'-secuencia-3')	Tamaño
MT ₁	5'-CAGACTGAAACCACAGGATTT-3'	5'-TTAGAGGAGCCCAGCAAATG-3'	83 pb
MT ₂	5'-CAGGAAGGTCAAGTCAGAGAAC-3'	5'-CCCAGCAGATGGCGAAGA-3'	101 pb
AANAT	5'-CCACACAGAGCATCCACTAC-3'	5'-GGTGAGGCAGCGAAACT-3'	119 pb
ASMT	5'-GCCAAGGAGTGTGTTTCTCT-3'	5'-GCGGGAAGTGTGTCTTT-3'	91 pb
β-actina	5'-CTGGCACCACACCTTCTAC-3'	5'-CATGATCTGGGTCATCTTCTCG-3'	115 pb

Los reactivos y la mezcla de reacción empleados para la amplificación por PCR del gen de ASMT son los mismos que para la amplificación de GAPDH. Se llevó a cabo con el ADNc de cada uno de los órganos del tracto reproductor obtenidos anteriormente.

La amplificación del gen de ASMT con los cebadores basados en la especie ovina y bovina se llevó a cabo con las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos sucedida por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, de hibridación a 58 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 45 segundos. La extensión final fue a 72 °C durante 5 minutos. En el caso de los cebadores descritos en (Romerowicz-Misielak *et al.*, 2015) se realizaron 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 30 segundos a 72 °C, precedidos por un paso de desnaturalización inicial de 2 minutos a 95 °C y finalmente una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

Los productos de amplificación obtenidos tras las PCR se separaron en un gel de agarosa al 3% en TBE con *SYBER Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) diluido 1:10000 durante 45 minutos a 80 V. El marcador de pesos moleculares empleado fue 50 bp Dye Plus DNA Ladder (Takara Korea Biomedical Inc, Seoul, Corea del Sur).

4.5. Cuantificación de la expresión génica: PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa (qPCR) es una técnica que permite la cuantificación de la expresión génica relativa mediante la determinación de la relación entre la cantidad del gen diana y un gen endógeno de referencia, cuya expresión es constitutiva e invariable en las

diferentes condiciones experimentales. La expresión se compara calculando el valor normalizado de muestras con la misma cantidad de ADNc para cada tejido.

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. Se utilizaron los cebadores descritos en las tablas 4.2 y 4.3. El estudio previo de la eficiencia de los cebadores con diluciones seriadas de muestras de cDNA de testículo permitió determinar su concentración óptima, que fue 200 mM en todos ellos a excepción de los cebadores de GAPDH de cerdo, que fue 100 mM. La reacción de qPCR 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 disociación de los productos amplificados por PCR (melting) consistente en un aumento de temperatura progresiva de 65 °C a 95 °C con incrementos de 0,5 °C cada 5 segundos.

El ADNc de cada tejido se analizó por duplicado para cada uno de los genes y se minimizó el error de pipeteo mediante la preparación de una mezcla de reacción con los compuestos necesarios para la qPCR. Cada muestra se compuso por 18 µl de mezcla de reacción y 2 µl de ADNc o agua en el caso del control negativo.

La cuantificación de la expresión génica se llevó a cabo empleando el método $\Delta\Delta Ct$ y los resultados se expresaron como $-\Delta\Delta Ct$ (Livak *et al.*, 2001). Los genes endógenos de referencia utilizados fueron GAPDH y β -actina. Para comprobar que la qPCR se había realizado correctamente, los productos de amplificación obtenidos se separaron en un gel de agarosa al 3% en TBE con *SYBER Safe DNA Gel*, en las condiciones descritas en el punto anterior.

4.6. Detección de las proteínas por Western-Blot

4.6.1. Extracción de proteínas de los tejidos

La extracción de proteínas de los diferentes órganos del tracto reproductor de cerdo y burro se realizó a partir de 200 mg de cada muestra, mantenida a -80 °C. Se añadieron 2 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, EEUU)) y se procedió a la

homogenización mediante un homogeneizador *OKA T25 Digital Ultra Turrax*® *Homogenizer* (Staufen, Alemania). El homogenizado se incubó a 100 °C durante 4 minutos en un baño de arena y a continuación se centrifugó a 13000 x g durante 5 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se congeló a -20 °C hasta su uso. La concentración de proteínas se evaluó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

4.6.2. SDS-PAGE y Western-Blot

Todas las muestras estudiadas se sometieron al mismo procedimiento. Cada muestra se diluyó hasta contener 15 µg totales 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) y se separaron en una dimensión siguiendo el método Laemmli (Laemmli, 1970) utilizando un patrón de pesos moleculares, de 10 a 250 kDa (Biorad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos). Se utilizaron geles de acrilamida del 12% y las condiciones de electroforesis fueron 130 V durante 90 minutos, a 4 °C.

Una vez separadas las proteínas, fueron transferidas a una membrana de PVDF utilizando el sistema *Trans-blot Turbo* (Biorad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos). A continuación, los sitios no específicos de unión se bloquearon incubando estas membranas un mínimo de 2 horas en tampón fosfato salino (PBS, 136 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄) con albúmina sérica bovina (BSA) al 5% (p/v).

La detección de los receptores de melatonina y las enzimas de síntesis de la misma se realizó mediante la incubación durante una noche a 4 °C con el anticuerpo policlonal Anti-melatonin receptor 1A generado en conejo (GeneTex, Irvine, California, Estados Unidos) a una dilución 1:750 para MT₁, el anticuerpo policlonal Anti-melatonin receptor 1B generado en conejo (Acris antibodies GmbH, Herford, Alemania) diluido 1:500 para MT₂, el anticuerpo monoclonal de conejo Anti-N-acetilserotonine-O-metiltransferase (Santa Cruz Biothecnology, Dallas, Texas, Estados Unidos) diluido 1:1500 para ASMT y el anticuerpo policlonal Anti-Serotonin N-acetyltransferase antibody generado en conejo (Abcam, Cambridge, Reino Unido) a una dilución 1:1500 para AANAT. Los anticuerpos se diluyeron en PBS-Tween (PBST, PBS con 0,1% (p/v) de Tween 20) con BSA al 1% (p/v).

Al día siguiente, tras realizar tres lavados de 15 minutos de duración con PBST, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario diluido 1:20000 en PBST con BSA al 1% (p/v), durante 1 hora y 15 minutos a temperatura ambiente en semioscuridad. Las membranas con muestras proteicas de cerdo se incubaron con el anticuerpo secundario policlonal *anti-rabbit* IgG (H + L) IRDye 680RD generado en burro (LI-COR, Biosciences, Lincoln, NE, Estados Unidos) y las membranas con muestras de burro, con el anticuerpo secundario policlonal *anti-rabbit* IgG (H + L) DyLight 680 CW (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) generado en cabra. Posteriormente, las membranas se escanearon utilizando el equipo Odyssey Clx (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, Estados Unidos). Además las membranas se tiñeron con azul Coomassie durante 30 minutos y se destiñeron con 30% de metanol y con 10% de ácido acético en agua miliQ durante toda la noche, para poder verificar que la transferencia se había realizado correctamente.

4.7. Análisis Estadístico

El análisis estadístico de la cuantificación de la expresión génica se realizó con el software *GradPad InStat* (5.01; San Diego, CA, USA). Primero se comprobó la distribución normal de los datos obtenidos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, para después utilizar un análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA) para analizar las diferencias entre los órganos estudiados. Los resultados se muestran como la media \pm S.E.M. (error estándar de la media).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Extracción de RNA y retrotranscripción

Se consiguió extraer ARN de todos los órganos del tracto reproductor masculino de los 3 individuos en las especies de cerdo y burro. En la tabla 1 del anexo II se muestra la concentración media de ARN obtenido de cada órgano tras la limpieza del DNA.

Tras la síntesis del ADNc, se confirmó la buena calidad del material genético obtenido y la eficiencia de la retrotranscripción mediante la amplificación por PCR del gen constitutivo GAPDH. Se obtuvo una única banda definida de 106 pb y 114 pb en las muestras de burro y cerdo, respectivamente, correspondiente a la amplificación de un fragmento específico de dicho gen. En las figuras 5.1 y 5.2 se muestra el resultado de la amplificación de GAPDH a partir del c-DNA de los diferentes órganos del tracto reproductor de dos individuos, uno de la especie porcina y otro de la especie equina, respectivamente.

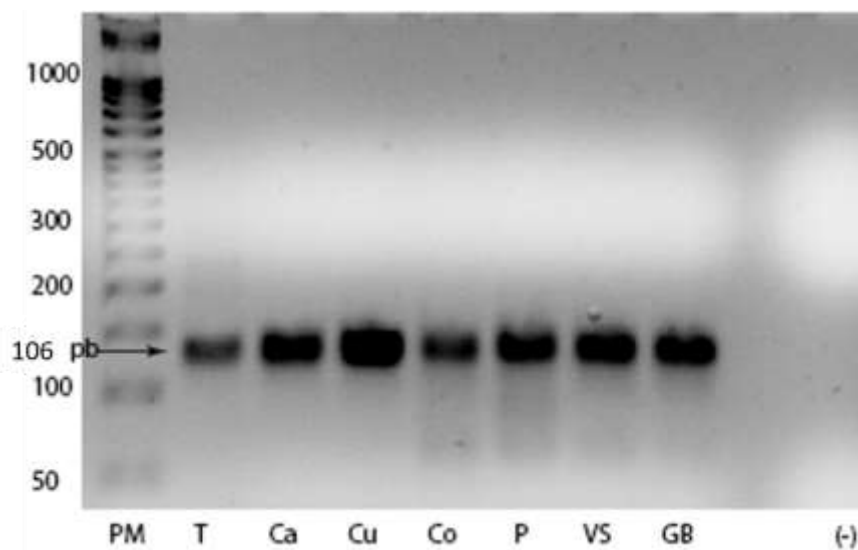


Figura 5.1. Expresión génica de GAPDH en los órganos del tracto reproductor de burro: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB) y control negativo (-).

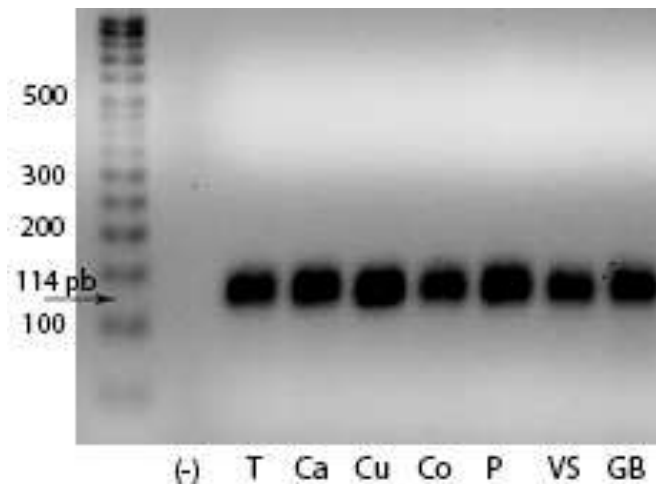


Figura 5.2. Expresión génica de GAPDH en los órganos del tracto reproductor de cerdo: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB) y control negativo (-).

Por otra parte, también se realizó la extracción de proteínas los diferentes órganos del tracto reproductor masculino de cerdo y burro, junto con el testículo de morueco y los espermatozoides ovinos que fueron en control positivo en Western-Blot. La concentración de proteínas obtenida se muestra en la tabla 2 del anexo II.

5.2. Análisis de la expresión génica y proteica en el cerdo

5.2.1. Identificación de los receptores de melatonina

La amplificación del gen de MT₁ mediante el empleo de cebadores específicos dio lugar a la obtención de un único producto de qPCR de 83 pb en todos los órganos del tracto reproductor masculino estudiados en la especie porcina, como se aprecia en la figura 5.3. Igualmente, también se consiguió la amplificación de un fragmento de 94 pb del gen de MT₂ mediante los cebadores específicos, a partir del ADNc obtenido en todos los órganos estudiados (Figura 5.4). De esta forma, estos resultados demostraron la existencia de ARN mensajero codificante para la síntesis de ambos receptores de melatonina en el tracto reproductor masculino de cerdo.

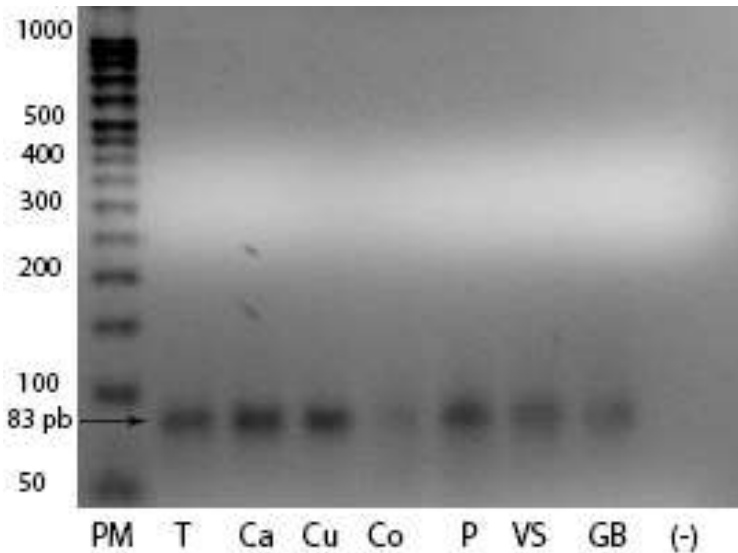


Figura 5.3. Expresión génica de MT₁ en los órganos del tracto reproductor de cerdo: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB) y control negativo (-).

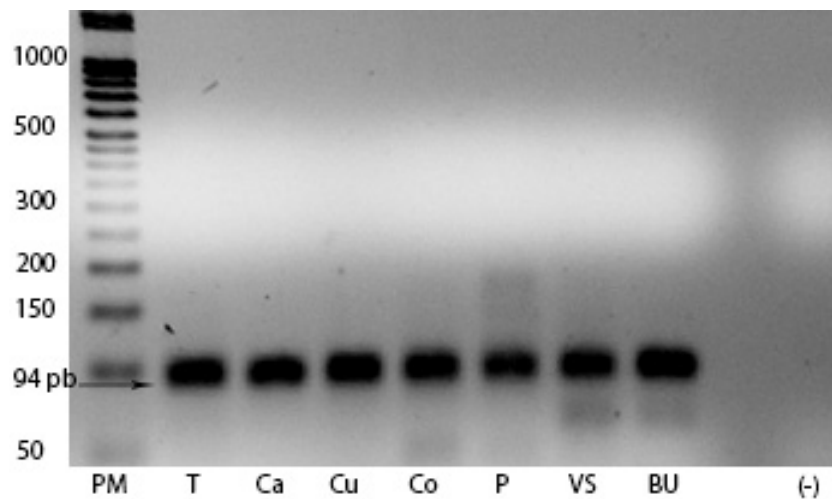


Figura 5.4. Expresión génica de MT₂ en los órganos del tracto reproductor de cerdo: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB) y control negativo (-).

La cuantificación de la expresión génica de MT₁ mostró una mayor expresión en el testículo, la cabeza y el cuerpo del epidídimo, la próstata y las vesículas seminales frente a la cola del epidídimo del cerdo, si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 5.5).

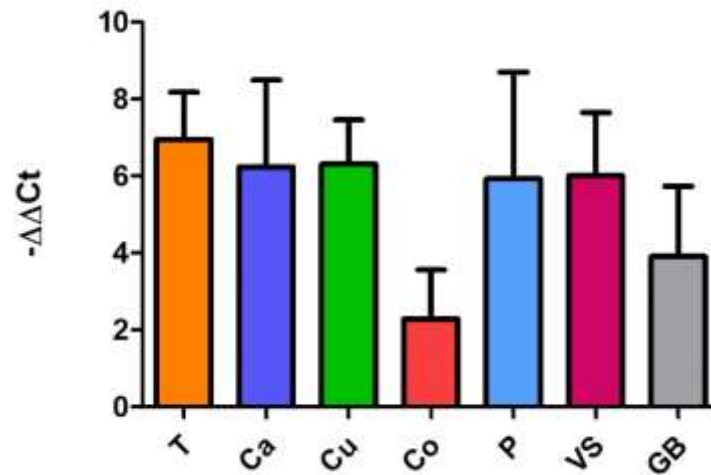


Figura 5.5. Cuantificación de la expresión génica de MT_1 , evaluada por qPCR en los diferentes órganos del tracto reproductor de cerdo: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB). Los resultados se muestran como media \pm S.E.M. (n=3).

Análogamente, no se encontraron diferencias significativas en la expresión génica de MT_2 entre ninguno de los tejidos del tracto reproductor de cerdo (Figura 5.6), aunque esta fue ligeramente superior en el testículo, la próstata y las vesículas seminales.

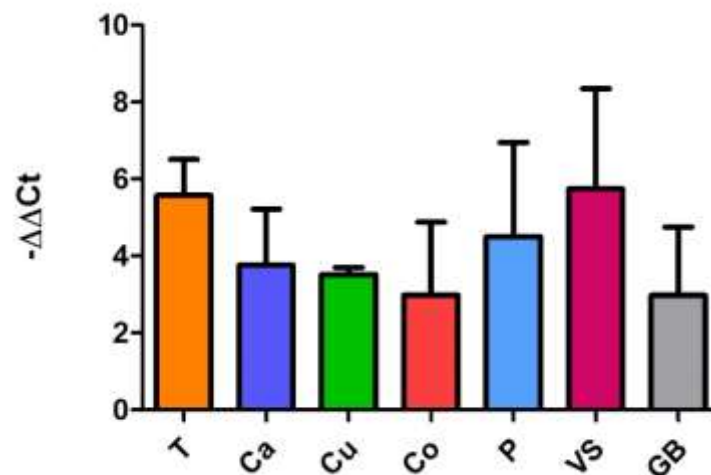


Figura 5.6. Cuantificación de la expresión génica de MT_2 , evaluada por qPCR, evaluada por qPCR en los diferentes órganos del tracto reproductor de cerdo: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB). Los resultados se muestran como media \pm S.E.M. (n=3).

Cabe destacar la existencia de una gran variabilidad en la expresión génica entre los individuos analizados, principalmente en las glándulas accesorias. Esto podría atribuirse a la calidad del ADNc obtenido o, más probablemente, a que existe variabilidad entre individuos de una misma especie en la expresión de los receptores de melatonina en

dichos órganos, debida a su edad, su fertilidad o determinados factores ambientales (Ramírez *et al.*, 2009). No obstante, al carecer de dicha información sobre los diferentes individuos, dicha hipótesis no pudo ser corroborada.

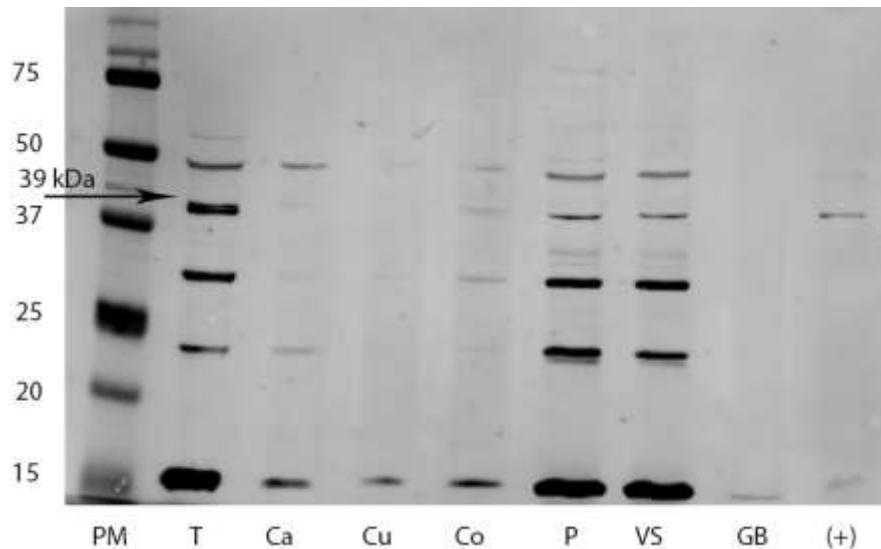


Figura 5.7. Presencia del receptor MT_1 , identificado mediante Western-Blot con anticuerpos específicos en proteínas de los diferentes órganos tracto reproductor de cerdo: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB) y control positivo, espermatozoide ovino (+).

Los análisis de Western-Blot de las proteínas extraídas del tracto reproductor masculino de cerdo indicaron la presencia de una banda a 39 kDa, compatible con el peso molecular de MT_1 (Reppert *et al.*, 1994), en el testículo, la próstata, las vesículas seminales y en el control positivo (proteínas de espermatozoide ovino), como se aprecia en la figura 5.7. Igualmente, esta banda apareció con menor intensidad en la cabeza y la cola del epidídimo. Además, se encontraron bandas marcadas con gran intensidad a 32 y 23 kDa en el testículo, la próstata y las vesículas seminales y que se podrían relacionar con la activación del receptor (Gilman, 1995) puesto que MT_1 es un receptor GPCR y su activación promueve la disociación de las proteínas en dímeros α y $\beta\gamma$ (Dubocovich *et al.*, 2005). La menor intensidad y ausencia de estas bandas en las diferentes regiones del epidídimo sugiere un diferente nivel de activación de los receptores de melatonina en dicho órgano. En las glándulas bulbouretrales, no se detectó la presencia de ninguna de las bandas anteriormente mencionadas. Por último, en todos los órganos a excepción de las glándulas bulbouretrales se observaron bandas a 50 kDa y que podrían ser

resultado de la oligomerización de MT₁ consigo mismo (Jockers *et al.*, 2008), con MT₂ (Ayoub *et al.*, 2002) o con proteínas G acopladas a receptores (Levoye *et al.*, 2006).

El testículo, la próstata y las vesículas seminales fueron los tejidos con una mayor expresión a nivel proteico de MT₁ lo que concuerda con los resultados de expresión génica, donde dichos tejidos mostraban una expresión ligeramente superior. Por otra parte, la expresión en las diferentes regiones del epidídimo a nivel proteico y génico pareció ser más variable.

La caracterización de la expresión proteica de MT₂ por Western-Blot reveló la existencia de una banda de baja intensidad de 39 kDa en todos los tejidos del tracto reproductor de cerdo (Figura 5.8), a excepción de en las glándulas bulbouretrales y que corresponde al peso molecular descrito para MT₂ (Reppert *et al.*, 1995). No obstante, esta banda no se detectó en el espermatozoide ovino (control positivo). Sin embargo, este control positivo mostro una banda doble de gran intensidad, entre 45-50 kDa, descrita previamente (Casao *et al.*, 2012). Esta banda se identificó también en las distintas partes del epidídimo, las vesículas seminales y el testículo y con menor intensidad en la próstata. Además, también se identificó una banda doble en torno a 75 kDa en el control positivo, y que también apareció en la cola del epidídimo, y en forma de banda única en la cabeza y el cuerpo del epidídimo, la próstata y las vesículas seminales. Tanto la doble banda a 45-50 kDa como la banda a 75 kDa se podrían relacionar con la formación de heterodímeros MT₁/ MT₂, si bien la mayor intensidad de la banda a 45-50 kDa en el Western-Blot de MT₂ con respecto al de MT₁ sugiere que MT₂ podría estar formando heterodímeros con otro receptor GPCR (Levoye *et al.*, 2006) y no con MT₁. Finalmente, se detectaron bandas de 35 kDa y 32 kDa tanto en el control positivo como en los diferentes tejidos del tracto reproductor y que también sugeriría distintos niveles de activación del receptor (Gilman, 1995) como en el caso de MT₁.

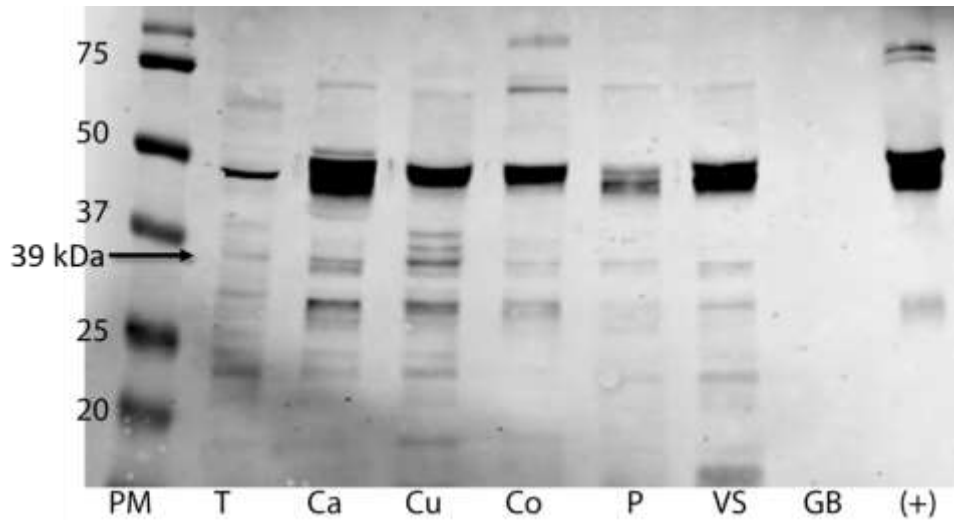


Figura 5.8. Presencia del receptor MT_2 , identificado mediante Western-Blot con anticuerpos específicos en proteínas de los diferentes órganos tracto reproductor de cerdo: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB) y control positivo, espermatozoide ovino (+).

Si bien sería necesario realizar un estudio de densitometría, los resultados indicaron que el receptor MT_2 presenta un grado de expresión proteica similar entre el testículo, las diferentes regiones del epidídimo, la próstata y las vesículas seminales, coincidente con los resultados de expresión génica, mientras que su expresión proteica en las glándulas bulbouretrales no fue detectada con la técnica usada.

El hecho de que no se detectara ninguno de los receptores de melatonina en las glándulas bulbouretrales puede deberse a que, debido a su función predominantemente secretora, estas glándulas producen una gran cantidad de sustancias que forman el plasma seminal (Senger, 2003), siendo la mayoría de ellas de carácter proteico. Por lo tanto, es probable que los receptores de melatonina se encuentren presentes en este órgano pero que su presencia quede enmascarado por la alta concentración del resto de proteínas extraídas.

Hasta la fecha, la presencia de los receptores de melatonina en el tracto reproductor porcino había sido únicamente detectada en la hembra en las células de la granulosa, las células del *cumulus*, el oocito (Kang *et al.*, 2009) y los espermatozoides en el verraco (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016b). Por tanto, esta es la primera vez que se describe su amplia distribución en el tracto reproductor masculino de esta especie.

5.2.2. Identificación de las enzimas de síntesis de la melatonina

La amplificación del ADNc mediante cebadores específicos para la identificación de AANAT originó un producto único y bien definido de qPCR de 127 pb en todos los tejidos del tracto reproductor masculino de cerdo, como se muestra en la figura 5.9.

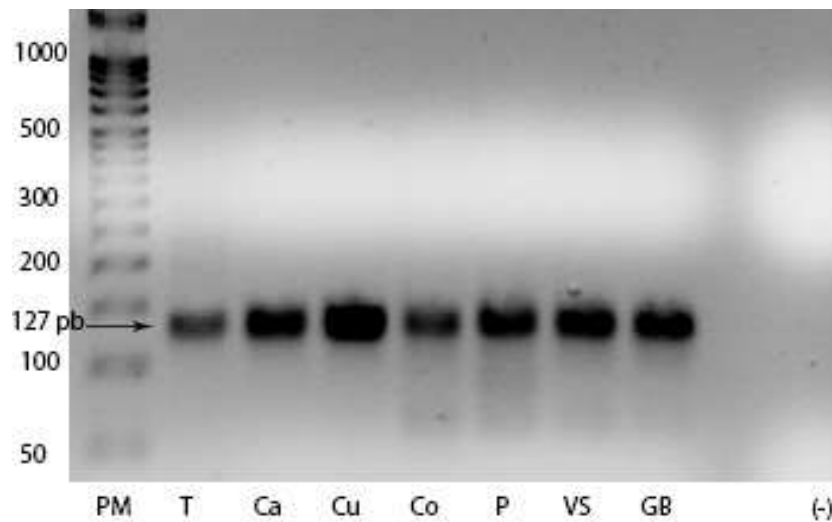


Figura 5.9. Expresión génica de AANAT en los órganos del tracto reproductor de cerdo: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB) y control negativo (-).

Además, la cuantificación de la expresión génica mostró que la expresión del ARN mensajero de AANAT fue significativamente superior ($p < 0,05$) en la próstata respecto al resto de órganos del tracto reproductor masculino de cerdo (Figura 5.10).

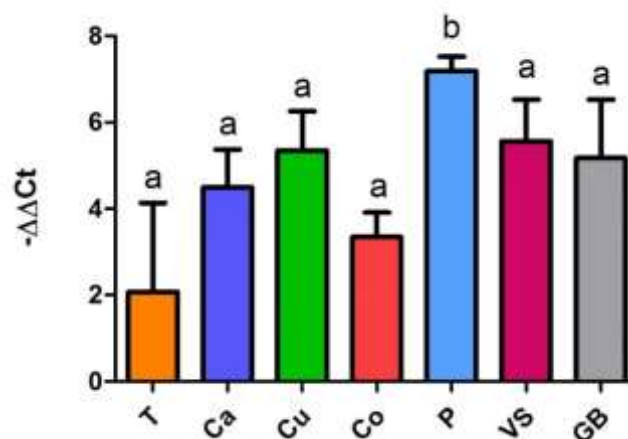


Figura 5.10. Cuantificación de la expresión génica de AANAT, evaluada por q-PCR, evaluada por q-PCR en los diferentes órganos del tracto reproductor de cerdo: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB) y control negativo (-). Los resultados se muestran como media \pm S.E.M. ($n=3$). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

En cuanto a la identificación de la enzima ASMT, responsable de la etapa final en la síntesis de melatonina, no se pudo detectar la presencia de su ARN mensajero en ninguno de los órganos del tracto reproductor mediante la realización de una PCR con los cebadores descritos en la literatura científica para el estudio de ARN mensajero de ASMT en la glándula pineal porcina (Romerowicz-Misielak *et al.*, 2015). Las bandas observadas al final de todos los carriles corresponden a una alta dimerización de los cebadores (Figura 5.11).

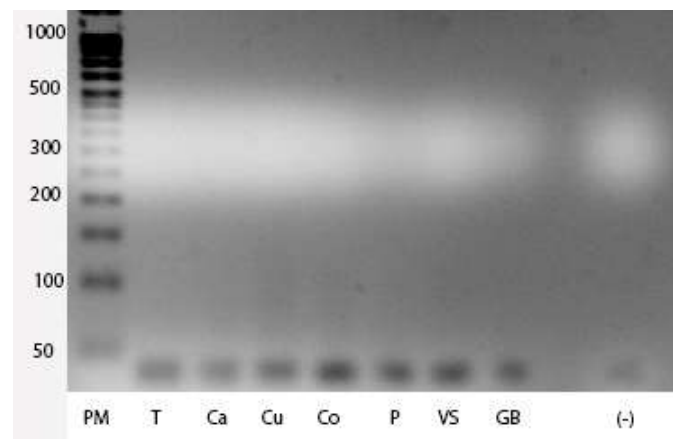


Figura 5.11. Expresión génica de ASMT por PCR de punto final con los cebadores utilizados por Romerowicz-Misielak *et al.* (2015), en los diferentes órganos del tracto reproductor de cerdo: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB) y control negativo.

Adicionalmente, se utilizaron cebadores específicos para la amplificación de un fragmento del gen de ASMT en especies filogenéticamente cercanas a la porcina, como la ovina y la bovina. Sin embargo, con los cebadores diseñados a partir de la secuencia de ASMT bovina no se obtuvo ninguna amplificación, mientras que con los cebadores sintetizados a partir de la secuencia ovina se obtuvieron diversas bandas con diferentes pesos moleculares en los diferentes órganos del tracto reproductor estudiados (figura 5.12). En consecuencia, se concluyó que estas regiones amplificadas no correspondían a la enzima ASMT.

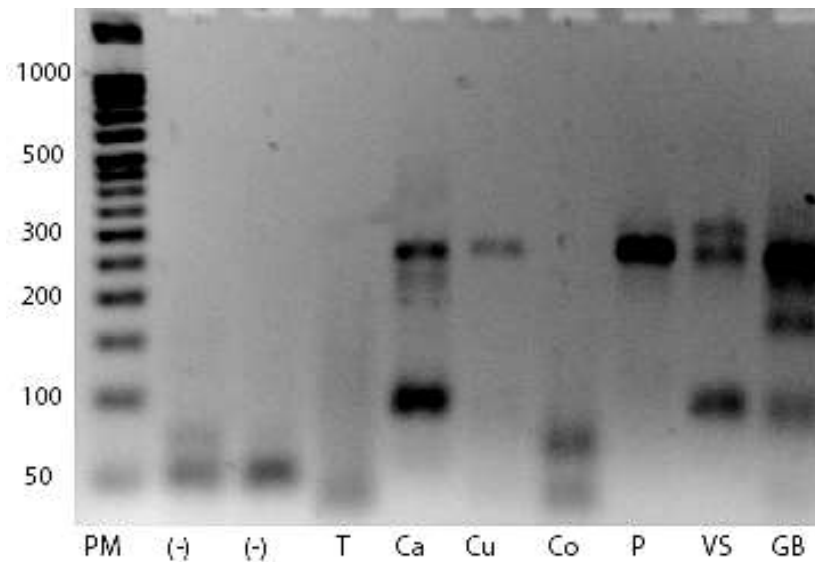


Figura 5.12. Expresión génica de ASMT por PCR de punto final utilizando cebadores diseñados sobre la secuencia de ovino, en los diferentes órganos del tracto reproductor de cerdo: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB) y control negativo (-).

En los análisis de Western-Blot se detectó una banda a 23 kDa, compatible con el peso molecular de AANAT (Voisin *et al.*, 1984), en el testículo, las diferentes regiones del epidídimo, la próstata, las vesículas seminales y el control positivo (proteínas de testículo ovino) (Figura 5.13) (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016a). En las glándulas bulbouretrales, al igual que ocurrió con los receptores de melatonina no se detectó la presencia de AANAT, al quedar enmascarada posiblemente por el resto de proteínas secretadas en este órgano.

La intensidad de la banda a 23 kDa fue superior en la cabeza del epidídimo, el testículo y la próstata lo que sugiere una mayor presencia en estos tejidos. Mientras que en la próstata tanto la expresión génica como la proteica fueron elevadas, no ocurrió así con el testículo y la cabeza del epidídimo que presentaron menor expresión génica. Estas discordancias entre la expresión génica y proteica pueden deberse a la gran variación entre individuos, como se observó en el análisis de la expresión génica de los receptores de melatonina, o bien a una mayor eficiencia traduccional en estos órganos debido a la posible existencia de mecanismos de regulación de la síntesis de esta enzima en función de los requerimientos puntuales de melatonina.

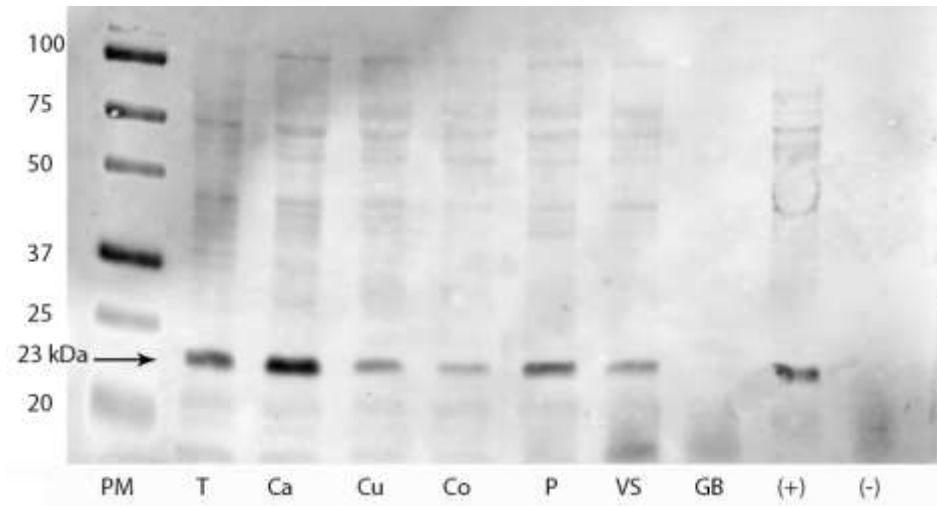


Figura 5.13. Presencia de AANAT, identificado mediante Western-Blot con anticuerpos específicos en proteínas de los diferentes órganos tracto reproductor de cerdo: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB) y testículo ovino (+) y espermatozoide ovino (-).

El estudio de la presencia de la proteína ASMT en el tracto reproductor masculino de cerdo se realizó con anticuerpos anti-ASMT. En el control positivo (proteínas de testículo ovino), se detectó una doble banda con un peso molecular algo inferior a 37 kDa que correspondería a la enzima ASMT (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016a), junto con una banda de menor intensidad a 50 kDa (Figura 5.14). En todos los tejidos del tracto reproductor porcino, a excepción de las glándulas bulbouretrales, se observó la presencia de estas bandas a un peso similar al control positivo. Estos resultados nos permitirían confirmar la existencia a nivel proteico de la enzima ASMT en el tracto reproductor porcino.

Si bien no se pudo confirmar completamente la existencia de la ruta de síntesis de melatonina, estos resultados sugieren que la próstata sería el órgano principal en la síntesis de melatonina en el tracto reproductor masculino de cerdo, al detectarse una elevada expresión génica y proteica de la enzima AANAT y estar presente la proteína ASMT, aunque la contribución de las vesículas seminales a la melatonina presente en el plasma seminal porcino tampoco puede descartarse. Esto contrasta con lo observado previamente en la especie ovina, donde se demostró que el testículo es el órgano principal de la síntesis de melatonina en el tracto reproductor del morueco (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016a). Esta diferencia podría deberse a las diferencias anatómicas del aparato reproductor entre ambas especies, puesto que el morueco presenta una próstata más diseminada y con menor lobulación que el verraco (Senger, 2003)

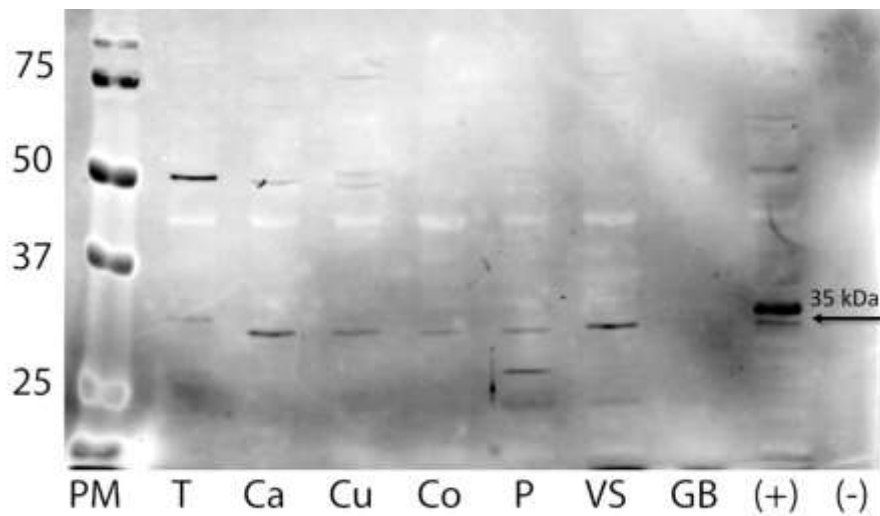


Figura 5.14. Presencia de ASMT, identificado mediante Western-Blot con anticuerpos específicos en proteínas de los diferentes órganos tracto reproductor de cerdo: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB), testículo ovino (+) y espermatozoide ovino (-).

La melatonina sintetizada en el tracto reproductor masculino de cerdo podría actuar de manera paracrina o autocrina (Tan *et al.*, 2003) sobre los diferentes órganos del aparato reproductor en los que también ha demostrado la existencia de ambos receptores de melatonina con este trabajo. Así, la melatonina producida en estos órganos podría ser secretada al plasma seminal, dónde actuaría como una molécula protectora del daño oxidativo de los espermatozoides debido a sus propiedades antioxidantes (Reiter *et al.*, 2013a) y además, podría actuar sobre los receptores de melatonina presentes en los órganos del aparato reproductor masculino del cerdo, ejerciendo acciones regulatorias sobre la propia producción de melatonina que también podría estar relacionado con las variaciones estacionales de la concentración de melatonina detectadas en el plasma seminal de esta especie (Barranco *et al.*, 2017).

5.3. Análisis de la expresión génica y proteica en el burro

5.3.1. Identificación de los receptores de melatonina

La amplificación mediante cebadores específicos a partir del ADNc del tracto reproductor masculino de burro detectó la presencia del ARN mensajero de ambos receptores de melatonina, MT₁ y MT₂, en todos los órganos estudiados. En el caso de MT₁, se obtuvo un producto único de qPCR de 83 pb (Figura 5.15) mientras que para el gen de MT₂ se originó un producto claro y definido de 101 pb (Figura 5.16).

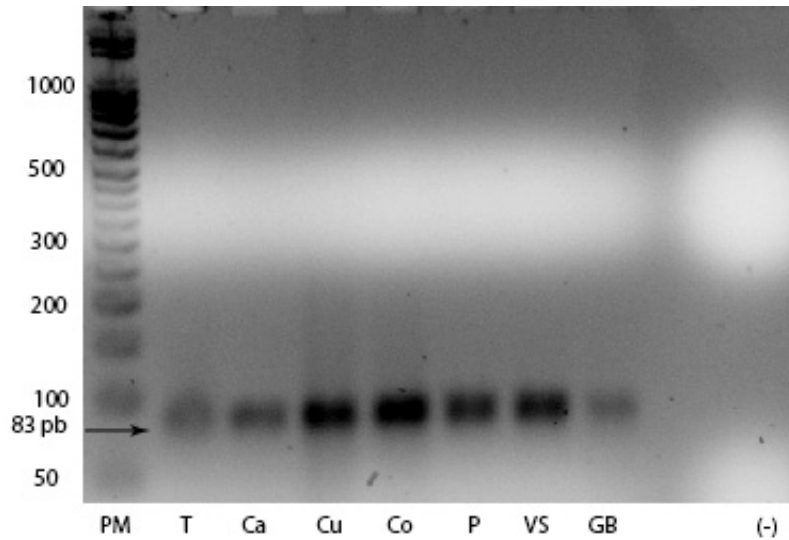


Figura 5.15. Expresión génica de MT_1 en los órganos del tracto reproductor de burro: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB) y control negativo (-).

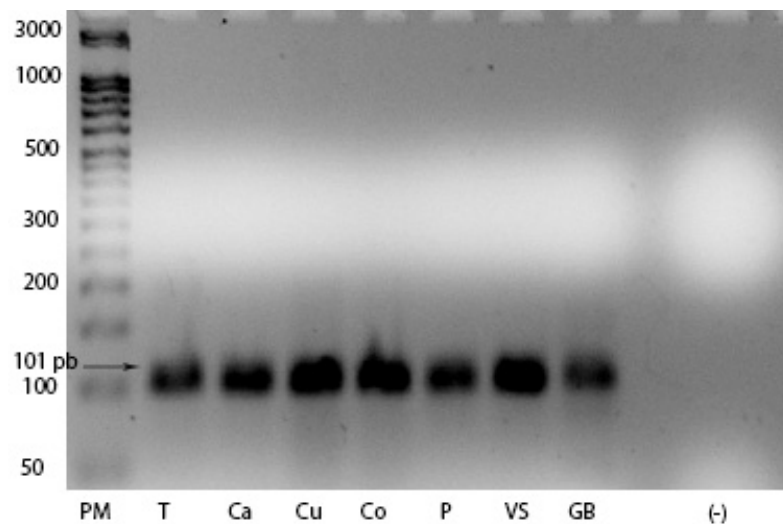


Figura 5.16. Expresión génica de MT_2 en los órganos del tracto reproductor de burro: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB) y control negativo (-).

Los estudios de cuantificación de la expresión génica no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes órganos del tracto reproductor. No obstante, se observó una mayor expresión de MT_1 en el testículo, la cola del epidídimo y la próstata (Figura 5.17) y de MT_2 en el testículo, la cabeza del epidídimo y la próstata (Figura 5.18).

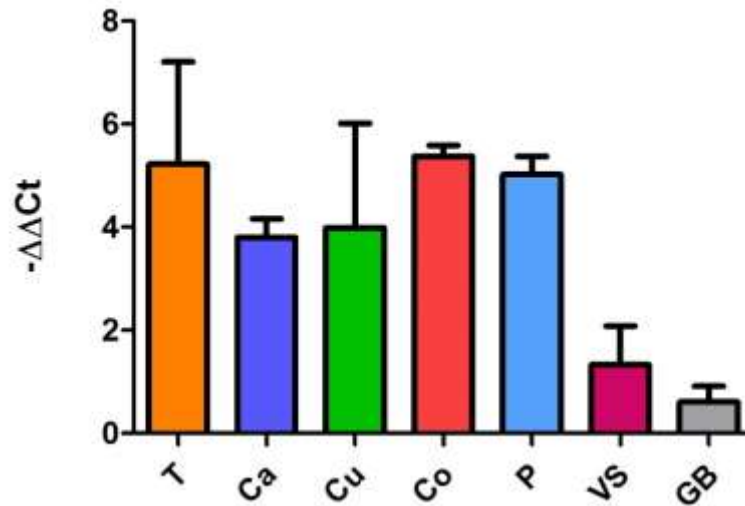


Figura 5.17. Cuantificación de la expresión génica de MT_1 , evaluada por qPCR en los diferentes órganos del tracto reproductor de burro: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB). Los resultados se muestran como media \pm S.E.M. (n=3).

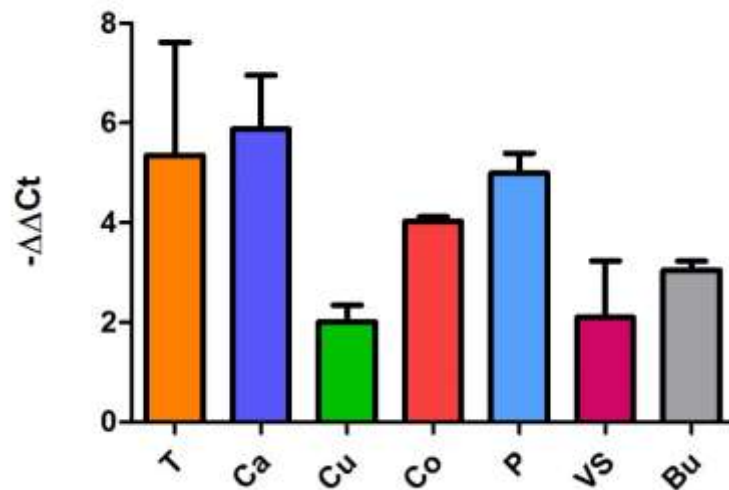


Figura 5.18. Cuantificación de la expresión génica de MT_2 , evaluada por q-PCR en los diferentes órganos del tracto reproductor de burro: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB). Los resultados se muestran como media \pm S.E.M. (n=3).

Asimismo, se observa una gran variabilidad en la expresión génica de ambos receptores en el testículo de los tres individuos estudiados pero no en el resto de órganos. Esto puede deberse a que el burro es una especie cuya estacionalidad reproductiva está regulada por la melatonina (Argo *et al.*, 1991) y esta regulación afecta principalmente a la fisiología del testículo (Senger, 2003). En consecuencia, pueden existir mecanismos de regulación de la transcripción relacionados con la edad, los procesos de

espermatogénesis, la fertilidad o el estado de salud general del individuo que justificarían esas diferencias individuales.

En cuanto a los análisis de Western-Blot con el anticuerpo anti-MT₁, se detectó la existencia de una banda a 39 kDa en el testículo, la cabeza del epidídimo, la próstata, las vesículas seminales, las glándulas bulbouretrales y en el control positivo (proteínas de espermatozoide ovino) compatible con el peso molecular descrito para MT₁ (Figura 5.19) (Reppert *et al.*, 1994). Igualmente, en estos mismos órganos se observó la presencia de una banda de menor intensidad a 50 kDa que se relacionó con la dimerización de MT₁ consigo mismo (Jockers *et al.*, 2008) o con MT₂ (Ayoub *et al.*, 2002). También se identificó una banda a 23 kDa en el testículo, la cabeza del epidídimo, la próstata y las vesículas seminales que se podría relacionar con la disociación del receptor en las subunidades α y $\beta\gamma$ tras su activación (Gilman, 1995). Asimismo, en las glándulas bulbouretrales y en el control positivo se detectaron bandas a 25 kDa y 32 kDa que también podrían estar relacionadas con la activación del receptor GPCR (Dubocovich *et al.*, 2005), lo que indicaría que estos órganos podrían presentar un nivel de activación diferente respecto a los otros órganos del tracto reproductor masculino.

A pesar de que los resultados de expresión génica no mostraron diferencias significativas, la expresión proteica de MT₁ en las glándulas bulbouretrales difiere de la del resto de tejidos, ya que la banda a 25 kDa presentó una gran intensidad pero no a de 39 kDa, correspondiente al peso molecular de MT₁. Esto podría deberse que el anticuerpo, diseñado para la especie humana, tenga afinidad por alguno de los productos de secreción de estas glándulas y/o a modificaciones post-traduccionales de MT₁ en este órgano.

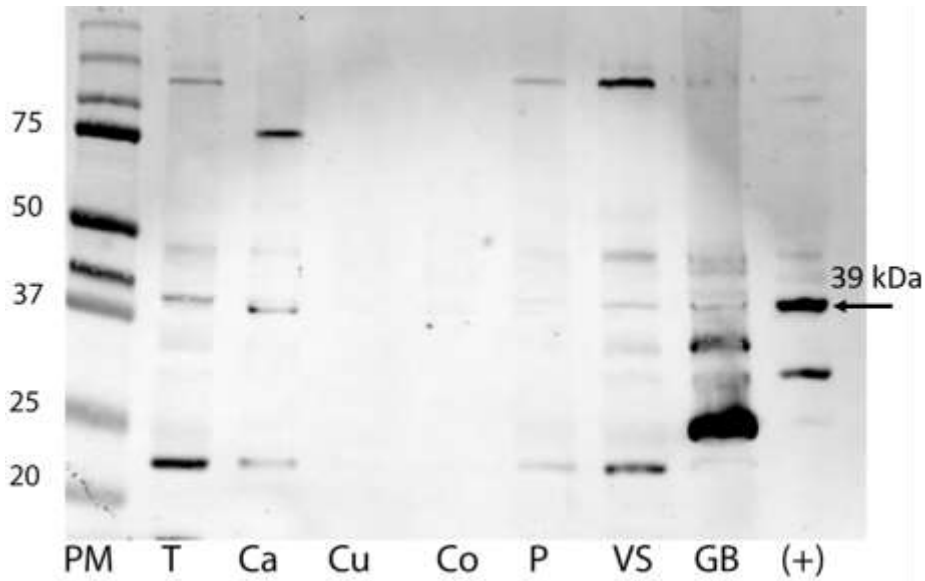


Figura 5.19. Presencia del receptor MT_1 , identificado mediante Western-Blot con anticuerpos específicos en proteínas de los diferentes órganos tracto reproductor de burro: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB) y control positivo, espermatozoide ovino (+).

La identificación MT_2 en las proteínas extraídas del tracto reproductor masculino de burro mostró la existencia de una banda de baja intensidad de 39 kDa en el testículo, la próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales (Figura 5.20). Dicha banda se detectó con igual intensidad en el control positivo (proteínas de espermatozoide) y corresponde al peso molecular descrito para MT_2 (Cogé *et al.*, 2009). Además, se observó la presencia de una doble banda entre 45-50 kDa en el testículo, el cuerpo y la cola del epidídimo, la próstata, las vesículas seminales y en el control positivo que podrían corresponder a la formación de dímeros de MT_2 con MT_1 (Ayoub *et al.*, 2002) o con otros receptores GPCR (Levoye *et al.*, 2006). También se observaron bandas de diferentes pesos moleculares de entre 23 kDa y 27 kDa en próstata, vesícula seminal y glándulas bulbouretrales, posiblemente resultado de la disociación del receptor de tipo GPCR (Dubocovich *et al.*, 2005), lo que sugiere un diferente estado de activación en las glándulas accesorias respecto al resto de órganos.

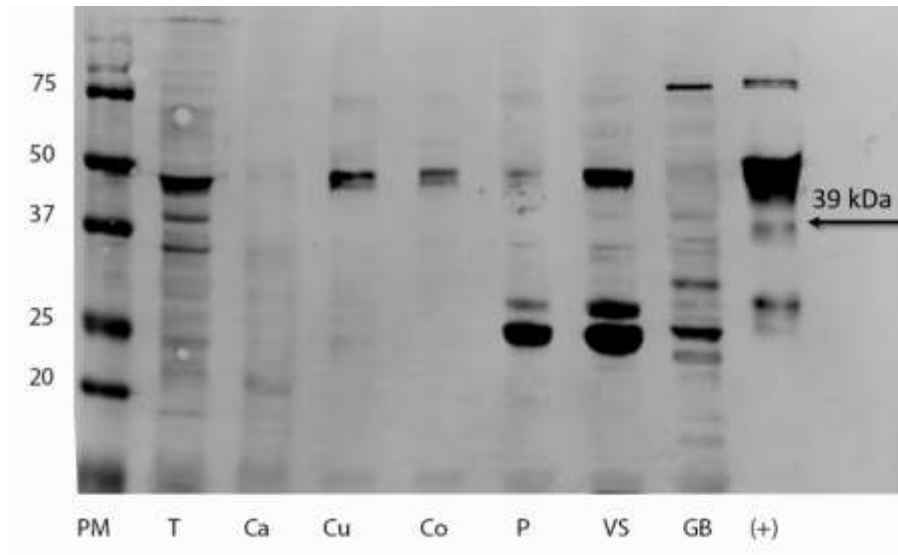


Figura 5.20. Presencia del receptor MT_2 , identificado mediante Western-Blot con anticuerpos específicos en proteínas de los diferentes órganos tracto reproductor de burro: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB) y control positivo, espermatozoide ovino (+).

En resumen, se ha demostrado la presencia de los receptores de melatonina en todos los órganos estudiados del tracto reproductor masculino de burro y que junto con estudios previos que han detectado su presencia en el espermatozoide de esta especie (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016b) sugieren que la melatonina jugaría un papel fundamental en la regulación de la reproducción en estos animales.

5.3.2. Identificación de las enzimas de síntesis de la melatonina

La amplificación de las enzimas de síntesis AANAT (Figura 5.21) y ASMT (Figura 5.22) por qPCR dio lugar a la obtención de productos únicos y definidos, de 119 pb y 91 pb respectivamente, a partir del ADNc procedente del tracto reproductor masculino de burro. De esta forma, se demostró la existencia del ARN mensajero codificante para la enzima AANAT en todos los órganos analizados mientras que para la enzima ASMT se mostró su existencia en todos los órganos a excepción de las glándulas bulbouretrales.

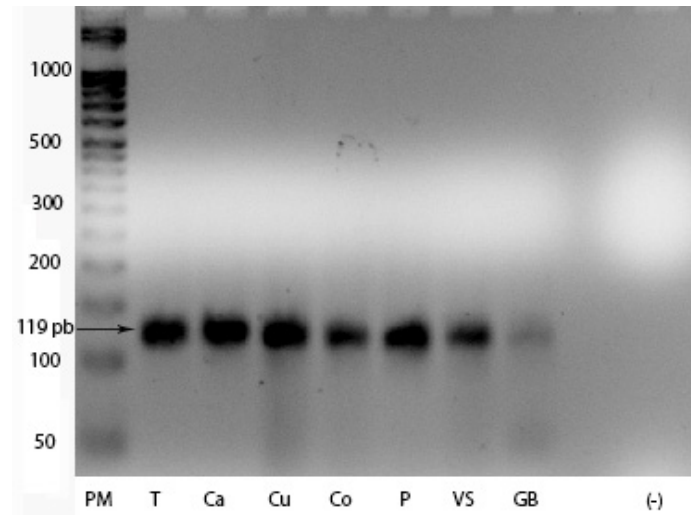


Figura 5.21. Expresión génica de AANAT en los órganos del tracto reproductor de burro: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB) y control negativo (-).

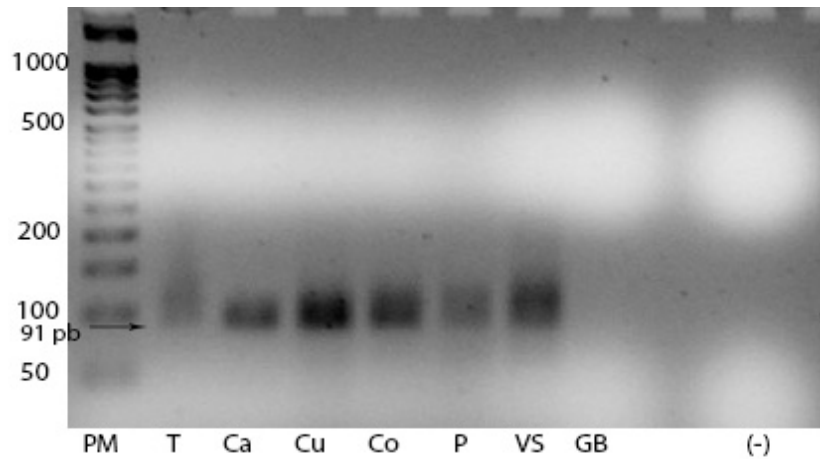


Figura 5.22. Expresión génica de ASMT en los órganos del tracto reproductor de burro: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB) y control negativo (-).

Respecto al gen de AANAT, se observó una expresión significativamente superior en el testículo y la cabeza del epidídimo respecto a la detectada en las vesículas seminales ($p < 0,05$) (Figura 5.23). La expresión en el cuerpo y cola del epidídimo, la próstata y las glándulas bulbouretrales fue superior a la de las vesículas seminales, e inferior a la del testículo y la cabeza del epidídimo; no obstante estas diferencias no fueron significativas

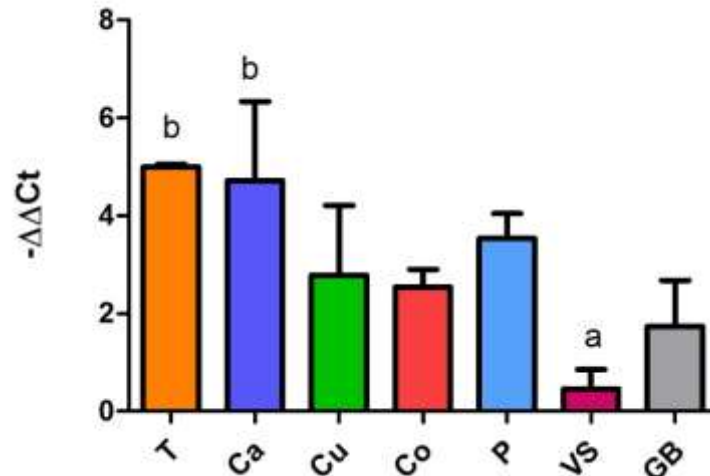


Figura 5.23. Cuantificación de la expresión génica de AANAT, evaluada por qPCR en los diferentes órganos del tracto reproductor de burro: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB). Los resultados se muestran como media \pm S.E.M. (n=3). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

En cuanto a la cuantificación de la expresión génica de ASMT (Figura 5.24), el testículo y el cuerpo del epidídimo presentan una expresión significativamente superior ($p < 0,05$) respecto al resto de tejidos. Igualmente, la expresión en la cabeza y cola del epidídimo, la próstata y las vesículas seminales fue estadísticamente mayor a la de las glándulas bulbouretrales ($p < 0,05$), órgano en el cual no se detectó la expresión de ASMT.

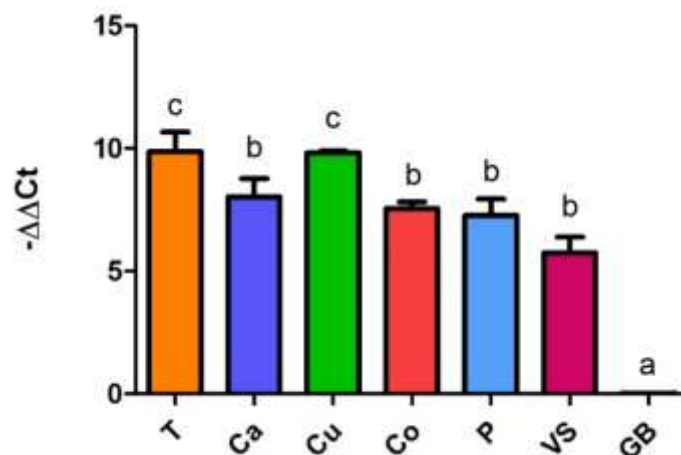


Figura 5.24. Cuantificación de la expresión génica de ASMT, evaluada por q-PCR en los diferentes órganos del tracto reproductor de burro: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB). Los resultados se muestran como media \pm S.E.M. (n=3). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

El estudio de la expresión proteína por Western-Blot a partir de las proteínas obtenidas del tracto reproductor de burro indicó la existencia de una banda a 23 kDa compatible con el peso molecular de AANAT (Voisin *et al.*, 1984) en todos los órganos del tracto reproductor (Figura 5.25) así como en el control positivo (proteínas de testículo ovino).

La banda a 23 kDa, correspondiente a la proteína AANAT, presentó mayor intensidad en el testículo que en el resto de órganos, lo que coincide con los resultados de expresión génica. Asimismo, la expresión proteica también es elevada en la próstata, las vesículas seminales y glándulas bulbouretrales, lo que sugiere que estos órganos podrían estar sintetizando melatonina.

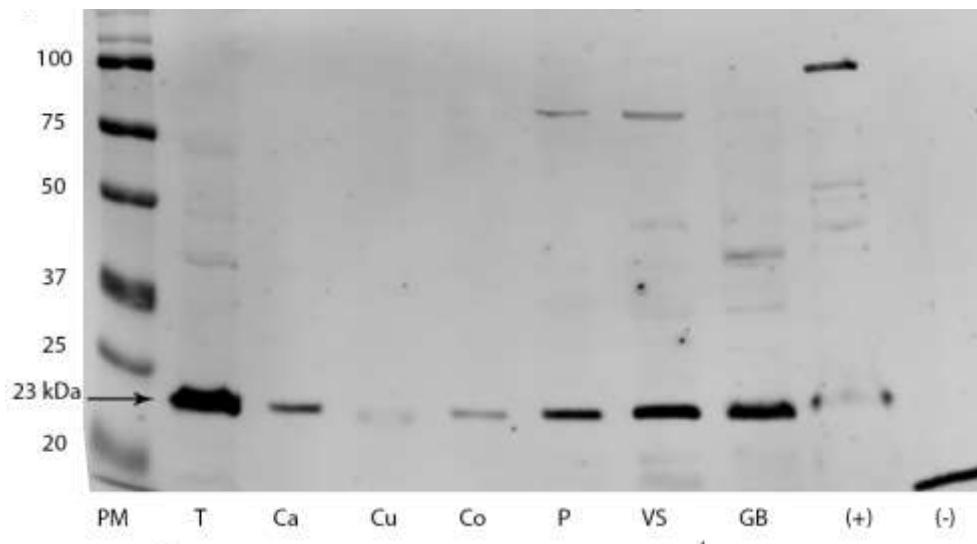


Figura 5.25. Presencia de AANAT, identificado mediante Western-Blot con anticuerpos específicos en proteínas de los diferentes órganos tracto reproductor de burro: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB), testículo ovino (+) y espermatozoide ovino (-).

La identificación de ASMT por Western-Blot reveló la existencia de unas bandas de unos 35 kDa y 50 kDa y de intensidad variable en el testículo, el cuerpo y la cola del epidídimo, la próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales compatibles con la enzima ASMT (Figura 5.26). La banda a 35 kDa obtenida presenta un peso molecular inferior al esperado, 37 kDa, si bien esto podría deberse a modificaciones post-traduccionales que tal vez ocurran en esta especie. No se detectó ninguna de estas bandas en el control positivo (proteínas de testículo ovino) lo que se atribuyó a un deterioro de la muestra. En el Western-Blot realizado sobre las muestras del tracto reproductor de cerdo (Figura 5.14), se empleó el mismo control positivo y el mismo

anticuerpo, y se observó la existencia de unas bandas 37 kDa y 50 kDa correspondientes a la enzima ASMT (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016a). Además, en las muestras de burro aparece una banda inespecífica en torno a 32 kDa en la próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales que tal vez se pueda atribuir a la inespecificidad del anticuerpo.

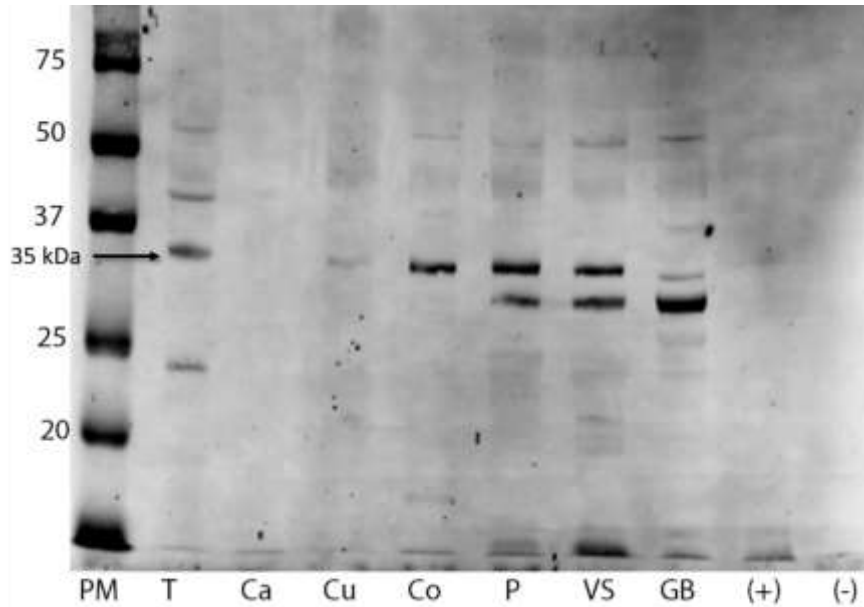


Figura 5.26. Presencia de ASMT, identificado mediante Western-Blot con anticuerpos específicos en proteínas de los diferentes órganos tracto reproductor de burro: testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) del epidídimo, próstata (P), vesículas seminales (VS) y glándulas bulbouretrales (GB), testículo ovino (+) y espermatozoide ovino (-).

El testículo, la próstata y las vesículas seminales mostraron tanto una elevada expresión génica como la presencia a nivel proteico de ASMT, lo que sugiere que en estos órganos podría tener lugar la última etapa de síntesis de la melatonina.

En definitiva, los resultados obtenidos indican la presencia de las dos últimas enzimas de la ruta de síntesis de la melatonina en el tracto reproductor masculino de burro y que el testículo, la próstata y las vesículas seminales podrían ser los órganos responsables de dicha síntesis de melatonina.

Al igual que podría ocurrir en el cerdo, la melatonina sintetizada en estos órganos podría actuar sobre los receptores de melatonina presentes en los mismos. Durante la espermatogénesis en el testículo, se generan especies reactivas que a un alto nivel podrían tener efectos negativos sobre la fertilidad (Reiter *et al.*, 2013a). Por ello, la

melatonina sintetizada en el testículo podría actuar a través de los receptores de melatonina presentes y proteger a los espermatozoides en desarrollo frente al estrés oxidativo. Asimismo, la melatonina producida en las diferentes glándulas accesorias podría regular su propia síntesis y secreción a través de los receptores de melatonina. Esta melatonina también pasaría al plasma seminal de burro, en el que podría ejercer funciones antioxidantes (Reiter *et al.*, 2013a), protegiendo a los espermatozoides ya eyaculados del daño oxidativo.

5.4. Discusión final

Los receptores de melatonina se encuentran distribuidos en un amplio número de células y tejidos, incluyendo diferentes órganos y células del tracto reproductor (Slominski *et al.*, 2012). En trabajos previos de nuestro grupo se demostró, por primera vez, la presencia de los receptores MT₁ y MT₂ en todos los órganos del tracto reproductor masculino de la especie ovina (Gonzalez-Arto *et al.*, 2017). En este trabajo, se ha demostrado la presencia de los receptores de melatonina en todos los órganos tracto reproductor masculino del cerdo y el burro, dos especies con diferente estacionalidad reproductiva, no estacional el cerdo (Claus *et al.*, 1985) y reproductor de días largos el burro (Argo *et al.*, 1991). Estos resultados, junto con los obtenidos anteriormente en la especie ovina, reproductora de días cortos (Malpoux *et al.*, 1997), sugieren que la acción de la melatonina mediada por receptores sobre el tracto reproductor masculino no estaría relacionada únicamente con el control de la estacionalidad.

Asimismo, se ha demostrado la existencia de las enzimas de la ruta de síntesis de la melatonina, AANAT y ASMT, en el tracto reproductor de ambas especies. En el burro, el testículo, las vesículas seminales y la próstata parecen ser los principales órganos de síntesis de melatonina exógena en el tracto reproductor masculino, mientras que en la especie porcina esta capacidad parece estar principalmente en la próstata. Estas diferencias pueden atribuirse a las diferencias anatómicas entre ambas especies, principalmente a nivel de las glándulas accesorias. En la especie porcina (Figura 2.1), gran parte de la próstata está diseminada a lo largo de las paredes laterales de la uretra pélvica mientras que en el burro (Figura 2.2) está formada únicamente por dos lóbulos

laterales. Respecto a las vesículas seminales, en el cerdo presentan mayor lobulación y tamaño que en cerdo y además, sus secreciones son más viscosas (Senger, 2003).

Por otro lado, la presencia de enzimas de la ruta de síntesis en todos los órganos del tracto reproductor masculino de cerdo y burro podría estar explicada por los resultados de recientes estudios que sugieren que la síntesis de melatonina tendría lugar en las mitocondrias (Tan *et al.*, 2013), al haberse conservado esta capacidad en las células eucariotas desde los primeros estadios de la evolución.

Como se ha comentado a lo largo del trabajo, la melatonina producida en el tracto reproductor masculino podría actuar de manera autocrina o paracrina (Tan *et al.*, 2003) sobre los diferentes órganos del tracto reproductor. Así, la melatonina sintetizada en el testículo podría ejercer una acción protectora sobre la espermatogénesis frente al estrés oxidativo (Rao *et al.*, 2008) producido durante este proceso (Reiter *et al.*, 2013a) mientras que la melatonina producida en las glándulas accesorias podría actuar sobre los receptores presentes en estos órganos y regular la capacidad secretora de las mismas.

Por otra parte, la melatonina nocturna producida en la glándula pineal y liberada al torrente circulatorio es rápidamente metabolizada por el citocromo P450 hepático (Tan *et al.*, 2007) y otras vías no enzimáticas (Hardeland, 2008), por lo que es poco probable que pueda estar presente en el plasma seminal obtenido en estas especies en horas diurnas (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016b). La existencia de enzimas de síntesis en las glándulas accesorias sugiere que parte de la melatonina sintetizada en el tracto reproductor podría ser secretada al plasma seminal de estas especies durante la eyaculación, dónde estaría presente a concentraciones similares a las de la circulación sanguínea (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2014; Gonzalez-Arto *et al.*, 2016b). Esta melatonina del plasma seminal podría actuar sobre los receptores para la misma detectados en los espermatozoides eyaculados de estas especies (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016b), protegiendo a las células espermáticas del daño oxidativo, probablemente a través del receptor MT₁ (Espino *et al.*, 2011), como se ha visto en el espermatozoide humano, o bien modulando su estado de capacitación a través del receptor MT₂, como ocurre en la especie ovina (Gonzalez-Arto *et al.*, 2014).

6. CONCLUSIONES

1. Los **receptores de melatonina**, MT₁ y MT₂, se encuentran presentes en todos los órganos del tracto reproductor masculino del cerdo y del burro.
2. Ambos receptores se expresan **a nivel transcripcional** en todos los órganos del tracto reproductor de estas especies, pero no se han detectado diferencias significativas en el nivel de expresión génica entre los diferentes órganos.
3. MT₁ y MT₂ se expresan a nivel proteico en los diferentes órganos del tracto reproductor masculino del cerdo y del burro.
4. Los resultados obtenidos han permitido demostrar la existencia de las dos últimas etapas de la ruta de **síntesis de melatonina** en el tracto reproductor masculino de burro pero no en el cerdo.
5. En la **especie porcina**, AANAT se expresa a nivel génico en todos los órganos del tracto reproductor masculino, siendo la próstata, el órgano donde presenta mayor expresión; aunque no se ha podido demostrar la expresión génica de ASMT. Ambas enzimas se expresan a nivel proteico en el tracto reproductor masculino del cerdo.
6. En **el burro**, existe expresión génica de AANAT y ASMT en el tracto reproductor masculino, siendo el testículo el órgano donde ambas presentan un mayor nivel de expresión. Además, las enzimas AANAT y ASMT se expresan a nivel proteico en todos los órganos del tracto reproductor masculino de la especie equina.

CONCLUSIONS

1. **Melatonin receptors**, MT₁ y MT₂, are present in all the organs of the boar and donkey male reproductive tract.
2. There are gene expression for both receptors in all organs of the masculine reproductive tract of these species, but no significant differences have been detected among them.
3. MT₁ and MT₂ are expressed at protein level in the male reproductive tract of the boar and donkey.
4. This results demonstrate the presence of the last two enzymes of the **melatonin synthesis pathway** in the male donkey, but no in the boar.
5. In the boar, there is gene expression of AANAT in all organs of male reproductive tract, being the prostate the organ with the highest expression levels. However, the gene expression of ASMT could not be demonstrated.
6. In the donkey, there is gene expression of AANAT and ASMT in the male reproductive tract, and the testicle is the organ with the highest gene expression of both enzymes. Moreover, AANAT and ASMT enzymes are present in all the organs of the male reproductive tract of the donkey.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acuna-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Diaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., Lopez, L. C., . . . Reiter, R. J. (2014). Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci*, *71*(16), 2997-3025.
- Andersson, H. (2001). Plasma melatonin levels in relation to the light-dark cycle and parental background in domestic pigs. *Acta Vet Scand*, *42*(2), 287-294.
- Argo, C. M., Cox, J. E., & Gray, J. L. (1991). Effect of oral melatonin treatment on the seasonal physiology of pony stallions. *J Reprod Fertil Suppl*, *44*, 115-125.
- Ashrafi, I., Kohram, H., & Ardabili, F. F. (2013). Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, *139*(1-4), 25-30. doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.03.016
- Axelrod, J., Wurtman, R. J., & Snyder, S. H. (1965). CONTROL OF HYDROXYINDOLE O-METHYLTRANSFERASE ACTIVITY IN THE RAT PINEAL GLAND BY ENVIRONMENTAL LIGHTING. *J Biol Chem*, *240*, 949-954.
- Ayoub, M. A., Couturier, C., Lucas-Meunier, E., Angers, S., Fossier, P., Bouvier, M., & Jockers, R. (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. doi: 10.1074/jbc.M200729200
- Barranco, I., Casao, A., Perez-Patino, C., Parrilla, I., Muino-Blanco, T., Martinez, E. A., . . . Roca, J. (2017). Profile and reproductive roles of seminal plasma melatonin of boar ejaculates used in artificial insemination programs. *J Anim Sci*, *95*(4), 1660-1668. doi: 10.2527/jas.2016.1286
- Boutin, J. A., Audinot, V., Ferry, G., & Delagrangue, P. (2005). Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci*, *26*(8), 412-419.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, *72*, 248-254.
- Browning, C., Beresford, I., Fraser, N., & Giles, H. (2000). Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt(1) and MT(2) receptors. *Br J Pharmacol*, *129*(5), 877-886. doi: 10.1038/sj.bjp.0703130
- Bruce, Alberts. (2015). Chapter 15: Cell Signalling. In Garland Science (Ed.), *Molecular biology of the Cell* (pp. 813-962).
- Brzezinski, A., Seibel, M. M., Lynch, H. J., Deng, M. H., & Wurtman, R. J. (1987). Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab*, *64*(4), 865-867. doi: 10.1210/jcem-64-4-865
- Carpentieri, A., Diaz de Barboza, G., Areco, V., Peralta Lopez, M., & Tolosa de Talamoni, N. (2012). New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol Res*, *65*(4), 437-444. doi: 10.1016/j.phrs.2012.01.003
- Casao, A., Cebrian, I., Asumpcao, M. E., Perez-Pe, R., Abecia, J. A., Forcada, F., . . . Muino-Blanco, T. (2010a). Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reprod Biol Endocrinol*, *8*, 59. doi: 10.1186/1477-7827-8-59
- Casao, A., Gallego, M., Abecia, J. A., Forcada, F., Perez-Pe, R., Muino-Blanco, T., & Cebrian-Perez, J. A. (2012). Identification and immunolocalisation of melatonin MT(1) and MT(2) receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, *24*(7), 953-961. doi: 10.1071/rd11242
- Casao, A., Mendoza, N., Perez-Pe, R., Grasa, P., Abecia, J. A., Forcada, F., . . . Muino-Blanco, T. (2010b). Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram

- spermatozoa and increases fertility rate. *J Pineal Res*, 48(1), 39-46. doi: 10.1111/j.1600-079X.2009.00722.x
- Castanho, A., Bothorel, B., Seguin, L., Mocaer, E., & Pevet, P. (2014). Like melatonin, agomelatine (S20098) increases the amplitude of oscillations of two clock outputs: melatonin and temperature rhythms. *Chronobiol Int*, 31(3), 371-381. doi: 10.3109/07420528.2013.860457
- Cebrian-Perez, J. A., Casao, A., Gonzalez-Arto, M., dos Santos Hamilton, T. R., Perez-Pe, R., & Muino-Blanco, T. (2014). Melatonin in sperm biology: breaking paradigms. *Reprod Domest Anim*, 49 Suppl 4, 11-21. doi: 10.1111/rda.12378
- Claus, R., & Weiler, U. (1985). Influence of light and photoperiodicity on pig prolificacy. *J Reprod Fertil Suppl*, 33, 185-197.
- Claustrat, B., Brun, J., & Chazot, G. (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*, 9(1), 11-24. doi: 10.1016/j.smrv.2004.08.001
- Cogé, F., Guenin, S., Fery, I., Migaud, M., Devavry, S., Slugocki, C., . . . Boutin, J. (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., Lai, F. P., Lo, R. K., Voyno-Yasenetskaya, T. A., Stanbridge, E. J., & Wong, Y. H. (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.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1), 156-159. doi: 10.1006/abio.1987.9999
- D'Alessandro, A. G., & Martemucci, G. (2003). Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Lecce ram. *Anim Reprod Sci*, 79(1-2), 93-102.
- Delgadillo, J. A., & Chemineau, P. (1992). Abolition of the seasonal release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. *J Reprod Fertil*, 94(1), 45-55.
- Diaz, B., Diaz, E., Colmenero Mf, M. F. D., Arce, A., Esquifino, A., & Marin, B. (1999). Maternal melatonin influences rates of somatic and reproductive organs postnatal development of male rat offspring. *Neuro Endocrinol Lett*, 20(1-2), 69-76.
- Dimitriadis, F., Tsiampali, C., Chaliasos, N., Tsounapi, P., Takenaka, A., & Sofikitis, N. (2015). The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *Hormones (Athens)*, 14(4), 479-503. doi: 10.14310/horm.2002.1633
- Dubocovich, M. L., & Markowska, M. (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 27(2), 101-110. doi: 10.1385/endo:27:2:101
- Espino, J., Ortiz, A., Bejarano, I., Lozano, G. M., Monllor, F., Garcia, J. F., . . . Pariente, J. A. (2011). Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor- and extracellular signal-regulated kinase-mediated pathways. *Fertil Steril*, 95(7), 2290-2296. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.03.063
- Ferry, G., Ubeaud, C., Lambert, P. H., Bertin, S., Coge, F., Chomar, P., . . . Boutin, J. A. (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.
- Frungieri, M. B., Mayerhofer, A., Zitta, K., Pignataro, O. P., Calandra, R. S., & Gonzalez-Calvar, S. I. (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. doi: 10.1210/en.2004-0990

- Gadella, B. M., Tsai, P. S., Boerke, A., & Brewis, I. A. (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol*, 52(5-6), 473-480. doi: 10.1387/ijdb.082583bg
- Geary, G. G., Duckles, S. P., & Krause, D. N. (1998). Effect of melatonin in the rat tail artery: role of K⁺ channels and endothelial factors. *Br J Pharmacol*, 123(8), 1533-1540. doi: 10.1038/sj.bjp.0701761
- Gilman, A. G. (1995). Nobel Lecture. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Biosci Rep*, 15(2), 65-97.
- Gonzalez-Arto, M., Aguilar, D., Gaspar-Torrubia, E., Gallego, M., Carvajal-Serna, M., Herrera-Marcos, L. V., . . . Casao, A. (2017). Melatonin MT(1) and MT(2) Receptors in the Ram Reproductive Tract. *Int J Mol Sci*, 18(3). doi: 10.3390/ijms18030662
- Gonzalez-Arto, M., Hamilton, T. R., Gallego, M., Gaspar-Torrubia, E., Aguilar, D., Serrano-Blesa, E., . . . Casao, A. (2016a). Evidence of melatonin synthesis in the ram reproductive tract. *Andrology*, 4(1), 163-171.
- Gonzalez-Arto, M., Luna, C., Perez-Pe, R., Muino-Blanco, T., Cebrian-Perez, J. A., & Casao, A. (2014). New evidence of melatonin receptor contribution to ram sperm functionality. *Reprod Fertil Dev*. doi: 10.1071/rd14302
- Gonzalez-Arto, M., Vicente-Carrillo, A., Martinez-Pastor, F., Fernandez-Alegre, E., Roca, J., Miro, J., . . . Casao, A. (2016b). Melatonin receptors MT1 and MT2 are expressed in spermatozoa from several seasonal and nonseasonal breeder species. *Theriogenology*, 86(8), 1958-1968. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.06.016
- Guillaume, D., Zarazaga, L. A., Malpoux, B., & Chemineau, P. (2006). Variability of plasma melatonin level in pony mares (*Equus caballus*), comparison with the hybrid: mules and with jennies (*Equus asinus*). *Reprod Nutr Dev*, 46(6), 633-639. doi: 10.1051/rnd:2006043
- Hardeland, R. (2008). Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci*, 65(13), 2001-2018. doi: 10.1007/s00018-008-8001-x
- Hoffmann, B., & Landeck, A. (1999). Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. *Anim Reprod Sci*, 57(1-2), 89-98.
- Hunt, A. E., Al-Ghoul, W. M., Gillette, M. U., & Dubocovich, M. L. (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.
- Izzo, G., Francesco, A., Ferrara, D., Campitiello, M. R., Serino, I., Minucci, S., & d'Istria, M. (2010). Expression of melatonin (MT1, MT2) and melatonin-related receptors in the adult rat testes and during development. *Zygote*, 18(3), 257-264. doi: 10.1017/s0967199409990293
- Jang, H. Y., Kim, Y. H., Kim, B. W., Park, I. C., Cheong, H. T., Kim, J. T., . . . Yang, B. K. (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. doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01466.x
- Jockers, R., Maurice, P., Boutin, J. A., & Delagrangé, P. (2008). Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol*, 154(6), 1182-1195. doi: 10.1038/bjp.2008.184
- Kang, J. T., Koo, O. J., Kwon, D. K., Park, H. J., Jang, G., Kang, S. K., & Lee, B. C. (2009). Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. *J Pineal Res*, 46(1), 22-28. doi: 10.1111/j.1600-079X.2008.00602.x
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Levoye, A., Jockers, R., Ayoub, M. A., Delagrangé, P., Savaskan, E., & Guillaume, J. L. (2006). Are G protein-coupled receptor heterodimers of physiological relevance?--Focus on

- melatonin receptors. *Chronobiol Int*, 23(1-2), 419-426. doi: 10.1080/07420520500521863
- Liu, T., & Borjigin, J. (2005). N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J Pineal Res*, 39(1), 91-96. doi: 10.1111/j.1600-079X.2005.00223.x
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Luboshitzky, R., Shen-Orr, Z., & Herer, P. (2002). Seminal plasma melatonin and gonadal steroids concentrations in normal men. *Arch Androl*, 48(3), 225-232. doi: 10.1080/01485010252869324
- Malpoux, B., Viguie, C., Skinner, D. C., Thiery, J. C., & Chemineau, P. (1997). Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res Bull*, 44(4), 431-438.
- Martin-Hidalgo, D., Baron, F. J., Bragado, M. J., Carmona, P., Robina, A., Garcia-Marin, L. J., & Gil, M. C. (2011). The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 degrees C. *Theriogenology*, 75(8), 1550-1560. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.12.021
- Martinat-Botte, F., Dagorn, J., Terqui, M., & Dando, P. (1984). Effect of confinement, climatic conditions and litter parity on the seasonal variations of the fertility rate and prolificacy. *Ann Rech Vet*, 15(2), 165-172.
- Masana, M. I., & Dubocovich, M. L. (2001). Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci STKE*, 2001(107), pe39. doi: 10.1126/stke.2001.107.pe39
- McIntyre, I. M., Norman, T. R., Burrows, G. D., & Armstrong, S. M. (1987). Melatonin rhythm in human plasma and saliva. *J Pineal Res*, 4(2), 177-183.
- Messner, M., Huether, G., Lorf, T., Ramadori, G., & Schworer, H. (2001). Presence of melatonin in the human hepatobiliary-gastrointestinal tract. *Life Sci*, 69(5), 543-551.
- Morgan, P. J., & Williams, L. M. (1989). Central melatonin receptors: implications for a mode of action. *Experientia*, 45(10), 955-965.
- Niu, B., Li, B., Wu, C., Wu, J., Yan, Y., Shang, R., . . . Hua, J. (2016). Melatonin promotes goat spermatogonia stem cells (SSCs) proliferation by stimulating glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) production in Sertoli cells. *Oncotarget*, 7(47), 77532-77542. doi: 10.18632/oncotarget.12720
- Odo, M., Koh, K., Takada, T., Yamashita, A., Narita, M., Kuzumaki, N., . . . Inada, E. (2014). Changes in circadian rhythm for mRNA expression of melatonin 1A and 1B receptors in the hypothalamus under a neuropathic pain-like state. *Synapse*, 68(4), 153-158. doi: 10.1002/syn.21728
- Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D. W., Maestroni, G. J., Zisapel, N., & Cardinali, D. P. (2008). Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol*, 85(3), 335-353. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.04.001
- Pena, C., Rincon, J., Pedreanez, A., Viera, N., & Mosquera, J. (2007). Chemotactic effect of melatonin on leukocytes. *J Pineal Res*, 43(3), 263-269. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00471.x
- Ramirez, O., Tomas, A., Barragan, C., Noguera, J. L., Amills, M., & Varona, L. (2009). Pig melatonin receptor 1a (MTNR1A) genotype is associated with seasonal variation of sow litter size. *Anim Reprod Sci*, 115(1-4), 317-322. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.12.013
- Rao, M. V., & Gangadharan, B. (2008). Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. *Toxicol In Vitro*, 22(4), 935-942. doi: 10.1016/j.tiv.2008.01.014

- Reiter, R. J., Rosales-Corral, S. A., Manchester, L. C., & Tan, D. X. (2013a). Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. *Int J Mol Sci*, *14*(4), 7231-7272. doi: 10.3390/ijms14047231
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C., & Gitto, E. (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci*, *7*(6), 444-458. doi: 25480
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Rosales-Corral, S., & Manchester, L. C. (2013b). The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini Rev Med Chem*, *13*(3), 373-384.
- Reppert, S. M. (1997). Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J Biol Rhythms*, *12*(6), 528-531. doi: 10.1177/074873049701200606
- Reppert, S. M., Godson, C., Mahle, C. D., Weaver, D. R., Slangenaupt, S. A., & Gusella, J. F. (1995). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(19), 8734-8738.
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., & Ebisawa, T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, *13*(5), 1177-1185.
- Romerowicz-Misielak, M., Oren, D. A., Sowa-Kucma, M., Tabecka-Lonczynska, A., Gilun, P., Stefanczyk-Krzyszowska, S., & Kozirowski, M. (2015). Changes in melatonin synthesis parameters after carbon monoxide concentration increase in the cavernous sinus. *J Physiol Pharmacol*, *66*(4), 505-514.
- Sarabia, L., Maurer, I., & Bustos-Obregon, E. (2009). Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. *Ecotoxicol Environ Saf*, *72*(2), 663-668. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.04.023
- Schlabritz-Loutsevitch, N., Hellner, N., Middendorf, R., Muller, D., & Olcese, J. (2003). The human myometrium as a target for melatonin. *J Clin Endocrinol Metab*, *88*(2), 908-913. doi: 10.1210/jc.2002-020449
- Senger, P.L. (2003). Chapter 3: The Organization and Function of the Male Reproductive System. In Inc. Current Conceptions (Ed.), *Pathways to pregnancy and Parturition* (pp. 44-79).
- Shiu, S. Y., Li, L., Siu, S. W., Xi, S. C., Fong, S. W., & Pang, S. F. (2000). Biological basis and possible physiological implications of melatonin receptor-mediated signaling in the rat epididymis. *Biol Signals Recept*, *9*(3-4), 172-187. doi: 14637
- Slominski, R. M., Reiter, R. J., Schlabritz-Loutsevitch, N., Ostrom, R. S., & Slominski, A. T. (2012). Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol*, *351*(2), 152-166. doi: 10.1016/j.mce.2012.01.004
- Soares, J. M., Jr., Masana, M. I., Ersahin, C., & Dubocovich, M. L. (2003). Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *J Pharmacol Exp Ther*, *306*(2), 694-702. doi: 10.1124/jpet.103.049916
- Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., . . . Sugino, N. (2008). Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res*, *44*(3), 280-287. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00524.x
- Tan, D. X., Hardeland, R., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Korkmaz, A., Sainz, R. M., . . . Reiter, R. J. (2010). The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev Camb Philos Soc*, *85*(3), 607-623. doi: 10.1111/j.1469-185X.2009.00118.x
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Hardeland, R., Lopez-Burillo, S., Mayo, J. C., Sainz, R. M., & Reiter, R. J. (2003). Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res*, *34*(1), 75-78.
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Liu, X., Rosales-Corral, S. A., Acuna-Castroviejo, D., & Reiter, R. J. (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., Manchester, L. C., Terron, M. P., Flores, L. J., & Reiter, R. J. (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., Zheng, X., Kong, J., Manchester, L. C., Hardeland, R., Kim, S. J., . . . Reiter, R. J. (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. doi: 10.3390/ijms150915858
- Turek, F. W. (2007). From circadian rhythms to clock genes in depression. *Int Clin Psychopharmacol*, 22(2), S1-8.
- Turek, F. W., Desjardins, C., & Menaker, M. (1976). Melatonin-induced inhibition of testicular function in adult golden hamsters. *Proc Soc Exp Biol Med*, 151(3), 502-506.
- Vernet, P., Aitken, R. J., & Drevet, J. R. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol*, 216(1-2), 31-39. doi: 10.1016/j.mce.2003.10.069
- Voisin, P., Namboodiri, M. A., & Klein, D. C. (1984). Arylamine N-acetyltransferase and arylalkylamine N-acetyltransferase in the mammalian pineal gland. *J Biol Chem*, 259(17), 10913-10918.
- Witt-Enderby, P. A., MacKenzie, R. S., McKeon, R. M., Carroll, E. A., Bordt, S. L., & Melan, M. A. (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. doi: 10.1002/(sici)1097-0169(200005)46:1<28::aid-cm4>3.0.co;2-5
- Witt-Enderby, P. A., Masana, M. I., & Dubocovich, M. L. (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. doi: 10.1210/endo.139.7.6102
- Yang, W. C., Tang, K. Q., Fu, C. Z., Riaz, H., Zhang, Q., & Zan, L. S. (2014). Melatonin regulates the development and function of bovine Sertoli cells via its receptors MT1 and MT2. *Anim Reprod Sci*, 147(1-2), 10-16. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.03.017
- Zervos, I. A., Lavrentiadou, S. N., Tsantarliotou, M. P., Georgiadis, M. P., Kokolis, N. A., & Taitzoglou, I. A. (2010). Seasonal variation of plasminogen activator activity in spermatozoa and seminal plasma of boar, buck, bull and stallion. *Reprod Domest Anim*, 45(6), e440-446. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01597.x
- Zhang, H. M., & Zhang, Y. (2014). Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res*, 57(2), 131-146.
- Zhernakova, N. I., & Rybnikova, S. N. (2008). [The role of melatonin in pathogenesis of diseases of digestive system]. *Klin Med*, 86(4), 14-18.