IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES DE MELATONIA MT_1 Y MT_2 EN EL TRACTO REPRODUCTOR DEL MORUECO

González-Arto, M.[1], Aguilar, D., Gaspar, E., Hamilton, RST.,Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T.,Cebrián-Pérez, J.A y Casao.A.
[1]Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Facultad de Veterinaria, Zaragoza. España.
martagonzalezarto@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La hormona melatonina es una de las sustancias biológicamente activas más antiguas de los organismos vivos y desempeña una gran variedad de funciones (Reiter et al. 2013). Una gran parte de estas funciones las ejerce principalmente interaccionando con los receptores transmembrana acoplados a proteína G, MT_1 y MT_2, los cuales intervienen en diferentes vías de transducción de señal (Dubocovich y Markowska, 2005). La melatonina se sintetiza principalmente en la glándula pineal durante la noche, y, como consecuencia de ello, sus niveles en plasma sanguíneo son prácticamente inexistentes durante el día (Reiter, 1991). Sin embargo, recientes estudios de nuestro grupo de investigación han demostrado la presencia de melatonina en plasma seminal ovino (Casao et al., 2010), y que en este fluido la melatonina mantiene niveles constantes a lo largo del día. Estudios posteriores de nuestro grupo también han verificado la existencia de las enzimas responsables de la síntesis de melatonina en el tracto reproductor de morueco (González-Arto et al., 2014), lo que indicaría una cierta capacidad de síntesis de esta hormona en estos órganos. La melatonina, tanto endógena como exógena, produce una mejora no solo de la calidad seminal, sino también del volumen y la concentración del eyaculado de morueco (Rosa et al., 2012), lo que sugiere una acción de la melatonina sobre la espermatogénesis. Además, debido a su acción antioxidante (Reiter et al., 2000) y antiapoptótica (Casao et al., 2010), la melatonina presente en el tracto genital podría ejercer un efecto protector sobre los espermatozoides no solo durante su formación, sino también en el momento de la eyaculación. Con el objetivo de empezar a comprender el mecanismo de acción de la melatonina en el macho, en este trabajo se analizó la posible existencia de los dos receptores principales de melatonina, MT_1 y MT_2, en los distintos tejidos del aparato reproductor del morueco (testículo, epidídimo y glándulas accesorias).

MATERIAL Y METODOS

Los tejidos analizados en este estudio (testículo, en el que debido a su gran volumen se obtuvieron muestras en zona anterior y posterior, cabeza, cuerpo y cola del epidídimo, conducto deferente, ampolla, próstata, vesícula seminal y glándulas bulbouretrales) se obtuvieron a partir de dos machos ovinos de la raza Rasa Aragonesa sacrificados en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza de acuerdo a la normativa vigente. Una vez obtenidos los tejidos, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para su conservación. El ARN total se extrajo mediante homogenización de 300 mg de cada tejido en Tri-reagent (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, Estados Unidos) según el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Para la retrotranscripciónse partió de 500 ng de ARN y se utilizó el kit SuperScript III (Invitrogen, CA, USA). Para amplificar las secuencias específicas de cada receptor se diseñaron cebadores específicos a través de la base de datos del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information, Tabla 1). A partir de 2 µL de ADNc de cada tejido se llevaron a cabo 35 ciclos de amplificación, cuyas condiciones fueron 95 ºC durante 1 min, 56 ºC durante 1 min y 72 ºC durante 30 s. Asimismo, se llevó a cabo un paso de desnaturalización inicial durante 3 min a 95 ºC, y al final, 15 min de extensión a 72 ºC. Los productos de la PCR se separaron en un gel de agarosa al 2% en un buffer Tris–borato–EDTA (TBE) con 0.5 µL/mL de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA), y se visualizaron posteriormente bajo luz ultravioleta. Como control positivo se utilizó retina de ovino (Coge et al., 2009). Para cuantificar los niveles de expresión génica de los receptores en cada uno de los tejidos, se llevó a cabo una PCR en tiempo real utilizando iTaq Universal

SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos). La cuantificación se realizó por medio del método comparativo 2−ΔΔCt y se determinó la expresión relativa de dichos genes en relación a dos genes endógenos (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y actina: por medio del método Pfaff (Pfaff et al. 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de la retrotranscripción del ARN obtenido en los distintos tejidos del tracto genital del morueco demostró la amplificación de fragmentos de un tamaño coincidente con el esperable para MT_1 (136 pares de bases (pb)) en todos los tejidos estudiados (Fig. 1A) y para MT_2(169 pb) en testículo anterior y posterior, así como en la retina (Fig.1B).La PCR a tiempo real para el receptor MT_1determinó que los niveles de expresión de este receptor eran más elevados en cola de epidídimo, ampolla y conducto deferente que en el resto de los tejidos. En el caso del receptor MT_2, los valores de expresión más elevados fueron los correspondientes al testículo, mientras que el resto de tejidos los niveles de expresión fueron menores, aunque detectables en todos ellos (Fig. 2).

Aunque los altos niveles de expresión génica de los receptores de melatonina en el testículo, sobre todo las observadas en el caso del MT_2, podrían deberse a la expresión génica de los receptores en la membrana de los espermatozoides en formación (Casao et al., 2012) durante la espermatogénesis o la maduración espermática en el epidídimo, la presencia de estos receptores en otros tipos celulares dentro del testículo o el epidídimo tampoco debe descartarse, como sugiere también su presencia en las glándulas accesorias. En resumen, los resultados obtenidos sugieren que la melatonina podría actuar a través de estos receptores y modular la calidad seminal, y consecuentemente, la capacidad fecundante de los eyaculados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Casao, A., Gallego, M., Abecia, J. A., Forcada, F., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T. and Cebrián-Pérez, J. Á. 2012. Reproduction, Fertility and Development 24 (7): 953-961.
- Casao, A., Cebrián, I., Asumpcao, M.E., Pérez-Pé, R., Abecia, J.A., Forcada, F., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. 2010. Reproductive Biology and Endocrinology 8 (1): 59.
- Casao, A., Mendoza, N., Pérez-Pé, R., Grasa, A., Abecia, J. A., Forcada, F., Cebrián-Pérez, J. A. and Muino-Blanco, T. 2010. Journal of Pineal Research 48 (1): 39-46.
- Coge, F., Guenin, S. P., Fery, I., Migaud, M., Devavry, S., Slugocki, C., Legros, C., Ouvry, C., Cohen, W., Renault, N., Nosjean, O., Malpaux, B., Delagrange, P. and Boutin, J. A. 2009. British Journal of Pharmacology 158 (5): 1248-1262.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Analytical biochemistry 162 (1): 156-159.
- Dubocovich, M. L. and Markowska, M. 2005. Endocrine 27 (2): 101-110.
- González-Arto, M., Hamilton, TSR., Serrano, E., Aguilar, D., Gaspar, E., Arruga, D., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., Casao, A., Cebrián-Pérez, J.A. Reproduction in DomesticAnimals49 (4), 97-125.
- Pfaff, M. 2001. Nucleic Acids Research 29 (9), 2002-2007.
- Reiter, R. J. 1991. Endocrine reviews 12 (2): 151-180.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C. and Gitto, E. 2000. Journal of Biomedical Science 7(6): 444-458.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Rosales-Corral, S. and Manchester, L. C. 2013. Mini reviews in medicinal chemistry 13 (3): 373-384.
- Rosa, H. J. D., Silva, C. C. and Bryant, M. J. 2012. Small Ruminant Research 102 (2–3): 197-201.

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

Tabla 1. *Secuencia de cebadores utilizada para la amplificación por RT-PCR y q-PCR de los receptores para melatonina MT_1 y MT_2, y de los genes endógenos gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y actina.*

Gen	Cebador directo	Cebador reverso
MT_1	5'-AGGAACGCAGGGAATGTGTTTG-3'	5'-CACTAAGTTGGCAATGCAGGG-3'
MT_2	5'-CTCTTCCAAGGGCAGCCAG-3'	5'-GGATCATCACCAAACCTCCCG-3'
GAPDH	5'-CAAGGTCATCCATGACAACTTTG-3'	5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'
Actina	5'-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3'	5'-GGGCAGTGATCTCTTTCTGC-3'

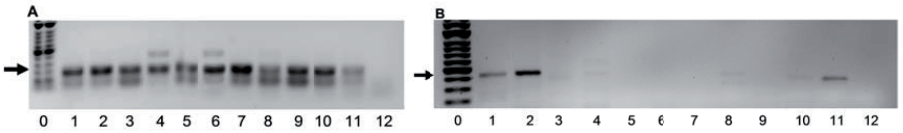


Figura 1. *Expresión génica de MT_1(A) y MT_2(B) en testículo anterior (1) y posterior (2), cabeza (3), cuerpo (4) y cola de epidídimo (5), ampolla (6), próstata (7), vesícula seminal (8), conducto deferente (9), glándulas bulbouretrales (10), retina (11) y control negativo (12). Marcador de peso molecular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

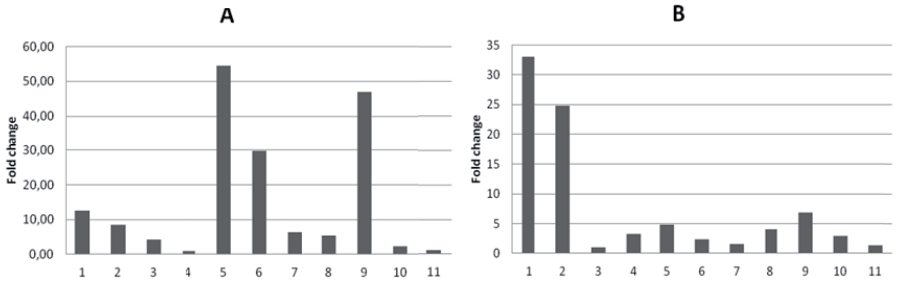


Figura 2. *Cuantificación de la expresión génica de MT_1 (A) y MT_2 (B) obtenida por PCR en tiempo real en testículo anterior (1) y posterior (2), cabeza (3), cuerpo (4) y cola de epidídimo (5), ampolla (6), próstata (7), vesícula seminal (8), conducto deferente (9), glándulas bulbouretrales (10) y retina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

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

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

Keywords: MT_1 receptor, MT_2 receptor, gene expression, reproductive tract