

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Máster Universitario en Biología y  
Tecnología de la Reproducción

# **Efecto de la luz nocturna sobre la gestación y el sistema reproductor de la descendencia.**



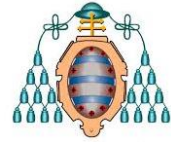
**Isabel M Sánchez Castelló**

**TUTORA:**

Dra. Elena Díaz Rodríguez

**Junio 2014**





UNIVERSIDAD DE OVIEDO

ELENA DÍAZ RODRÍGUEZ, Profesora Titular del Área de Fisiología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por Dña. ISABEL MARÍA SÁNCHEZ CASTELLÓ, titulado: "INFLUENCIA DE LA LUZ NOCTURNA SOBRE LA GESTACIÓN Y EL SISTEMA REPRODUCTOR DE LA DESCENDENCIA", realizado bajo su dirección, dentro del programa de Máster en "Biología y Tecnología de la Reproducción", reúne a su juicio las condiciones necesarias para ser admitido como Trabajo Fin de Máster, y por ello autoriza la presentación del mismo.

Para que así conste donde convenga, firma la presente certificación en Oviedo a 30 de mayo de 2014.

Fdo. Elena Díaz Rodríguez.

## **Agradecimientos**

Deseo expresar mi agradecimiento al Área de Fisiología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo por permitirme realizar este trabajo.

A mi familia, en especial a mis padres por darme la oportunidad de venir a Oviedo, por confiar en mí incluso cuando ni yo misma lo hago, y por apoyarme siempre en todo. Y a mi herma, por animarme a meterme en este mundo, por creer mucho en mí, por apoyarme, por ser mí amiga... porque en el fondo la quiero.

Pero en especial quiero darle las gracias a Elena, por decirme que sí, por enseñarme a trabajar en el laboratorio, por su apoyo, por animarme siempre, por estar dispuesta a ayudarme en todo momento, por no dejarme sola con mis 125 ratas, y sobre todo por la paciencia, gracias por aguantarme. Gracias por todo.

## Abreviaturas

- AANAT: arilalquilamina N-acetil transferasa
- AC: Adenilato ciclasa
- AMPc: Adenosín monofosfato cíclico
- ARNm: Mensajero del ácido ribonucleico
- ASMT: N-acetilserotonina metiltransferasa
- Bmal1: Gen *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator – like (Arntl)*, conocido como Bmal1
- Ca<sup>++</sup>: Calcio
- Clock: Gen *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*
- Cry: Gen Criptocromo
- dbp: Gen *D site of albumin promoter Binbing Protein*
- dec: Gen *Deleted in Esophageal Cancer*
- FSH: Hormona foliculoestimulante
- g: gramos
- GCS: Ganglio cervical superior
- GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas
- HHG: Hipotálamo-hipófisis-gonadal
- HIOMT: Hidroxiindol-orto-metil transferasa
- 5-HT: 5- hidroxitriptamina
- 5-HTP: 5-hidroxitriptófano
- LH: Hormona luteinizante
- LL: Luz continua
- LL+MEL: Luz continua más tratamiento con melatonina
- IMC: Índice de masa corporal
- IML: Núcleo intermediolateral del cordón espinal
- LO: Luz-Oscuridad
- µg: microgramos
- ml: mililitros
- mM: miliMolar

- MT: Móviles totales
- myc: Gen de la familia de protooncogenes Myc
- NA: Noradrenalina
- NAS: N-acetilserotonina
- NPV: Núcleo paraventricular
- NSQ: Núcleo supraquiasmático
- pai-1: Gen *Plasminogen Activator Inhibitor*, también conocido como SERPINE1
- P.C.: Peso corporal
- Per: Gen Period
- PLC: Fosfolipasa C
- Rev erb  $\alpha$ : Gen Rev erb alfa
- RNS: Especies reactivas de nitrógeno
- ROR/RZR: Familia de receptores de melatonina *Retinoid Orphan Receptor / Retinoid Z receptor*.
- ROS: Especies reactivas de oxígeno
- SNC: Sistema Nervioso Central
- sox 3: Gen de la familia SOX que codifica un factor de transcripción
- t: tiempo
- TPH1: Triptófano hidroxilasa 1
- Trp: Triptófano
- usf: Gen *Upstream Stimulatory Factor*

# Índice

## **1. Introducción**

1.	Cronobiología.....	1
2.	Sistemas circadianos .....	1
2.1.	El Reloj Biológico en los mamíferos: Núcleo supraquiasmático.....	2
2.2.	Glándula pineal .....	5
2.3.	Vía nerviosa. Inervación de la glándula pineal. ....	6
3.	Melatonina.....	8
3.1.	Síntesis de melatonina.....	8
3.2.	Funciones de la melatonina .....	11
3.3.	Receptores de melatonina.....	12
4.	Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal.....	13
4.1.	Eje hipotálamo-hipófisis gonadal y reproducción.....	14
4.2.	Ciclo reproductor en la rata: Ciclo del estro.....	15
4.3.	Evolución del eje HHG a lo largo del desarrollo. Diferentes periodos del desarrollo sexual en la rata. ....	16
5.	Melatonina, pubertad y reproducción.....	18
5.1.	Melatonina y pubertad.....	20
5.2.	Melatonina y reproducción.....	20
5.3.	Aparato reproductor masculino.....	21
5.4.	Capacitación espermática e hiperactivación.....	22
6.	Melatonina durante la gestación.....	23
6.1.	Influencia de la melatonina materna sobre los descendientes. ....	24
7.	Cronodisrupción .....	26
7.1.	Luz artificial durante la noche.....	27
7.2.	Influencia de la luz sobre el sistema circadiano .....	29
7.3.	Cronodisrupción y obesidad.....	30
7.4.	Cronodisrupción y reproducción.....	31

<b>2. Hipótesis y Objetivos</b> .....	32
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	34
<b>4. Resultados</b>	
1. Resultados de las madres durante la gestación.....	40
2. Resultados de los descendientes.....	41
2.1. Resultados de los descendientes en el periodo neonatal e infantil .....	41
2.2. Resultados de los descendientes en el periodo prepuberal y en la edad adulta .....	41
2.2.1. Resultados de las hembras.....	41
2.2.2. Resultados de los machos.....	43
<b>5. Discusión</b> .....	58
<b>6. Conclusiones</b> .....	71
<b>7. Bibliografía</b> .....	72
<b>ANEXO 1.</b> Ciclicidad estral de las descendientes. ....	88
<b>ANEXO 2.</b> Porcentaje de espermatozoides móviles totales de cada macho.....	91



## **Índice de Figuras y Tablas**

- Fig.1.** Componentes del Sistema Circadiano. (Pag.2)
- Fig.2.** Núcleo Supraquiasmático: Marcapasos circadiano central. (Pag.3)
- Fig.3.** Efecto de la desincronización sobre los relojes central y periféricos. (Pag.5)
- Fig.4.** Inervación de la glándula pineal. (Pag.7)
- Fig.5.** Biosíntesis de melatonina. (Pag.8)
- Fig.6.** Ritmo de secreción de melatonina. (Pag.9)
- Fig.7.** Algunas de las funciones fisiológicas con ritmicidad circadiana. (Pag.11)
- Fig.8.** Niveles hormonales a lo largo del ciclo estral de la rata. (Pag.16)
- Fig.9.** Influencia de la melatonina sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. (Pag.19)
- Fig.10.** Detalle del aparato reproductor masculino: testículo y epidídimo. (Pag.22)
- Fig.11.** Influencia de la melatonina materna sobre el feto. (Pag.25)
- Fig.12.** Cronodisrupción. (Pag.26)
- Fig.13.** Contaminación lumínica. (Pag.28)
- Fig.14.** Ganancia de peso de las madres durante la gestación. (Pag.46)
- Fig.15.** Duración de la gestación. (Pag.46)
- Fig.16.** Número de crías nacidas vivas y muertas. (Pag.47)
- Fig.17.** Evolución del peso de los descendientes desde el nacimiento hasta los 20 días de edad. (Pag.47)
- Fig.18.** Evolución del peso de las descendientes hembras desde los 20 días de edad. (Pag.48)
- Fig.19.** Edad de la apertura vaginal. (Pag.48)

**Fig.20.** Peso de la hipófisis de las hembras a los 28 días y en la edad adulta. (Pag.49)

**Fig.21.** Peso de la glándula pineal de las hembras a los 28 días y en la edad adulta. (Pag.50)

**Fig.22.** Peso de los ovarios a los 28 días y en la edad adulta. (Pag.50)

**Fig.23.** Peso del oviducto y útero a los 28 días y en la edad adulta. (Pag.51)

**Fig.24.** Glucemia a los 28 días y en la edad adulta. (Pag.51)

**Fig.25.** Evolución del peso de los descendientes machos desde los 20 días de edad. (Pag.52)

**Fig.26.** Peso de la hipófisis de los machos a los 28 días y en la edad adulta. (Pag.53)

**Fig.27.** Peso de la glándula pineal de los machos a los 28 días y en la edad adulta. (Pag.53)

**Fig.28.** Peso de los testículos a los 28 días y en la edad adulta. (Pag.54)

**Fig.29.** Porcentaje de espermatozoides móviles totales de los machos descendientes del grupo Control. (Pag.55)

**Fig.30.** Porcentaje de espermatozoides móviles totales de los machos descendientes del grupo LL. (Pag.56)

**Fig.31.** Porcentaje de espermatozoides móviles totales de los machos descendientes del grupo LL+MEL. (Pag.57)

**Tabla 1.** Porcentaje de hembras que ciclan de forma adecuada. (Pag.49)

**Tabla 2.** Porcentaje de machos que presentan hiperactivación de la motilidad espermática. (Pag.54)

# **1. INTRODUCCIÓN**

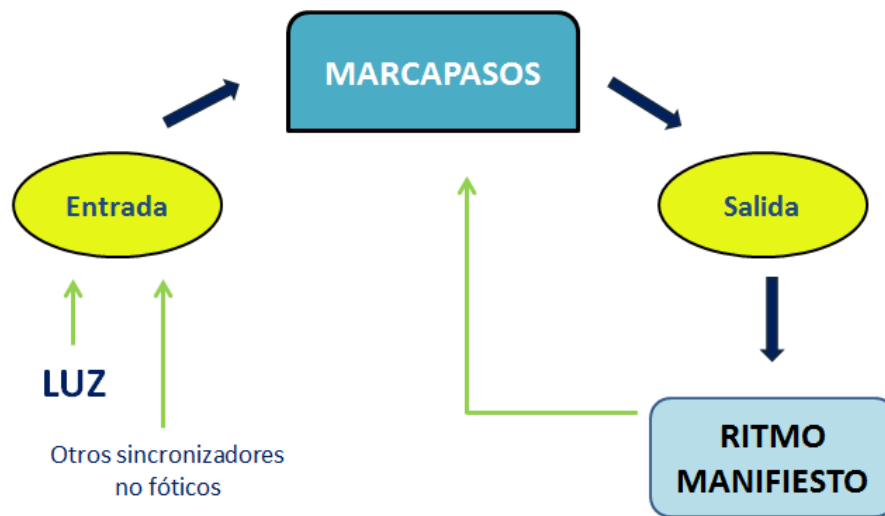
## **1. Cronobiología**

La cronobiología es la disciplina que estudia la naturaleza y función de los ritmos biológicos. El término ritmo biológico se aplica a toda oscilación regular en el tiempo de una variable biológica. Existe una amplia gama de frecuencias en los ritmos biológicos, que pueden ir desde un ciclo por milisegundo hasta un ciclo cada varios años (Cardinali et al., 1994).

## **2. Sistemas circadianos**

Si analizamos el significado etimológico del término circadiano obtendremos una de las principales características de estos sistemas, su extensión, de aproximadamente 24 horas: “*circa*”, alrededor, en torno a, y “*dies*”, día (Morris et al., 2012). Los ritmos circadianos son aquellos que se dan con una periodicidad de 24 horas, pudiendo presentar en condiciones constantes una duración mínima de 20-22 horas y máxima de 26-28 horas. Tienen carácter endógeno, es decir, son generados por el organismo, si bien, están sincronizados con determinados factores ambientales como el ciclo de luz-oscuridad (LO) (Cardinali et al., 1994; Aguilar-Roblero et al., 2004).

Los sistemas circadianos se componen de una o varias entradas (sincronizadores), un marcapasos o reloj central y una serie de vías eferentes o salidas desde los marcapasos a los sistemas efectores (ritmo manifiesto) (Cardinali et al., 1994) (Fig.1). La entrada principal del sistema es la luz; la alternancia del ciclo LO, el reloj central es el núcleo supraquiasmático (NSQ) y una de las principales salidas es el ritmo de melatonina.

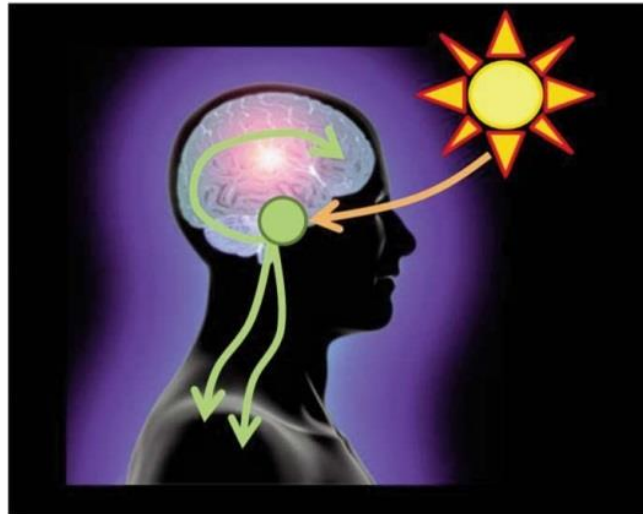


**Figura 1.** Componentes del sistema circadiano.

### **2.1.El Reloj Biológico en los mamíferos: Núcleo supraquiasmático.**

Durante la mayor parte de la evolución de las especies la duración de los ciclos de LO ha sido de 24 horas, por lo que fue ventajoso para los animales modular su metabolismo, actividad locomotora y en definitiva su fisiología sobre un periodo de 24 horas para preservar energía, reducir la presión de depredación y evitar la aparición de procesos celulares antagonistas (Li et al., 2012; Thut et al., 2012; Reiter et al., 2013). Por todo esto prácticamente todas las especies, incluido el hombre, desarrollaron un reloj biológico sensible a la luz cuya función está gobernada por el ciclo LO, ya que esta es la variable regular más recurrente en el medioambiente (Brainard et al., 1983; 1984; Meng et al., 2011). Hemos adquirido un sistema de control temporal endógeno mediante el desarrollo de un grupo de neuronas capaces de monitorizar el fotoperiodo ambiental que sincroniza de forma óptima la fisiología y el comportamiento de los organismos con el día solar.

En mamíferos, el reloj maestro o generador de ritmos central encargado de controlar la ritmicidad tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en los tejidos periféricos se encuentra en el NSQ del hipotálamo. Su función es orquestar todos los ritmos circadianos conocidos (Fig.2) (Swanson y Cowan, 1975; Gillette y Tischkau, 1999; Li et al., 2012; Reiter et al., 2013).



**Figura 2.** Núcleo supraquiasmático: marcapasos circadiano central. El NSQ recibe la información fotoperiódica y actúa sobre una gran cantidad de procesos fisiológicos y de comportamiento. Tomada de Voigt et al., (2013).

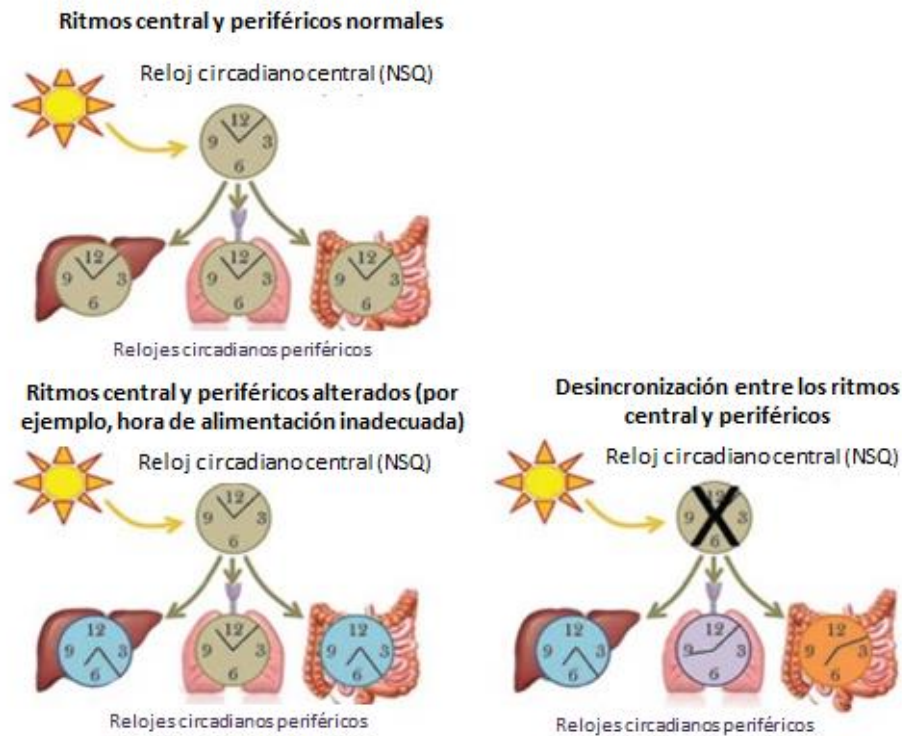
El NSQ está localizado en el hipotálamo anterior, en el área preóptica mediobasal, justo en la unión del diencefalo y el telencefalo y directamente sobre el quiasma óptico (Reiter et al., 2013). Está constituido por una gran cantidad de células gliales y neuronas, células que expresan una ritmicidad endógena muy precisa en su funcionamiento. Este grupo de neuronas presenta un ritmo de actividad intrínseco que es algo superior a la duración del día, próximo a las 25 horas.

Una característica del reloj biológico es su capacidad para reajustarse ante cambios en el medioambiente (Maronde y Stehle, 2007). Esta capacidad es importante en el contexto de los ajustes estacionales a la duración del día y sobre todo para las personas que se ven obligadas a trabajar y a dormir fuera de los horarios normales, como son los trabajadores a turnos, o a viajar a diferentes zonas horarias.

La ritmicidad endógena que presentan los ritmos circadianos y que les permite seguir funcionando correctamente a pesar de que se alteren las condiciones ambientales se genera a nivel celular. Cada neurona del NSQ tiene la maquinaria molecular necesaria para generar ritmicidad circadiana. Los ritmos en el NSQ están mediados por

los bucles de retroalimentación transcripcionales y traduccionales de los genes reloj, como *per1*, *per2*, *per3*, *cry1*, *cry2*, *Clock*, *Bmal1*, *dec1*, *dec2* y *Rev erb  $\alpha$* . Los genes reloj clave son *Bmal1* y *Clock*, ya que sus productos génicos forman un heterodímero que se une a una secuencia génica específica, conocida como “E-box”, en la región promotora de otros genes reloj como *per1*, *per2*, *cry1* y *cry2* induciendo su expresión (Kennaway, 2005; Zawilska et al., 2009; Reiter et al., 2011; Voigt et al., 2013). Además de los genes reloj hay otros que también son regulados por el heterodímero *Bmal-Clock*, como *dbp*, *usf*, *myc*, *sox 3*, el gen de la vasopresina, *pai-1*... (Kennaway, 2005).

Además del NSQ el resto de tejidos del organismo presentan relojes internos que controlan los eventos moleculares que se dan cada 24 horas. Todas las células del organismo presentan ritmos circadianos que son sincronizados por el NSQ de forma directa, mediante la comunicación con células nerviosas o la liberación de hormonas como la melatonina, oxitocina o vasopresina al torrente sanguíneo. Pueden ser regulados también por otros factores externos además de la luz, como la ingesta de alimentos. Un patrón de alimentación anormal puede causar alteraciones en los ritmos circadianos periféricos del intestino e hígado, por ejemplo, que se verán desincronizados de los ritmos centrales. Los tejidos periféricos expresan ritmos autosostenidos capaces de funcionar independientemente del NSQ, ya que aunque se produzca una lesión en el NSQ que acabe con la ritmicidad circadiana los relojes periféricos continúan mostrando ritmicidad, sin embargo estos ritmos periféricos acabarán desincronizados entre sí a lo largo del tiempo (Voigt et al., 2013) (Fig.3).



**Figura 3.** Efecto de la desincronización sobre los relojes central y periféricos. Tomada de Voigt et al., (2013).

## 2.2. Glándula pineal

La glándula pineal es un transductor neuroendocrino situado en la línea media del cerebro. Su función principal es transducir la información de luz y oscuridad a todo el organismo mediante la síntesis y secreción de melatonina (Lerner et al., 1959; Reiter, 1991; Møller y Baeres, 2002; Borjigin et al., 2012).

El 80% del componente celular de la glándula pineal está constituido por pinealocitos. Se trata de células poliédricas con prolongaciones citoplasmáticas que terminan en los espacios perivasculares e intercelulares (Aguilar-Roblero et al., 2004). En los mamíferos, estas células proceden de células fotorreceptoras similares a las células retinianas, pero a lo largo de la evolución fueron perdiendo esta capacidad sensorial para convertirse en células endocrinas con actividad secretora (Maronde y Stehle, 2007). Los pinealocitos son las células encargadas de producir indolaminas a

partir del Triptófano (Trp), la principal de las cuales es la melatonina. El resto de componentes celulares de la glándula pineal son elementos vasculares, terminaciones nerviosas y células de la glía.

La glándula pineal está conectada con el NSQ del hipotálamo, del cual recibe impulsos nerviosos a través de una vía multisináptica mediante fibras nerviosas simpáticas. Está también inervada por el sistema nervioso parasimpático, aunque aún no está claro cuál es su función (Borjigin et al., 2012).

### **2.3.Vía nerviosa. Inervación de la glándula pineal.**

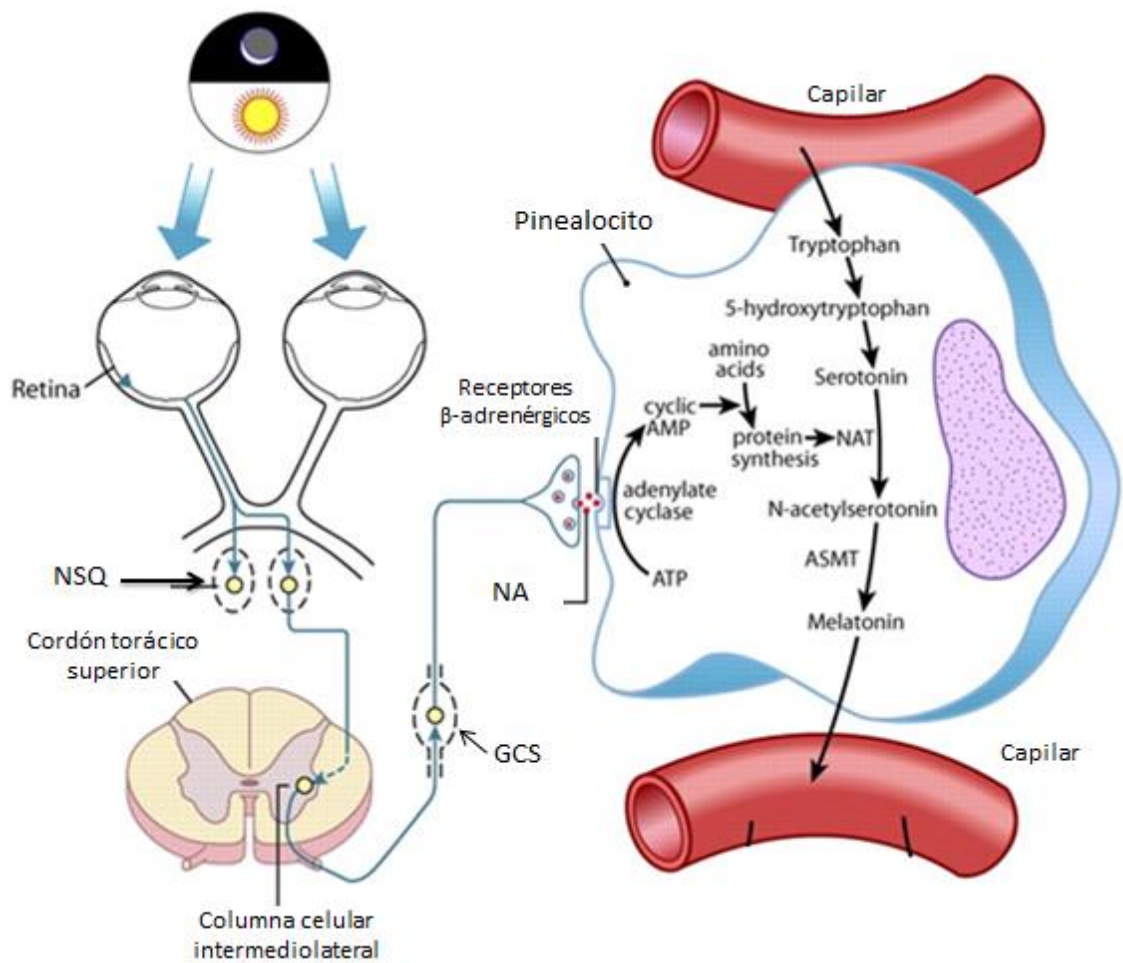
La función de los ciclos de LO es ajustar el periodo de actividad del NSQ a 24 horas. Para que esta sincronización se pueda llevar a cabo es necesaria la percepción de la luz por unas células fotosensibles altamente especializadas. Estas células son las células ganglionares de la retina. Las células ganglionares implicadas en este proceso representan solo un 1-2% de la población total de células ganglionares (Reiter et al., 2011). Son células que presentan su propio fotopigmento especializado: melanopsina, y tienen la capacidad de convertir las señales luminosas en señales eléctricas. Estas células entran en contacto con una serie de neuronas especializadas que forman parte del tracto retinohipotalámico, que conecta la retina con el NSQ (Mason y Lincoln, 1976; Aguilar-Roblero et al., 2004; Reiter et al., 2013). Los axones de las células ganglionares envían su información principalmente hacia el nervio óptico, en lugar de proyectarla hacia el núcleo geniculado lateral y otros centros visuales. Los axones viajan por el nervio óptico hasta el quiasma óptico, desde donde divergen hasta penetrar en el NSQ, donde sinapsan con las neuronas reloj.

El circuito que conecta la glándula pineal con el NSQ es uno de los más conocidos del cerebro, con unos componentes muy bien definidos. Los axones de las neuronas del NSQ proyectan hacia el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo, entre otros lugares. Las fibras nerviosas, que son neuronas preganglionares simpáticas, descienden a través del tronco cerebral sin hacer otros contactos sinápticos hasta llegar a la columna celular intermediolateral (IML) del cordón torácico superior. Tras hacer sinapsis con estas células los axones preganglionares abandonan la médula espinal y



atraviesan la cadena simpática hacia el ganglio cervical superior (GCS), donde hacen la última sinapsis. Desde aquí los axones de las neuronas postganglionares acompañan a los vasos sanguíneos hacia la glándula pineal. Una vez en ella, las fibras postganglionares quedan en estrecha proximidad con los pinealocitos (Møller y Baeres, 2002; Reiter et al., 2011) (Fig.4).

En oscuridad el NSQ envía un impulso nervioso que produce una descarga de noradrenalina (NA) desde las terminaciones nerviosas postganglionares cercanas a los pinealocitos. La NA actúa sobre los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de la membrana de los pinealocitos (Reiter et al., 2011). Esta acción culmina en una serie de eventos moleculares que conducen al aumento de la síntesis y liberación de melatonina por la glándula pineal asociado con la oscuridad (Huang et al., 2008; Reiter et al., 2011).



**Figura 4.** Inervación de la glándula pineal. Tomada de Reiter et al., (2009).

### 3. Melatonina

#### 3.1. Síntesis de melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una hormona neuroendocrina de naturaleza lipofílica. Se sintetiza a partir del aminoácido Trp a través de una ruta compuesta por cuatro reacciones enzimáticas, los pinealocitos toman el Trp de la sangre y lo transforman en serotonina mediante una hidroxilación y una descarboxilación. La hidroxilación da lugar a la conversión de Trp en 5-hidroxitriptófano (5-HTP) por la enzima triptófano hidroxilasa 1 (TPH1) y la descarboxilación da lugar a la síntesis de 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina por la enzima 5-hidroxitriptófano descarboxilasa. La serotonina es transformada en N-acetilserotonina (NAS) por la enzima arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT) y a continuación la N-acetilserotonina es metilada a melatonina en una reacción catalizada por la hidroxindol-orto-metiltransferasa (HIOMT) o N-acetilserotonina metiltransferasa (ASMT) (Axelrod y Weissbach, 1960; Klein, 1985) (Fig.5).

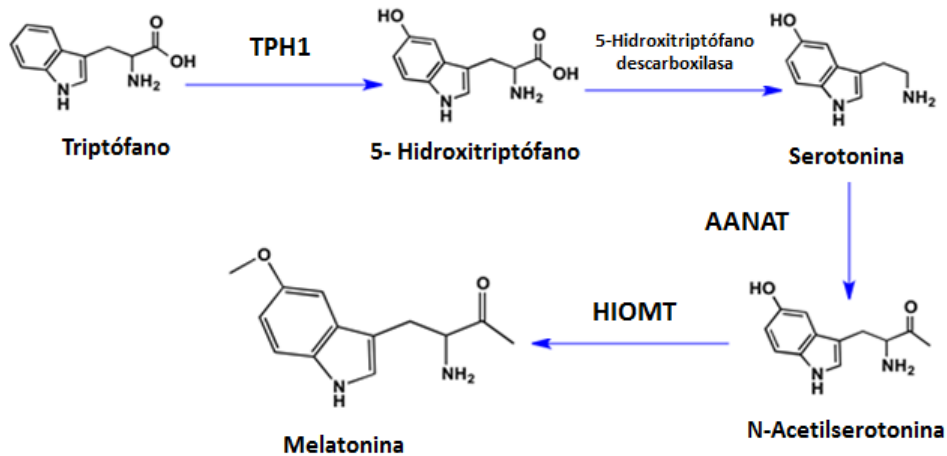
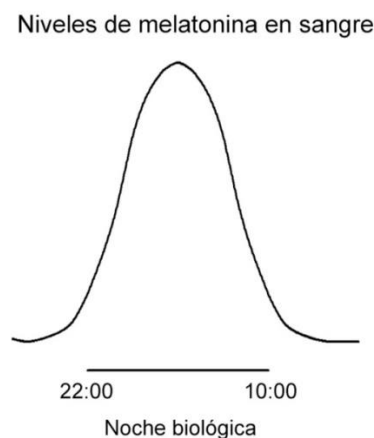


Figura 5. Biosíntesis de melatonina.

Tras su síntesis, la melatonina no queda almacenada en los pinealocitos sino que es liberada rápidamente a los capilares presentes en la glándula y desde aquí a otros fluidos corporales como al líquido seminal, líquido folicular, bilis, fluido cerebroespinal, saliva y líquido amniótico (Wilkinson et al., 1977; Zawilska et al., 2009;

Reiter et al., 2011; Tamura et al., 2014). Es decir, a medida que aumenta la síntesis de melatonina en la glándula pineal aumentarán del mismo modo los niveles de dicha indolamina en estos fluidos.

Los niveles de melatonina en sangre se encuentran bajos a lo largo del día, produciéndose un aumento significativo durante la noche, siendo el periodo de secreción de melatonina proporcional a la duración del periodo de oscuridad (Fig.6) (Maronde y Stehle, 2007; Zawilska et al., 2009). En roedores se ha visto que no solo la melatonina, sino que los cuatro intermediarios de la reacción y principalmente las enzimas AANAT e HIOMT presentan ritmicidad circadiana con niveles máximos durante la noche (Klein y Weller, 1970; Klein et al., 1996; Zawilska et al., 2009; Borjigin et al., 2012).



**Figura 6.** Ritmo de la secreción de melatonina.

Durante el día se detectan altos niveles de serotonina en la glándula pineal. En los casos en los que no hay síntesis de melatonina la cantidad de serotonina sigue aumentando durante la noche, pero en los casos en los que sí se sintetiza tanto sus niveles como los de 5-HTP caen a valores por debajo de los detectados durante el día, ya que son usados para la síntesis de melatonina. La enzima limitante, clave, en la síntesis de serotonina es la TPH1. La modificación postraduccional de dicha enzima

mediante la fosforilación de la serina-58 la estabiliza y conduce a un aumento en la síntesis de serotonina durante la noche (Huang et al., 2008).

Clásicamente se ha considerado que la AANAT es la enzima limitante en la producción de melatonina debido a su actividad rítmica (Klein et al., 1996; Klein 2007; Zawilska et al., 2009). Durante el día la actividad enzimática de la AANAT es muy baja debido a los bajos niveles presentes de esta enzima, lo que limita la producción de melatonina. El ritmo de transcripción de la AANAT está regulado por el circuito nervioso que dirige la actividad circadiana en la glándula pineal. La NA liberada por las fibras nerviosas procedentes del GCS sobre la glándula pineal actúa sobre receptores  $\alpha$ -y  $\beta$ -adrenérgicos incrementando los niveles de AMPc. El AMPc produce la fosforilación de proteínas-quinasas dependientes de AMPc, lo que conduce a un aumento de los niveles de ARNm de la enzima AANAT (Vanecek et al., 1985; Klein, 1985; Roseboom et al., 1996; Ho y Chik, 2010).

También son importantes las mutaciones en las HIOMT, que dan lugar a bajos niveles de melatonina, y cada vez están centrando más el interés de las investigaciones (Borjigin et al., 2012).

Además de la glándula pineal, otros tejidos periféricos como la retina, el tracto gastrointestinal, la piel, leucocitos, médula ósea... producen melatonina, aunque a diferencia de la glándula pineal no la producen de forma rítmica. De hecho es muy posible que todos los órganos sean capaces de producirla ya que su síntesis podría darse en las mitocondrias, orgánulos presentes en todas las células eucarióticas (Tan et al., 2013). En el aparato reproductor femenino se ha visto que se puede producir melatonina en los ovarios, en los ovocitos, en las células del cúmulus y en la placenta (Itoh et al., 1999; Lanoix et al., 2008; El-Raey et al., 2011; Sakaguchi et al., 2013).

En el organismo no hay barreras morfofisiológicas para la melatonina. Es capaz, por ejemplo, de atravesar sin problemas la barrera hematoencefálica y la placenta, alcanzando al feto. Es una molécula muy ubicua y capaz de ser transferida fácilmente entre los diferentes compartimentos celulares. Esta característica es la que le permite ejercer efectos protectores sobre todos los órganos maternos, sobre la placenta y el feto (Klein, 1972; Reppert et al., 1979; Schenker et al., 1998; Reiter et al., 2013).

### 3.2. Funciones de la melatonina

La secreción rítmica de melatonina a su vez ejerce una influencia sobre otros ritmos circadianos como el de vigilia/sueño o la temperatura corporal, y está implicada en otras muchas funciones generales como la reproducción, el metabolismo, carcinogénesis y la regulación del sistema inmunitario (Fig.7). Además puede actuar contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) debido a su efecto antioxidante, capacidad que explica los grandes beneficios que tiene a nivel del aparato reproductor y como agente antienvjecimiento (Tamura et al., 2014). La melatonina también ejerce un papel crítico en la sincronización de las actividades reproductivas en especies reproductoras estacionales. En humanos, variaciones en los niveles de melatonina están relacionadas con alteraciones del sueño, depresión psicológica, alteraciones metabólicas en la regulación del peso corporal, déficit de atención, hiperactividad... Aunque las investigaciones sobre la melatonina y los ritmos circadianos están avanzando mucho y es muy probable que los descubrimientos hasta la fecha sean solo una pequeña fracción de las funciones reales de la melatonina y la ritmicidad circadiana (Reiter et al., 2009; 2013).

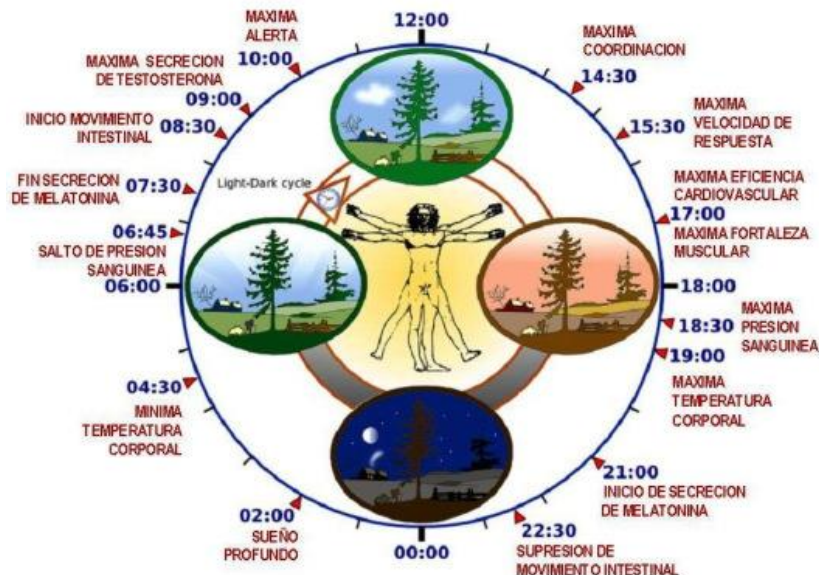


Figura 7. Algunas de las funciones fisiológicas con ritmicidad circadiana. Tomada de

<http://portadordeluz.wordpress.com/>

### 3.3.Receptores de melatonina

Muchas de las acciones de la melatonina están mediadas por su actuación sobre receptores de membrana específicos, aunque también puede actuar a través de mecanismos no mediados por receptor.

Hay diferentes subtipos de receptores de melatonina: MT1, MT2, MT3 y receptores nucleares.

- Los receptores MT1 y MT2 pertenecen a la familia de receptores con siete regiones transmembrana acoplados a proteína G. La activación de la proteína G conduce a una disminución de los niveles de AMPc, ya que inhibe a una adenilato ciclasa (AC). En algunas células la proteína G activa a una fosfolipasa C (PLC)  $\beta$  y PLC $\epsilon$ , lo que aumenta los niveles de  $Ca^{++}$  y activa una señalización mediada por calmodulina, una calmodulina quinasa y calreticulina. Además MT1 también puede estar asociado con el canal de potasio KIR3. Se ha visto que estos receptores también pueden promover la actividad de una c-Jun-N-terminal Kinasa, aunque la ruta precisa de señalización no se conoce. Estos receptores pueden actuar como monómeros o formar homodímeros y heterodímeros, aunque aún no está claro si los efectos de la melatonina al actuar sobre estos dímeros son diferentes a los que tiene al actuar sobre los monómeros (Slominski et al., 2012). Se ha encontrado la expresión del receptor MT1 en tejido nervioso (sobre todo en el hipotálamo, en concreto en el NSQ, NPV, núcleo sexual dimórfico del área preóptica o núcleo intermedio del hipotálamo anterior, núcleo arcuato, eminencia media...), en la hipófisis (en gran cantidad en la pars tuberalis, y con menor intensidad en las células glandulares de la adenohipófisis y en las fibras nerviosas de la neurohipófisis, mientras que en la región intermedia no se expresa), y en órganos como testículos y ovarios, entre otros. El receptor MT2 se expresa en el cerebro (NSQ e hipotálamo), hipófisis, testículos, retina y glándula mamaria, entre otros (Wu et al., 2006; Slominski et al., 2012).

- El receptor MT3 es una enzima citosólica, una quinona reductasa II. Se trata de un receptor no acoplado a proteína G con una alta afinidad por la melatonina. Este receptor se ha encontrado en especies como hámster y conejo, pero aún no se ha encontrado en humanos. Se expresa en hígado, riñón, corazón, tejido adiposo, retina y cerebro (Slominski et al., 2012).

- Los receptores de melatonina nucleares pertenecen al grupo ROR/RZR (*Retinoid Orphan Receptor/Retinoid Z receptor*). Se han encontrado en tejido nervioso, adiposo, piel, testículos, cartílago e hígado. Hay investigadores que afirman que la melatonina regula los receptores nucleares mediante el receptor de membrana MT1 (Slominski et al., 2012).

#### **4. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal**

El hipotálamo se encuentra ubicado en el diencéfalo, debajo del tálamo. Ocupa menos del 1% del volumen encefálico total pero tiene una gran importancia ya que es el centro de la homeostasis y además contiene centros para varios impulsos conductuales. Recibe aferencias de múltiples orígenes como el cerebro, la formación reticular y distintos receptores sensitivos. Las eferencias del hipotálamo influyen en muchas funciones de la división autónoma del sistema nervioso y en diversas funciones endocrinas. Las neurohormonas hipotalámicas controlan la liberación de hormonas de la adenohipófisis y son conocidas como hormonas liberadoras o inhibidoras (Silverthorn, 2007).

La hipófisis es una glándula conectada con el hipotálamo mediante un tallo delgado, la eminencia media. Está formada por dos tipos de tejidos diferentes que se unen durante el desarrollo embrionario:

- La adenohipófisis o hipófisis anterior es una verdadera glándula endocrina de origen epitelial. Las hormonas secretadas por ella son las hormonas adenohipofisarias y se conocen como hormonas tróficas, ya que la mayoría de ellas tienen como diana otra glándula o célula endocrina. Las hormonas de la adenohipófisis controlan tantas funciones vitales que esta glándula es conocida como “glándula maestra”. Controlan procesos tan complejos como la reproducción, el crecimiento o el metabolismo.

- La neurohipófisis o hipófisis posterior es una extensión del tejido nervioso del cerebro. Las hormonas que secreta se conocen como neurohormonas y son producidas en el hipotálamo. A través del sistema porta hipotálamo-hipófisis las neurohormonas alcanzan la hipófisis, donde se almacenan y son liberadas en el momento adecuado. Estas neurohormonas son dos: oxitocina y vasopresina.

#### **4.1.Eje hipotálamo-hipófisis gonadal y reproducción**

La reproducción está controlada a nivel central. El control hormonal de la reproducción sigue el patrón básico hipotálamo, lóbulo anterior de la hipófisis y glándulas periféricas. Las vías que regulan la reproducción comienzan con la secreción de hormonas peptídicas en el hipotálamo y el lóbulo anterior de la hipófisis. Las hormonas tróficas adenohipofisarias controlan la secreción en las gónadas de hormonas esteroideas sexuales, como andrógenos, estrógenos y progesterona. Si bien el control principal de la función gonadal se encuentra en el encéfalo, las gónadas también influyen en su propio funcionamiento, ya que tanto los ovarios como los testículos secretan hormonas que actúan en forma directa sobre la hipófisis (Silverthorn, 2007).

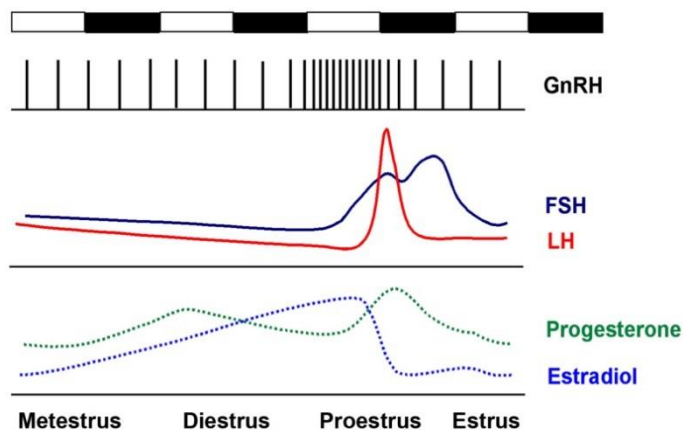
La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) del hipotálamo controla la secreción de las gonadotropinas del lóbulo anterior de la hipófisis. La GnRH se libera en forma de pulsos que se dan cada 1-3 horas por las neuronas GnRH. Alcanza la adenohipófisis a través del sistema porta hipotálamo-hipófisis y actúa sobre las células gonadotropas, encargadas de producir las gonadotropinas. Estas gonadotropinas son la hormona foliculoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). La FSH es necesaria, junto con las hormonas sexuales esteroideas para iniciar y mantener la gametogénesis. La LH actúa principalmente sobre las células endocrinas estimulando la síntesis de hormonas sexuales esteroideas (Silverthorn, 2007).

Cuando las concentraciones circulantes de esteroides gonadales son bajas la adenohipófisis secreta FSH y LH, pero cuando la concentración de esteroides alcanza cierto nivel se da un ciclo de retroalimentación negativa que inhibe la liberación de gonadotropinas. Los andrógenos siempre influyen sobre la liberación de gonadotropinas mediante retroalimentación negativa, es decir, si los niveles de andrógenos se elevan la liberación de FSH y LH se ve inhibida. Por otro lado, bajas concentraciones de estrógenos activan un ciclo de retroalimentación negativa, mientras que si la concentración de estrógenos aumenta rápidamente hasta un valor superior a un umbral durante al menos 36 horas la retroalimentación se modifica de negativa a positiva estimulándose la secreción de gonadotropinas, en particular de LH.



#### **4.2.Ciclo reproductor en la rata: Ciclo del estro.**

La progresión del ciclo reproductor en la mujer y en la rata es diferente. En mujeres se trata de un ciclo menstrual de 28 días, mientras que en la rata el ciclo se conoce como ciclo estral, es más corto que en la mujer, con una duración de 4-5 días, y no se produce sangrado (Fig.8) (Hagenauer y Lee, 2012; Fernández et al., 2013). Se diferencian además por la ausencia, en rata, de fase luteal (excepto en los casos de estimulación vaginocervical, lo que se conoce como pseudopreñez). El ciclo estral presenta cuatro fases: diestro, proestro, estro y metaestro. Los dos primeros estadios del ciclo, metaestro y diestro, se caracterizan por bajos niveles de estradiol y los folículos reclutados durante el ciclo estral previo progresan de folículos antrales tempranos a folículos preovulatorios. Al final del diestro e inicio del proestro, los folículos ováricos se encuentran en estadio preovulatorio y secretan altas cantidades de estradiol, apareciendo un pico de dicha hormona. Este aumento en los niveles de estradiol conduce a una serie de cambios moleculares y morfológicos en las neuronas GnRH y en las interneuronas que las rodean y modulan. El resultado final es que en la tarde del proestro, las neuronas GnRH liberan un pico de GnRH, que conduce a la liberación de un bolo de FSH y LH en la hipófisis. Tanto la FSH como la LH actúan en el ovario, produciendo la FSH el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos antrales, mientras que la LH inducen la ovulación. Las aferencias sobre las neuronas GnRH que regulan la liberación del pico de GnRH son el aumento de los niveles de estrógenos en el día del proestro producidos por los folículos ováricos en maduración, que se produce unas 12 horas antes de la ovulación, y la información del momento del día aportada por el NSQ. Este pico de estrógenos va seguido unas horas más tarde por un pico de progesterona. La ovulación se da ese día por la noche y, a pesar de la disminución de los niveles hormonales, va seguida de un periodo de receptividad sexual conocido como estro (Becker, 2002; Fernández et al., 2013; Miller y Takahashi, 2013).



**Figura 8.** Niveles hormonales a lo largo del ciclo estral de la rata. Tomada de Miller y Takahashi, (2013).

#### **4.3. Evolución del eje HHG a lo largo del desarrollo. Diferentes periodos del desarrollo sexual en la rata.**

A medida que se da el desarrollo sexual de la rata se produce de forma paralela la evolución del eje HHG. El comportamiento del eje varía en las diferentes etapas del desarrollo. En base a la clasificación de Ojeda (1986) los periodos del desarrollo de la rata son:

- Periodo neoatal: entre el nacimiento y el día 7 de vida.
- Periodo infantil: desde el día 8 al 21 de vida.
- Periodo juvenil o prepuberal: entre los días 21 y 32 de edad.
- Periodo puberal: desde el día 32 hasta la apertura vaginal.
- Periodo adulto: desde el día de la apertura vaginal.

El día 12 de gestación el feto comienza a producir GnRH y desde el día 17 se detecta la producción de gonadotropinas, que permanecen a unos niveles muy bajos hasta el momento del nacimiento (Chiappa y Fink, 1977; Salisbury et al., 1982; Begeot et al., 1984; Aubert et al., 1985). Durante el periodo neonatal aumenta la secreción de gonadotropinas debido a que la madre aporta mediante leche materna una sustancia similar a la GnRH (Smith-White y Ojeda, 1984). Pero en esta etapa, hasta los 4-5 días de vida, la rata no presenta receptores para gonadotropinas en el ovario (Funkenstein et

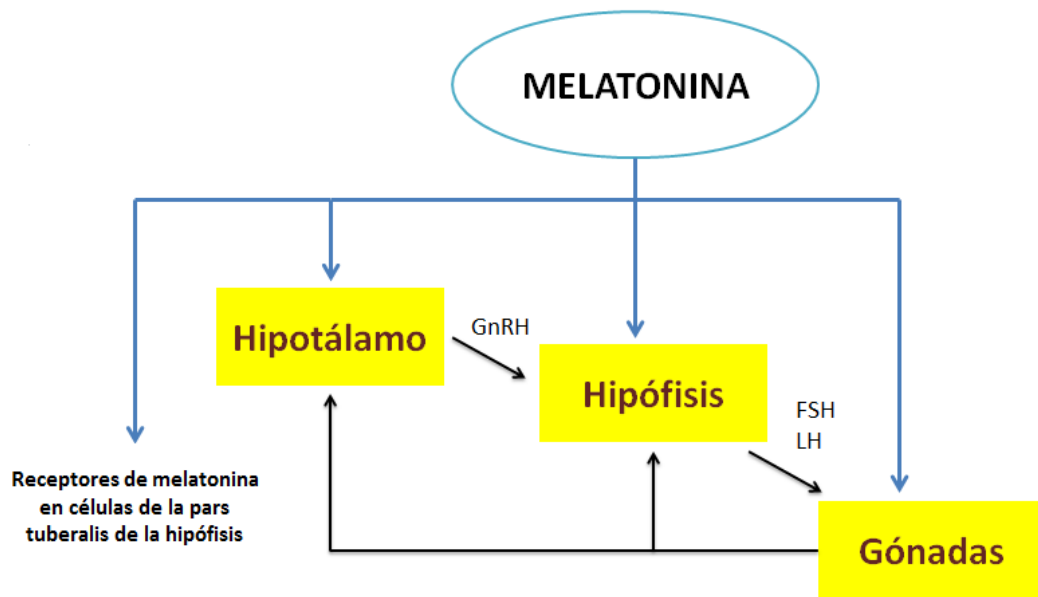
al., 1980), por lo que no responde a ellas, y el mecanismo feedback negativo de los estrógenos tampoco es funcional (Smith-White y Ojeda, 1981). A lo largo de esta etapa el cerebro va adquiriendo el control sobre la función ovárica, observándose un aumento en la cantidad de receptores en el ovario para gonadotropinas (Smith-White y Ojeda, 1981; Ojeda et al., 1986), sobre todo para FSH, así como una mayor respuesta de esteroides sexuales a las gonadotropinas hacia el final de este periodo (Funkenstein et al., 1980). En el periodo infantil los cambios que se dan en el eje HHG afectan al comienzo de la pubertad (Ojeda et al., 1986). Se da un aumento de los niveles de FSH, alcanzando un pico a los 12 días de vida (Ojeda y Ramírez, 1972; Meijs-Roelofs et al., 1973). La actividad de las neuronas GnRH es mayor, aunque descargan de forma asincrónica. Puntualmente producen descargas de forma sincrónica y esto junto con la ineficacia del feedback negativo de los estrógenos permiten mantener elevados los niveles de gonadotropinas. El día 16 comienzan a detectarse niveles de estradiol libre en sangre (Andrews et al., 1981). Tras el día 12 el mecanismo feedback de estradiol comienza a funcionar, quedando completamente operativo a los 15 días de vida, las neuronas GnRH muestran una mayor sincronización y los niveles de FSH comienzan a disminuir (Ojeda et al., 1986; Sokka y Huhtaniemi, 1995). Al comienzo del periodo juvenil o prepuberal el eje se encuentra en estado quiescente, lo que se manifiesta con unos niveles de FSH disminuidos, ausencia de los picos de LH (aunque su secreción es pulsátil) y un aumento de los niveles de estradiol en sangre. El eje HHG tiene la capacidad de responder a los estrógenos con un aumento en la secreción de gonadotropinas, aunque no se produce el pico preovulatorio (Ojeda et al., 1986). Hacia el final de esta fase los niveles de LH comienzan a aumentar y se hace patente un aumento en la amplitud del pulso que tiene lugar durante la tarde (Meijs-Roelofs et al., 1983). Se produce la maduración del ovario gracias a la acción de las gonadotropinas y de otras hormonas como prolactina y hormona del crecimiento. El desencadenamiento de la pubertad en la hembra se caracteriza por la apertura vaginal, la primera ovulación y la iniciación de los ciclos del estro, entre otros hechos. Para que se produzca es necesario el desarrollo de un mecanismo de feedback esteroideo sobre las gonadotropinas a nivel hipofisario (Pinilla, 1992).

En roedores el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios se va produciendo de forma progresiva durante el periodo juvenil, acelerándose cuando el momento de

adquisición de la competencia reproductiva se acerca (Ojeda y Urbanski, 1994). Además, a diferencia de en los humanos, la estacionalidad puede jugar un papel importante en la determinación del momento y rapidez del desarrollo sexual secundario (Hagenauer y Lee, 2012).

## **5. Melatonina, pubertad y reproducción**

La melatonina tiene efectos importantes en el desarrollo de la pubertad y en el comportamiento y fisiología reproductivos en muchas especies debido a su actuación a nivel del eje HHG (Fig.9) (Kennaway, 2005; Navara y Nelson, 2007; Tamura et al., 2014). La presencia de MT1, antes descrita, en las neuronas del NSQ indica que la melatonina actúa sobre esta subpoblación de neuronas ejerciendo una importante influencia sobre su ritmicidad. Además la melatonina refuerza la ritmicidad circadiana endógena en otros sistemas hipotalámicos. De hecho, además de su función circadiana la melatonina está implicada en la regulación de la reproducción, sueño, estrés, humor, temperatura corporal y cognición, funciones mediadas por el hipotálamo. En roedores, lesiones en el NSQ acaban con la ovulación y conducen a un estado de estro permanente (Raisman y Brown-Grant, 1977; Chappell, 2005). El NSQ envía señales a las neuronas GnRH que permiten que se produzca el pico de LH cuando los niveles de estrógenos son altos, lo que conduce a la ovulación. Además la expresión de los genes reloj en los diferentes niveles del eje permiten que se produzca de forma sincronizada la secreción pulsátil de las hormonas y prepara al ovario para la ovulación (Sellix y Menaker, 2010; Hagenauer y Lee, 2012).



**Figura 9.** Influencia de la melatonina sobre el eje HHG.

La primera evidencia que se tiene de que esta molécula altera la función reproductiva data de finales del siglo XIX, cuando se demostró que tumores en la glándula pineal alteran el desarrollo de la pubertad (Carlomagno et al., 2011), aunque no fue hasta unos años más tarde con el descubrimiento de la melatonina cuando se comprendió el mecanismo que media estos efectos. Se han encontrado niveles de melatonina más altos de lo normal en niños con pubertad precoz y más bajos en niños con retraso en la pubertad (Silman et al., 1979). En 1993 se descubrió que la melatonina tiene la capacidad de estimular la actuación de enzimas antioxidantes, reduciendo los niveles de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, lo que tienen una gran importancia para el correcto funcionamiento de las células y órganos, incluido el sistema reproductivo.

La principal función del sistema circadiano sobre el sistema reproductor es coordinar la ovulación, la receptividad y vigilia de la hembra y la actividad y vigilia en el macho (Kennaway, 2005). Cualquier alteración de los estímulos que sincronizan a los ritmos circadianos se relaciona con los cambios estacionales en el inicio de la pubertad y los ciclos de fertilidad e infertilidad.

## **5.1.Melatonina y pubertad**

Los ritmos de melatonina normales están estrechamente relacionados con los de las hormonas reproductivas durante la infancia y la pubertad. Los altos niveles de melatonina que se observan durante el periodo prepuberal pueden ayudar a mantener al eje HHG en un estado quiescente ya que a mayores niveles de melatonina los niveles de LH, FSH y testosterona serán más bajos (Bellastela et al., 1987; Tamura et al., 2008), aunque durante la noche se observa una disminución en los niveles de dicha hormona en ciertos estadios del desarrollo puberal (Murcia García et al., 2002). Hay estudios en humanos que tratan de determinar si la aparición de la menarquia se da de forma estacional en función de las características circadianas y del fotoperiodo que se están viendo muy dificultados ya que intervienen además otros factores como el tamaño al nacer, nutrición, clima, estrés, condiciones de vida...

Durante la pubertad hay una importante ritmicidad en la secreción de gonadotropinas y de esteroides sexuales en ambos sexos, alcanzándose los niveles más altos durante la noche. En la vida adulta desaparece esta ritmicidad (Bellastela et al., 1987; Tamura et al., 2008).

## **5.2.Melatonina y reproducción**

En general se considera que los humanos, como algunos roedores, tenemos la capacidad de reproducirnos todo el año, aunque lo cierto es que en parte tenemos una cierta estacionalidad en cuanto al momento del nacimiento debido a las fluctuaciones estacionales que se dan en el momento de la concepción (Tamura et al., 2008). Esta variabilidad estacional se pone de manifiesto en las tasas de fertilización, en la calidad embrionaria, concentración espermática, condensación de la cromatina... presentando picos importantes durante el final del invierno y el inicio de la primavera. Estos cambios estacionales de la fertilidad tienen su origen en los cambios que sufre la secreción de melatonina (Bronson, 1995; Rojansky et al., 2000; Henkel et al., 2001; Tamura et al., 2008).

Se ha determinado la expresión de receptores de melatonina en las neuronas GnRH y en diferentes células del aparato reproductor. Se ha encontrado también la

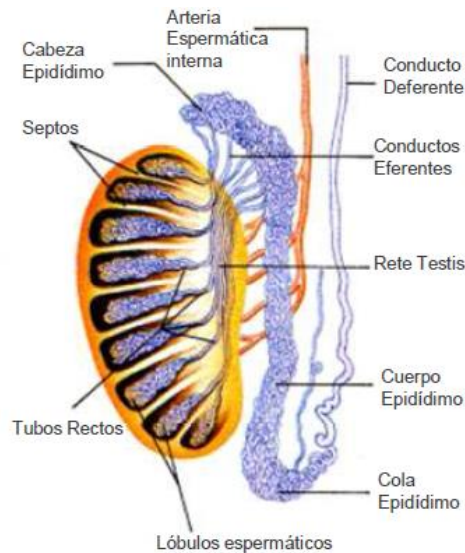
presencia de melatonina, de sus precursores NAS y serotonina y de las enzimas AANAT e HIOMT, implicadas en su síntesis, en los ovarios. En el líquido seminal y en el líquido folicular también se ha detectado la presencia de melatonina, siendo en este último los niveles diez veces más altos que los detectados en plasma (Tamura et al., 2014). Esta melatonina procede en parte de la sangre y en parte de los ovarios, probablemente de las células de la granulosa, que tienen la capacidad de sintetizar melatonina. Además, los niveles de melatonina en el ovario y líquido folicular presentan variaciones en función del momento del día, de modo similar a lo que ocurre en la glándula pineal.

### **5.3. Aparato reproductor masculino**

El aparato reproductor masculino puede definirse como un sistema excretor conectado a un sistema de maduración y almacenamiento de los espermatozoides.

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual se producen los espermatozoides y se lleva a cabo en los túbulos seminíferos de los testículos una vez que se ha alcanzado la pubertad. Los testículos están compuestos por una serie de lobulillos, dentro de los cuales se encuentran los túbulos seminíferos. Todos ellos desembocan a través de los túbulos rectos en la rete testis, y desde aquí alcanzarán el epidídimo a través de los conductos eferentes. El epidídimo es un conducto muy contorneado situado entre el testículo y el conducto deferente y dividido en cabeza, cuerpo y cola (Fig.10). En la cabeza del epidídimo se produce la maduración y concentración de los espermatozoides, en el cuerpo se produce un aumento en su motilidad y desde aquí pasan a la cola, donde se almacenan hasta ser eyaculados y donde son eliminados tras largos periodos de abstinencia sexual. La vía seminal se continúa con los conductos deferentes, que alcanzan la ampolla deferencial, la cual se comunica con el conducto eyaculador, que atraviesa la próstata y desemboca en la uretra. Las vías seminales son dobles hasta las ampollas deferenciales. Además de los testículos y las vías seminales, forman parte del aparato reproductor masculino las glándulas accesorias, que son las vesículas seminales, próstata, glándulas bulbouretrales o glándulas de Cowper y glándulas uretrales o de Littré. Contribuyen de forma muy decisiva a la formación del plasma seminal, ya que aportan el 80% del total del volumen

del eyaculado. Por último, el pene es atravesado por la uretra y su función es depositar los espermatozoides en la vagina de la hembra.



**Figura 10.** Detalle del aparato reproductor masculino: testículo y epidídimo. Tomada de Curso de análisis de semen según criterios OMS-2010. Banco de semen Ceifer (Granada).

#### 5.4. Capacitación espermática e hiperactivación

En mamíferos, la fertilización implica una serie de eventos que se dan de forma secuencial y que incluyen la migración de los espermatozoides a lo largo del tracto genital femenino, la penetración espermática a través de las células del cúmulus, su unión a la zona pelúcida, la exocitosis del contenido del acrosoma, la penetración de los espermatozoides a través de la zona pelúcida y la fusión de las membranas plasmáticas del ovocito y del espermatozoide. Sin embargo, los espermatozoides del eyaculado en fresco son incapaces de fertilizar los ovocitos, sino que deben sufrir una serie de cambios conocidos como capacitación que les permitan unirse y penetrar en el ovocito (Signorelli et al., 2012).

La capacitación es un proceso que se produce de forma natural en el tracto genital femenino, aunque también puede producirse *in vitro*, y que consiste en la adquisición por parte de los espermatozoides de la capacidad de fertilizar los ovocitos. Se trata de un



proceso complejo que implica una serie de cambios estructurales y funcionales en los espermatozoides, incluyendo la eliminación de factores estabilizantes adquiridos mientras residen en el plasma seminal, modificaciones de membrana, modulación de la actividad enzimática y fosforilación de proteínas. El proceso de capacitación se divide en eventos tempranos y rápidos, que incluyen la activación de movimientos flagelares vigorosos y asimétricos y que comienzan tras el abandono del epidídimo, segundos después de la eyaculación, y eventos tardíos y lentos, que comprenden cambios en el patrón de movimientos (hiperactivación), y la capacidad de llevar a cabo la reacción acrosómica (Signorelli et al., 2012).

En cuanto a la hiperactivación de los espermatozoides, no hay consenso al respecto de si se trata de un evento que forma parte de la capacitación o si se trata de un proceso independiente que ocurre de forma paralela. Lo que está claro es que se trata de un proceso imprescindible para la fertilización de los ovocitos. Se caracteriza por un incremento en la amplitud del batido flagelar. Estos cambios en la motilidad permiten que los espermatozoides puedan atravesar el útero, los ayudan a nadar a través del moco oviductal y a penetrar la zona pelúcida del ovocito tras la reacción acrosómica.

La capacitación se considera completada cuando los espermatozoides presentan hiperactivación, responden a estímulos quimiotácticos procedentes del ovocito y son capaces de responder a ligandos de la zona pelúcida tras sufrir la reacción acrosómica (De Jonge, 2005; Signorelli et al., 2012; Ferramosca y Zara, 2014 ).

## **6. Melatonina durante la gestación**

La melatonina tiene la capacidad de ejercer efectos protectores sobre la madre y el feto. Se ha demostrado que su síntesis se ve aumentada en la etapa periconcepcional y durante la gestación, ya que en estas etapas hay unos mayores requerimientos de esta molécula (Carlomagno et al., 2011). Se ha observado una marcada ritmicidad en la concentración de melatonina en sangre a lo largo de la gestación, encontrándose hacia el final de la misma un aumento en los niveles de melatonina en sangre, que no es significativo durante el día pero sí durante la noche. En humanos este aumento comienza a ponerse de manifiesto a partir de la semana 24 de gestación y alcanza valores significativamente más altos tras la semana 32. Los niveles normales de no

gestante se recuperan desde el día 2 tras el parto. Los datos indican que el aumento de los niveles de melatonina basales producidos por la glándula pineal durante la gestación son debidos a la melatonina producida en la placenta (Tamura et al., 2014).

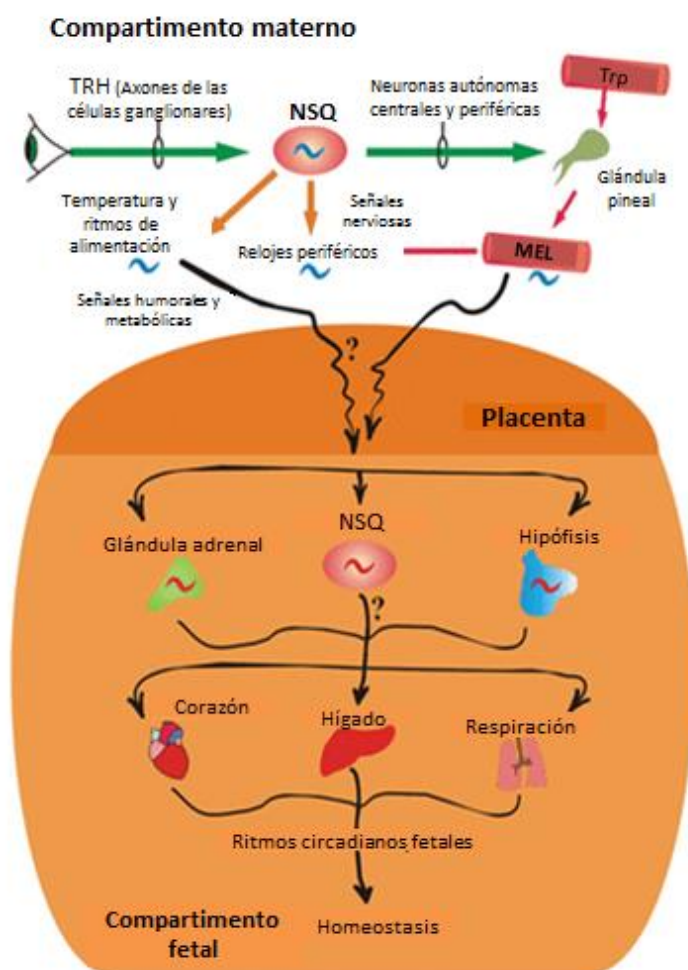
En el feto hay ritmicidad circadiana en procesos fisiológicos como la producción de varias hormonas, el ritmo cardiaco, el comportamiento y el sueño. Estos ritmos están mediados por la melatonina, cuyos receptores se expresan en el cerebro y otras áreas del SNC del feto. Los tejidos periféricos también presentan receptores para melatonina, lo que nos indica su implicación en una gran cantidad de funciones en el desarrollo fetal. Las fluctuaciones diarias de los niveles de melatonina están implicadas en la proliferación de diferentes tipos celulares como osteocitos, osteoblastos, células epiteliales, de la médula ósea, mieloides y eritroides, siendo mayor durante la noche y menor a primeras horas de la tarde. En ratas se demostró que la neurogénesis se ve inhibida en ausencia de un ritmo circadiano de melatonina y en primates se vio que estimula el crecimiento de la glándula adrenal (Tamura et al., 2008).

La principal fuente de melatonina durante la gestación, tanto en la circulación materna como en la fetal, es la glándula pineal materna (Tamura et al., 2008).

### **6.1. Influencia de la melatonina materna sobre los descendientes.**

La organización del sistema circadiano fetal no es muy conocida actualmente. La componente endógena de los sistemas circadianos permite el desarrollo de la ritmicidad en el feto, no obstante la sincronización de los ritmos viene dado por señales controladas por el NSQ materno (Reppert, 1985; Davis y Reppert, 2001; Tamura et al., 2008; Méndez et al., 2012; Serón-Ferré et al., 2012).

La conexión entre los sistemas circadianos de la madre y el feto viene dada por el ritmo materno de melatonina en sangre gracias a su capacidad de atravesar la placenta (Klein, 1972; Reppert et al., 1979; Tamura et al., 2008; Reiter et al., 2013). De este modo el feto es expuesto de forma indirecta a la información de LO (Fig.11).



**Figura 11.** Influencia de la melatonina materna sobre el feto. Tomada de Reiter et al., (2013).

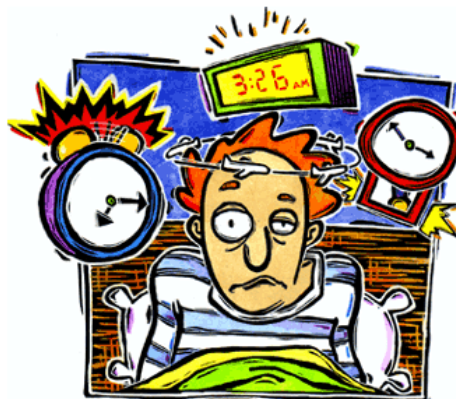
Los órganos fetales funcionan de forma diferente a como lo hacen en la vida adulta, y lo mismo ocurre con los ritmos circadianos. Las oscilaciones que se dan en el NSQ del feto son de menor amplitud que las que se dan en adultos. Hacia el final de la gestación, el NSQ fetal recibe señales nerviosas procedentes del tracto retinohipotalámico, pero hasta después del nacimiento las salidas desde el NSQ hacia la glándula pineal son incompletas, por lo que no acaba produciéndose un ritmo de melatonina (Tamura et al., 2008; Reiter et al., 2013).

En fetos, los relojes circadianos periféricos se desarrollan más temprano que el reloj central. Se ha determinado en ratas que varios órganos fetales se comportan como osciladores periféricos a pesar de que el NSQ aún no sea un reloj funcional (Méndez et al., 2012).

Un órgano clave que orquesta los procesos de maduración en el feto para la transición a la vida extrauterina es la glándula adrenal. La correcta maduración del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal es esencial para conseguir una fisiología normal durante la vida adulta. Tal es su importancia que se ha sugerido que el reloj adrenal es necesario para mantener al resto de relojes periféricos (Méndez et al., 2012). Esto se apoya en la presencia de ritmos de 24 horas de cortisol y de dehidroepiandrosterona sulfato en fetos, ambas hormonas producidas por la glándula adrenal (Serón-Ferré et al., 2001; 2007).

## 7. Cronodisrupción

La cronodisrupción se define como una alteración relevante del orden temporal interno de los ritmos circadianos fisiológicos y conductuales. Es una alteración de la relación de los ritmos circadianos internos y los ciclos ambientales de 24 horas. En nuestra sociedad, la cronodisrupción se produce principalmente por la exposición a luz durante la noche, aunque otras situaciones como el jet-lag, el trabajo a turnos, la ingesta de alimentos durante la noche o la privación de sueño provocan cronodisrupción (Fig.12) (Garaulet et al., 2010; Garaulet y Gómez-Abellán, 2013). En oscuridad continua o con intensidades de iluminación débiles y en ausencia de otros sincronizadores externos los ritmos humanos se dan en forma de curso libre o se desincronizan de un patrón circadiano, de 24 horas (Rajaratnam et al., 2001). Todas estas situaciones se relacionan con un aumento en el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades como cáncer, obesidad, síndrome metabólico, insomnio, trastornos cognitivos y afectivos y envejecimiento prematuro (Garaulet y Gómez-Abellán, 2013).



**Figura 12.** Cronodisrupción. Tomada de <http://blog.ciencias-medicas.com/>

## 7.1.Luz artificial durante la noche

Los humanos somos animales diurnos, es decir, hemos evolucionado para estar activos durante el día y dormir durante la noche. A lo largo de nuestra evolución nunca desarrollamos la capacidad de ver bien en la oscuridad y para corregir este defecto y poder desarrollar actividades durante el mayor tiempo que estamos despiertos hemos creado un ambiente que corrige nuestra relativa ceguera en la oscuridad. La sincronización de muchos de nuestros comportamientos se complementa con nuestro nicho ecológico, con las actividades que llevamos a cabo a lo largo del día, con nuestra homeostasis interna y ayuda a nuestra supervivencia (Fonken y Nelson, 2011). El aumento de las demandas sociales y económicas ha hecho que evolucionemos a una sociedad de 24 horas. Pero este cambio en la sociedad ha superado nuestra capacidad de adaptación ambiental (Rajaratnam y Arendt, 2001).

La invención de la luz eléctrica hace más de un siglo ha supuesto una alteración de la organización temporal mediada por los ciclos de luz natural a los que responden los humanos y otras especies animales. Cada noche nuestras casas, lugares de trabajo y calles se ven iluminadas por la luz eléctrica, cuyo uso cada vez está más extendido (Fig. 13). De forma natural siempre estamos iluminados por las estrellas y la luna, pero la mayoría de la luz a la que nos vemos expuestos por la noche no es natural. El desarrollo urbano ha conducido a la necesidad de luz artificial. Parte de esta luz se dispersa en la atmósfera produciendo una iluminación superior a los niveles basales, es lo que se conoce como contaminación lumínica, que tiene importantes efectos en la vida diaria de las personas, ya que se ve alterado el ambiente natural al que están adaptados los organismos. En 2001 el porcentaje de población mundial expuesta a este tipo de contaminación era del 62%, siendo del 99% en Estados Unidos (EEUU) y la Unión Europea (UE). Además, más del 80% de la población de EEUU y 2/3 de la población de la UE experimentan de forma regular una intensidad lumínica más alta que la máxima de forma natural en las noches de luna llena. El tipo de luz artificial también ha sufrido cambios a lo largo del tiempo, desde una bombilla incandescente con luz amarilla de baja longitud de onda a otras de alta intensidad con longitudes de onda en el espectro azul. No todos los tipos de iluminación ejercen los mismos efectos sobre el sistema circadiano, siendo la luz del espectro azul/violeta la más perjudicial debido a la mayor

sensibilidad de las células ganglionares de la retina a este tipo de luz que a otras, como por ejemplo a la luz roja. La exposición a luz incandescente durante menos de 1h puede producir una disminución del 50% en los niveles de melatonina circulantes mientras que la exposición a niveles incluso más bajos del espectro de luz azul, comparables con el brillo de la luz de la luna, dan lugar a la supresión total de la melatonina en humanos (Navara y Nelson, 2007; Fonken y Nelson, 2011; Dominoni et al., 2013).



**Figura 13.** Contaminación lumínica. Tomada de <http://www.veoverde.com>

Como se ha mencionado anteriormente, la producción de melatonina se da fundamentalmente durante la noche, y esta producción está muy influida por la intensidad de la luz, hasta el punto de poder suprimir por completo la liberación del pico nocturno de melatonina en mamíferos. Incluso intensidades lumínicas muy bajas son capaces de reducir la liberación de melatonina. Además la exposición a largos pulsos de luz durante la noche ejerce efectos más perjudiciales que pulsos cortos de luz, aunque el conocimiento que se tienen sobre el nivel de intensidad lumínica durante la noche que altera la amplitud del ritmo de melatonina y el papel adicional del contraste fótico en la intensidad de la luz entre el día y la noche subjetivos siguen siendo muy pobres (Dominoni et al., 2013).

Los efectos de la exposición a luz sobre los relojes biológicos internos dependen del momento de exposición. El uso de la luz artificial tiene importantes consecuencias sociales, ecológicas, a nivel de comportamiento y de salud, que cada vez están poniéndose más de manifiesto (Fonken y Nelson, 2011). Ha conducido a un profundo cambio en nuestro estilo de vida, aportándonos importantes beneficios tanto a nivel económico, ya que permite la extensión del trabajo que realizamos durante el día a la noche, como a nivel social. Los trabajos a turnos, que implican una alternancia entre el trabajo durante el día y durante la noche, se están viendo aumentados debido a la gran cantidad de beneficios que suponen, tanto a nivel de productividad como de salarios, flexibilidad horaria, capacidad de proveer bienes y servicios las 24 horas del día y la mayor oferta de trabajos.

## **7.2. Influencia de la luz sobre el sistema circadiano**

La exposición a luz durante la noche no solo aporta ventajas, sino que también tiene una gran cantidad de efectos negativos tanto para las personas como para otras muchas especies. Produce la alteración del fotoperiodo medioambiental, lo que afecta al sistema circadiano, ya que se modifica su señal de sincronización más poderosa o Zeitgeber principal: la luz diaria. La fuerza de este sincronizador viene dada por su amplitud y se ve debilitada por la exposición a luz durante la noche, ya que se ve disminuida la diferencia entre la iluminación que hay durante la noche y durante el día (Reiter et al., 2011; Dominoni et al., 2013). Esto hace que se envíe una información errónea al NSQ, de modo que las neuronas reloj dejan de enviar información a los pinealocitos y por tanto cesa la síntesis de melatonina en la glándula pineal. Esto afecta al ritmo circadiano de melatonina, produciendo una disminución de sus niveles durante el periodo en el que deberían ser elevados. El resultado es que las células periféricas van a recibir una información inadecuada del momento del día y de su duración, produciéndose cronodisrupción (Reiter et al., 2011).

La exposición a luz durante la noche, y por tanto la disrupción del marcapasos circadiano, conduce a la desincronización entre los relojes circadianos endógenos y el ciclo natural LO con profundos efectos negativos para procesos fisiológicos como la

reproducción, los patrones de sueño, la ritmicidad de la producción de muchas hormonas, como la corticosterona o la expresión de los genes reloj. Como consecuencia la salud se ve afectada, produciéndose la aparición y el crecimiento de tumores, depresión, cambios de humor y comportamiento debido a alteraciones en el hipocampo, enfermedades gastrointestinales, problemas cardiovasculares, intolerancia lipídica evidenciada por un aumento en la concentración de triacilglicerol, diabetes, cambios en el metabolismo conducentes a un aumento del índice de masa corporal (IMC) debido a la relación entre el metabolismo y el reloj circadiano con la actividad física y la ingesta de alimentos, que se ve alterada por la desincronización de los genes reloj periféricos... (Fonken y Nelson, 2011).

### **7.3.Cronodisrupción y obesidad**

Hay una importante relación entre la cronodisrupción y la obesidad. La cronobiología nos permite dar un nuevo enfoque a la obesidad, ya que nos permite considerar cuáles son los factores implicados en la obesidad y cuando se producen estos factores (Garaulet y Gómez-Abellán, 2013).

Como consecuencia de nuestro estilo de vida actual se está poniendo de manifiesto un importante aumento en el número de personas con obesidad, hasta el punto de convertirse en una nueva epidemia del siglo XXI (Egger y Dixon, 2014). Una de las causas de este aumento es la pérdida de horas de sueño. Dormimos 1,5 horas menos que el siglo pasado y 1/3 de los adultos duermen menos de seis horas al día. Existe una relación entre un sueño inadecuado y alteraciones en las hormonas leptina y grelina, lo que es indicativo de un aumento del apetito. Además un menor número de horas de sueño conduce a un aumento en el tiempo disponible para comer, lo que va a favorecer la ganancia de peso y la obesidad. Además se produce una disminución del gasto de energía, ya que el cansancio es mayor, y cambios en la termorregulación, lo que puede explicar la aparición de obesidad (Garaulet y Gómez-Abellán, 2013).

Estudios recientes muestran que hay una conexión entre la regulación energética y el reloj circadiano y ponen especial énfasis en el momento de la ingesta de alimentos, ya que juega un papel muy significativo en la regulación del peso (Moore, 1996; Lax et al.,



1998; 1999). La melatonina es la responsable del adecuado balance energético. Se encarga de regular el almacenamiento y consumo de energía actuando a nivel del tejido adiposo y como consecuencia interviene en la regulación del peso corporal (Cipolla-Neto et al., 2014).

El trabajo a turnos es considerado un factor de riesgo para la aparición de obesidad. Una serie de estudios muestran que el sobrepeso y la obesidad se dan con mayor prevalencia en trabajadores a turnos que en trabajadores durante las horas del día (van Drongelen et al., 2011; Kim et al., 2013). La obesidad a su vez aumenta el riesgo de enfermedades crónicas, enfermedades gastrointestinales, cardiovasculares, diabetes, varios tipos de cáncer y enfermedades metabólicas (Knutsson, 2003; Wang et al., 2011). Los mecanismos que conectan el trabajo a turnos con los problemas de salud no están claros, pero algunos mediadores pueden ser los cambios en los ritmos circadianos, problemas de sueño, estrés, estilos de vida y cambios en el comportamiento, como en la dieta y el tabaco (Kim et al., 2013).

#### **7.4.Cronodisrupción y reproducción**

La cronodisrupción materna es una señal deletérea para el feto que puede conducir a problemas en la fisiología en la edad adulta. La cronodisrupción durante el embarazo, y en particular la supresión del ritmo de melatonina materno, como consecuencia por ejemplo de la exposición a luz durante la noche, tiene efectos en el desarrollo y en la función adrenal fetal. En primates no humanos se ha demostrado que la exposición materna a luz continua durante la gestación induce la maduración precoz de la glándula adrenal fetal, conduce a la expresión circadiana de los genes reloj fetales en el NSQ y de los genes controlados por los genes reloj y aumenta los niveles en plasma de cortisol en neonatos muy temprano tras el nacimiento (Méndez et al., 2012). En roedores se ha demostrado que cuando se alteran los ritmos circadianos durante el embarazo también se altera el comportamiento de los ritmos postnatales de la descendencia (Reiter et al., 2013).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Justificación**

En la sociedad actual se está poniendo de manifiesto un aumento de los problemas de fertilidad. El ritmo de vida y las condiciones ambientales a las que nos vemos expuestos son factores importantes que condicionan dicho aumento. Uno de estos factores es la exposición a luz nocturna, a la que nos vemos sometidos cada día debido a la luz artificial y al aumento de los trabajos a turnos, que nos obligan a trabajar durante la noche. Estas situaciones generan una disrupción en nuestro sistema circadiano que, entre otros, puede afectar a la funcionalidad del sistema reproductor. El objetivo de este trabajo es imitar, en un modelo animal, las condiciones de vida a las que nos vemos expuestos en la sociedad actual para determinar su efecto sobre la gestación y sobre la descendencia de las madres que se ven sometidas a estas condiciones.

### **Hipótesis**

La hipótesis que planteamos en este trabajo es que la exposición a luz artificial durante la noche afectará al desarrollo de la gestación y al sistema reproductor de la descendencia, siendo por tanto una posible causa de infertilidad. Además nos planteamos que el suplemento con melatonina a las madres expuestas a fotoperiodo alterado puede revertir los efectos asociados a dicha alteración.

Por otro lado, nos planteamos también que la melatonina exógena puede mejorar los parámetros de motilidad espermática.

### **Objetivos**

Para llevar a cabo el estudio los objetivos que nos planteamos son los siguientes:

1. Estudiar la ganancia de peso total de las madres durante la gestación.
2. Estudiar la duración de la preñez.
3. Valorar el momento del día en el que se produjo el parto.

4. Determinar el número de crías nacidas vivas y muertas.
5. Estudiar el peso en el momento del nacimiento de los descendientes y su evolución durante la vida posnatal.
6. Determinar el momento de inicio de la pubertad en las descendientes hembra.
7. Estudiar la ciclicidad estral de las descendientes hembras.
8. Estudiar la glucemia de las descendientes hembra en el periodo juvenil y en la edad adulta.
9. Valorar el peso de la glándula pineal, hipófisis y aparato reproductor de todas las descendientes en el periodo juvenil y en la etapa adulta.
10. Estudiar el efecto de la melatonina sobre la motilidad espermática de los descendientes macho.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Para llevar a cabo el estudio se utilizaron ratas de la cepa Wistar. Se utilizaron un total de 13 hembras y 2 machos. Se dispusieron de forma aleatoria en la misma jaula un macho con dos hembras con el objetivo de conseguir que estas últimas quedaran preñadas. Las ratas tenían libre acceso a la comida y al agua de bebida. Las condiciones ambientales de temperatura fueron constantes ( $T^a$  aproximada de 22°C). Todos los días cada uno de los machos estuvo en una jaula con dos hembras, excepto los fines de semana, que se separaban machos y hembras en jaulas diferentes. Cada día, a las 11.00 horas, se les realizó un frotis vaginal con la ayuda de una punta de pipeta y un chupón de pipeta Pasteur con el objetivo de buscar la presencia de espermatozoides en las hembras, lo cual es indicativo de preñez de la rata. Los fines de semana no se pudieron realizar frotis vaginales y por tanto no se podía garantizar el momento de inicio de la gestación, razón por la cual hembras y machos se separaron durante estos días. Finalmente se consiguió la preñez de nueve de ellas, que se asignaron, también de forma aleatoria, a cada uno de los grupos de estudio. Los grupos de estudio fueron los siguientes:

- Grupo Control (N=3), expuesto a fotoperiodo normal.
- Grupo LL (N=3), expuesto a luz continua, es decir, a 24 horas de luz al día y por tanto a fotoperiodo alterado.
- Grupo LL+MEL (N=3), expuesto a luz continua pero suplementado con una inyección diaria de melatonina.

El resto de hembras que no consiguieron la preñez, así como los machos utilizados, se desecharon. Una vez asignadas a cada uno de los grupos de estudio se expusieron a las condiciones lumínicas correspondientes a dicho grupo. De forma que las ratas del grupo Control se mantuvieron durante toda la gestación en condiciones de fotoperiodo normal (12L:12O), y cada día a las 19:00 horas se les inyectó de forma subcutánea una solución vehículo compuesta de etanol y suero salino al 0,9%. Las ratas del grupo LL quedaron en condiciones de luz continua y al igual que al grupo Control se les inyectó a la misma hora la solución vehículo. Con este grupo expuesto a LL es con el que pretendemos imitar las condiciones a las que muchos individuos se ven

sometidos en la sociedad actual. Por último, las ratas del grupo LL+MEL se mantuvieron en condiciones de luz continua durante toda la gestación y se les inyectó, también a las 19:00 horas la solución de melatonina (250µg/100gr.P.C.). La melatonina se disolvió en 0,1ml de etanol y suero salino al 0,9%. El volumen inyectado en los tres grupos se determinó en función del peso de la rata.

### **Ganancia de peso durante la preñez**

El estudio del peso de las madres a lo largo de la gestación se llevó a cabo desde el día que se encontraron espermatozoides en el frotis vaginal, siendo este considerado día 1 de gestación, hasta el día del parto. La ganancia de peso total durante la gestación se determinó calculando la diferencia entre el peso del último día de gestación y el peso al inicio de la gestación. El peso de las ratas se midió en gramos (g).

### **Duración de la gestación**

Se determinó el número de días que duró la preñez de cada una de las hembras. Las crías se mantuvieron en la misma jaula que su madre durante 21 días. A partir de este día las crías adquieren la capacidad de alimentarse por sí mismas, por lo que se separaron de su madre y entre sí por sexos, quedando en una jaula todos los machos y en otra las hembras.

### **Momento del parto y número de crías**

El día del parto se determinó el momento del día en el que este se produjo, así como el número de crías nacidas vivas y muertas, su peso en gramos y el sexo de las nacidas vivas.

### **Evolución del peso de las descendientes**

Desde el día del nacimiento comenzó a estudiarse la evolución del peso de los descendientes. Esta medida se consideró peso a día 0. A partir de aquí se fue determinando el peso de las crías cada cinco días durante 40 días como máximo en las hembras y 60 días en los machos. La determinación de los pesos hasta día 20 se realizó de todas las descendientes de una misma madre en conjunto, pero a partir del día 21, cuando se separaron de las madres, las determinaciones de los pesos se realizaron diferenciando los pesos de los machos y los de las hembras. En la mitad de los descendientes del total de cada grupo, tanto de machos como de hembras, la evolución

del peso se realizó hasta el día 25 de vida, ya que el sacrificio se llevó a cabo durante el periodo juvenil, en el día 28 de vida.

#### **Momento de inicio de la pubertad:**

A partir del día 30 de vida de las hembras se comenzó a estudiar el día de inicio de la pubertad. Esta determinación se realizó mediante la observación de la presencia o ausencia de apertura vaginal. El día en el que se vio apertura vaginal de las hembras se consideró el día de inicio de la pubertad.

#### **Ciclicidad estral de las hembras:**

Tras la determinación de la apertura vaginal de las hembras se comenzó a estudiar en cada una de ellas la ciclicidad estral mediante la realización de un frotis vaginal, del mismo modo que se ha indicado anteriormente, durante dos semanas.

#### **Determinación de la glucemia en las hembras:**

Una vez finalizada la observación diaria de la ciclicidad estral se midió la glucemia de cada una de las hembras utilizando un glucómetro con tiras comerciales. Se realizó en las hembras descendientes de las madres Control, LL y LL+MEL, en dos fases del desarrollo; periodo juvenil (a los 28 días de edad) y durante la fase adulta (tras haber concluido la observación diaria de la ciclicidad estral). El día anterior a la determinación de la glucemia, las ratas se mantuvieron en ayunas durante 12 horas con acceso al agua “ad libitum”. Tras este tiempo en ayunas se realizó un corte en el extremo de la cola con el objetivo de conseguir una gota de sangre, que fue utilizada para determinar el nivel de glucosa en sangre. El valor obtenido se expresa en mg/dl.

#### **Sacrificio y disección de la glándula pineal, hipófisis y gónadas:**

Las crías, tanto machos como hembras, fueron sacrificadas en dos periodos diferentes: durante el periodo juvenil, a los 28 días, y durante la etapa adulta. Aproximadamente la mitad de machos y de hembras del total de las crías de cada uno de los grupos fueron sacrificados durante el periodo juvenil y la otra mitad durante la edad adulta. El día del sacrificio las ratas fueron anestesiadas con equitesina mediante inyección intraperitoneal. La dosis de equitesina inyectada se determinó en función del peso de la rata, a razón de 0,4ml de equitesina por cada 100g de peso corporal. Una vez anestesiadas se decapitaron con ayuda de una guillotina y se disecaron la glándula

pineal, situada en la parte superior del cerebro, y la hipófisis, situada en la base del cráneo, sobre la silla turca. A continuación se disecaron los ovarios, oviducto y útero en las hembras y los testículos en los machos. Se eliminaron los restos de grasa asociados a los órganos del aparato reproductor femenino. Tras la extracción de todos los órganos indicados se determinó su peso con ayuda de una balanza de precisión.

La edad de sacrificio de las hembras adultas varió, realizándose siempre tras finalizar el estudio de la ciclicidad estral y determinar la glucemia. Además se realizaron frotis vaginales para garantizar que la hembra estaba siempre en diestro en el momento del sacrificio. En el caso de los machos adultos, el sacrificio se realizó entre los 70-80 días.

#### **Efecto de la melatonina sobre la motilidad espermática:**

Ya que no hay ninguna señal que nos indique el inicio de la pubertad en los machos y por tanto no pudo determinarse el momento exacto de inicio de la misma, se estudió si las condiciones a las que se vieron expuestas las madres durante la gestación afecta a la espermatogénesis de los machos descendientes. Para ello se buscó la presencia de espermatozoides en el epidídimo. La presencia de espermatozoides es indicativa de que se ha alcanzado la pubertad en los machos, ya que la espermatogénesis comienza a producirse a partir de este momento. Esta determinación se llevó a cabo en torno a los 80 días de vida de los machos, edad que garantiza la producción de espermatozoides en los machos, ya que en condiciones normales la pubertad comienza en torno a los 60-65 días.

Se realizó además un ensayo para determinar el efecto de la melatonina sobre la calidad espermática, en concreto sobre la motilidad de los espermatozoides. Para realizar este ensayo se aprovechó el momento del sacrificio de los machos adultos para extraer el epidídimo.

Se prepararon previamente tres disoluciones de melatonina a diferentes concentraciones: 0mM, 10mM y 30mM. Para la preparación de las disoluciones se utilizó etanol, necesario para diluir la melatonina, y suero salino al 0,9%.

Se separó la cola del epidídimo y se dispuso en una placa de Petri con 5ml de suero salino al 0,9%. En esta placa y con ayuda de un bisturí y unas pinzas se fragmentó la cola del epidídimo para liberar a los espermatozoides contenidos en él. A

continuación se tomó una muestra y se dispuso en un portaobjetos para observarla al microscopio y garantizar la presencia de espermatozoides y comprobar si eran o no móviles. Una vez que nos aseguramos de la presencia de espermatozoides preparamos cinco placas de Petri con las muestras a estudiar. Cada placa se correspondía con un tiempo de observación de las muestras, siendo estos  $t=0$  minutos,  $t=30$  minutos,  $t=60$  minutos,  $t=90$  minutos y  $t=120$  minutos. Además en cada una de las placas se dispusieron, utilizando una pipeta, 3 gotas de  $75\mu\text{l}$  de la muestra de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo. Sobre la primera de estas gotas se dispuso otra de  $50\mu\text{l}$  que contenía la preparación de  $0\text{mM}$  de melatonina, sobre la segunda se dispuso otra gota de  $50\mu\text{l}$  de la preparación de  $10\text{mM}$  de melatonina y sobre la tercera gota se puso otra de  $50\mu\text{l}$  de la preparación de  $30\text{mM}$  de melatonina. Una vez preparadas las placas se mantuvieron en una estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  y se observaron al microscopio tras el tiempo de incubación correspondiente. La placa de  $t=0$  no se metió en la estufa, sino que representa la observación en el momento de la extracción. Se tomó una muestra de cada una de las gotas, se dispusieron en un portaobjetos y se observaron al microscopio. Se realizó una aproximación del porcentaje de espermatozoides móviles y se discriminó entre el tipo de motilidad de los mismos. Los tipos de motilidad que se discriminaron fueron móviles sin hiperactivación y móviles con hiperactivación. La diferencia entre estos dos tipos de movimiento radica en el batido de la cola, siendo los movimientos de la cola de los móviles con hiperactivación mucho más amplios y enérgicos que los de los móviles sin hiperactivación. Se realizó la misma operación con cada una de las placas tras el tiempo correspondiente en la estufa. La muestra de espermatozoides que se tomó de las placas para su observación al microscopio se recogió siempre de la zona más periférica con el objetivo de recoger el menor número de espermatozoides posibles y facilitar la determinación de los parámetros a estudiar, ya que previamente se determinó que no hay diferencias en dichos parámetros si se toma la muestra de la parte central o de la parte más externa de la gota.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar de la media. Para su cálculo y realización de las gráficas se utilizó el programa Microsoft Excell 2010. El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa SPSS. Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos seguían la distribución



Normal y la prueba de Levene de homogeneidad de varianzas. En los casos en los que se confirmó la normalidad y la homogeneidad de los resultados se llevó a cabo la prueba de Tukey para realizar las comparaciones dos a dos de los grupos estudiados. En los casos en los que no se confirmaron estos requisitos y por tanto no se pudo usar un test paramétrico, se realizó el test de Kruskal-Wallis para determinar si había diferencias entre los tres grupos. En los casos en los que se confirmó la presencia de diferencias, se realizaron las comparaciones dos a dos de los diferentes grupos usando el test U de Mann Whitney. Los niveles de significación utilizados para el análisis de los resultados fueron  $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ .

## **4. RESULTADOS**

### **1. Resultados de las madres durante la gestación**

#### **Ganancia total de peso durante la preñez**

La Figura 14 muestra la ganancia total de peso de las madres gestantes durante la preñez. Las comparaciones realizadas entre los diferentes grupos muestran que no hay diferencias significativas entre ellos en cuanto a la ganancia de peso durante la preñez.

#### **Duración de la preñez**

Respecto a los datos mostrados en la Figura 15, encontramos que la duración de la preñez (en días) en las madres LL fue significativamente mayor que la correspondiente a los grupos Control y LL+MEL ( $p < 0,05$ ).

#### **Momento del día en el que se produjo el parto**

En lo referente al momento del día en el que se produjo el parto, en las madres del grupo Control tuvo lugar en dos de los tres casos durante el día, en torno a las 14.00 horas, mientras que en la tercera madre tuvo lugar durante la noche. En las ratas gestantes del grupo LL+MEL el parto tuvo lugar en todos los casos durante el día, en todos los casos a partir de las 13.00 horas y antes de las 20.00. En las madres del grupo LL el momento del parto de dos de las tres madres fue durante la noche, y en la tercera rata tuvo lugar durante la mañana.

#### **Número de crías nacidas vivas y muertas**

No se encontraron diferencias significativas en cuanto al número de crías nacidas vivas al comparar los diferentes grupos entre sí. En cuanto al número de crías nacidas muertas, encontramos un número significativamente mayor de nacidas muertas en las descendientes de madres LL que en las descendientes de madres Control y LL+MEL ( $P < 0,05$ ). En la Figura 16 se muestran los resultados encontrados en los grupos estudiados para el número de crías nacidas vivas y muertas.

## **2. Resultados de los descendientes**

### **2.1. Resultados de los descendientes en el periodo neonatal e infantil**

#### **Evolución del peso**

En la Figura 17 se recogen los valores medios de peso de los descendientes, tanto machos como hembras, de cada uno de los grupos estudiados, así como las diferencias encontradas entre ellos desde el día del nacimiento hasta los 20 días de vida.

El día del nacimiento los descendientes de madres del grupo LL presentaron un peso significativamente mayor que el de los descendientes de los grupos Control y LL+MEL ( $p < 0,05$ ). A los 5, 10, 15 y 20 días de vida los descendientes de madres LL+MEL presentan un peso significativamente menor que el de los descendientes de los otros dos grupos ( $p < 0,01$ ). (Control: N=38, LL: N=33, LL+MEL=41).

### **2.2. Resultados de los descendientes en el periodo prepuberal y en la edad adulta**

#### **2.2.1. Resultados de las hembras**

##### **Evolución del peso**

En la Figura 18 se muestran los resultados de la evolución del peso desde los 20 días de edad. Las descendientes de madres expuestas a LL presentaron un peso significativamente menor que las descendientes del grupo Control ( $p < 0,01$ ) y significativamente mayor que las del grupo LL+MEL ( $p < 0,05$ ) a los 25 y 35 días. A su vez, las descendientes del grupo LL+MEL presentaron un peso significativamente menor que las descendientes de madres Control ( $p < 0,01$ ) tanto a los 30 como a los 40 días.

La muestra utilizada para el grupo Control osciló entre N=9-15, para el grupo LL entre N=10-20 y para LL+MEL entre N=2-22.

##### **Edad de inicio de la pubertad**

En cuanto a la edad a la que se produjo la apertura vaginal, en la Figura 19 se muestran los resultados encontrados en los diferentes grupos estudiados. La edad a la que se produjo la apertura vaginal en las descendientes de madres LL fue

significativamente mayor que la encontrada en las descendientes de madres del grupo Control ( $p < 0,01$ ).

### **Ciclicidad estral**

Tras realizar los frotis vaginales durante dos semanas a las hembras una vez que alcanzaron la pubertad, encontramos que el 70% de las descendientes del grupo Control ciclaban de forma normal, el 90% de las hembras del grupo LL ciclaban de forma normal y ninguna de las hembras estudiadas del grupo de descendientes de madres tratadas con melatonina ciclaban de forma correcta, presentando estas últimas periodos de estro y proestro más largos de lo normal (Tabla 1). Los resultados de los frotis vaginales se muestran en el Anexo 1 al final del trabajo.

### **Peso de la hipófisis de las hembras**

El peso de la hipófisis de las descendientes de madres del grupo LL+MEL fue significativamente menor que el de las descendientes del grupo LL ( $p < 0,01$ ) y Control ( $p < 0,05$ ) a los 28 días de edad. En cuanto al peso de la hipófisis de las descendientes en la edad adulta no se encontraron diferencias significativas al comparar los grupos estudiados. En la Figura 20 se muestran los resultados encontrados para el peso de la hipófisis en cada uno de los grupos.

### **Peso de la glándula pineal**

En la Figura 21 se muestran los resultados del peso de la glándula pineal de las descendientes. El peso de la glándula pineal fue significativamente mayor en las descendientes del grupo LL que en las descendientes de los grupos Control y LL+MEL ( $P < 0,01$  y  $0,05$ ; respectivamente). En cuanto al peso de la glándula pineal de las descendientes en la edad adulta, tanto la exposición a LL como el tratamiento con melatonina provocaron valores significativamente más elevados que en el grupo Control ( $p < 0,01$ ).

### **Peso de los ovarios**

El peso de los ovarios de las descendientes del grupo LL a los 28 días de edad fue significativamente mayor que en las descendientes del grupo Control ( $p < 0,05$ ). En la edad adulta, el peso de los ovarios de las descendientes de los grupos LL y LL+MEL

fue significativamente mayor que en el grupo Control ( $p<0,01$ ). En la Figura 22 se muestran los resultados del peso de los ovarios en los diferentes grupos estudiados.

### **Peso del oviducto y el útero**

En la Figura 23 se muestra que el peso del oviducto y el útero fue significativamente mayor en el grupo LL que en los grupos Control y LL+MEL a los 28 días de edad ( $p<0,01$ ), mientras que en la edad adulta las diferencias encontradas entre los grupos no fueron significativas.

### **Glucemia**

En la Figura 24 se muestran los resultados encontrados para la glucemia de las hembras en los diferentes grupos estudiados y en los dos periodos del desarrollo. A los 28 días de edad no se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados. Sin embargo, en la edad adulta los niveles de glucosa de las descendientes del grupo LL+MEL fueron significativamente menores que los de las descendientes del grupo Control ( $p<0,05$ ).

## **2.2.2. Resultados de los machos**

### **Evolución del peso**

A los 25 días de edad, los machos descendientes de madres del grupo Control presentaron un peso significativamente mayor que el de los descendientes de madres LL+MEL y LL ( $p<0,01$ ). Además el peso de los descendientes de madres LL es significativamente mayor que el de los descendientes de madres LL+MEL ( $p<0,01$ ).

Los descendientes de madres expuestas a LL presentan un peso significativamente mayor que los descendientes de madres Control y LL+MEL a los 30 y 45 días, mayor que los descendientes del grupo LL+MEL a los 35, 40, 55 y 60 y mayor que los descendientes del grupo Control a los 50 días. A su vez, los descendientes de madres expuestas a LL+MEL presentan un peso significativamente menor que los descendientes del grupo Control a los 30, 35 y 40 días ( $p<0,01$ ).

La muestra utilizada para el grupo Control osciló entre N=8-23, para LL entre N=6-16 y para el grupo LL+MEL entre N=5-19. La Figura 25 muestra los resultados encontrados para la evolución del peso de los machos.

### **Peso de la hipófisis**

En la Figura 26 se muestran los resultados encontrados en cuanto al peso de la hipófisis de los descendientes machos. Se observa que a los 28 días de edad fue significativamente menor en los descendientes del grupo LL+MEL que en los del grupo Control ( $p<0,05$ ). En la fase adulta, el peso de la hipófisis de los descendientes del grupo LL+MEL fue significativamente menor que en los descendientes de los otros grupos estudiados ( $p<0,01$ ).

### **Peso de la glándula pineal**

La Figura 27 muestra que el peso de la glándula pineal de los descendientes machos no se diferencia de forma significativa entre los diferentes grupos estudiados en el periodo juvenil ni en la edad adulta.

### **Peso de los testículos**

El peso de los testículos de los descendientes de madres del grupo LL+MEL, tanto a los 28 días como en la fase adulta, es significativamente menor que en los grupos Control y LL (28 días:  $p<0,01$  y  $0,05$ ; respectivamente. Adultas:  $p<0,01$ ). Los resultados encontrados se muestran en la Figura 28.

### **Efecto de la melatonina sobre la motilidad espermática**

En la Tabla 2 se observa el porcentaje de machos con hiperactivación espermática de cada uno de los grupos para las diferentes concentraciones de melatonina utilizadas. Los resultados encontrados son los siguientes:

Los descendientes de madres del grupo Control en ausencia de melatonina presentaron hiperactivación a  $t=0$  solo en el 12% de los casos, pero tras 30 minutos de incubación este porcentaje aumentó hasta el 25%. Este tipo de batido flagelar se mantuvo solo durante 60 minutos en el 12% de los machos. A 10 y 30mM de melatonina la hiperactivación espermática se observó en el 75% de los machos y, al igual que ocurrió en ausencia de melatonina, tras 30 minutos de incubación esta proporción se aumentó hasta el 87% a 10mM y hasta el 100% a 30mM de melatonina.

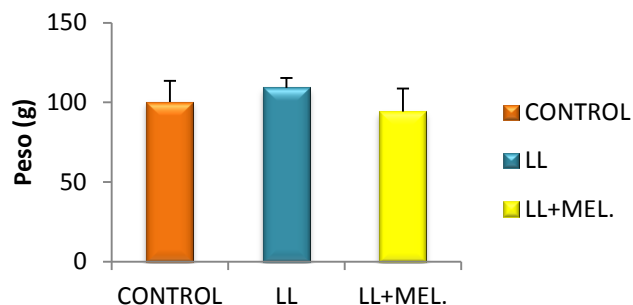
Tras dos horas de incubación siguió observándose hiperactivación en el 75% y el 12% de los machos a 10mM y 30mM, respectivamente.

En el caso del grupo de descendientes de madres expuestas a luz continua, el 100% de los machos presentó espermatozoides con hiperactivación desde  $t=0$  tanto a las diferentes concentraciones estudiadas. En ausencia de melatonina, la hiperactivación se mantuvo en un 71% de los machos hasta los 60 minutos, pero a partir de esta observación dejó de observarse este tipo de motilidad. A 10mM, se mantuvo en el 100% de los machos durante las dos horas, mientras que a 30mM de melatonina tras dos horas siguió observándose este tipo de movimiento, aunque solo en el 43% de los machos.

En cuanto a los descendientes de madres expuestas a LL+MEL, en ausencia de melatonina el 62% de los machos presentó hiperactivación desde  $t=0$ , que se mantuvo en el 87% de los machos durante las dos horas de observación. En la mayoría de los casos se trató de un movimiento de cola claro aunque débil y lento. A 10mM y 30mM de melatonina el 100% de los machos presentaron hiperactivación desde  $t=0$ . Todos ellos la mantuvieron durante 120 minutos a 10mM, mientras que a 30mM se mantuvo en el 87% de los machos. En general, el batido del flagelo fue más intenso en las observaciones a tiempos 30, 60 y 90 minutos.

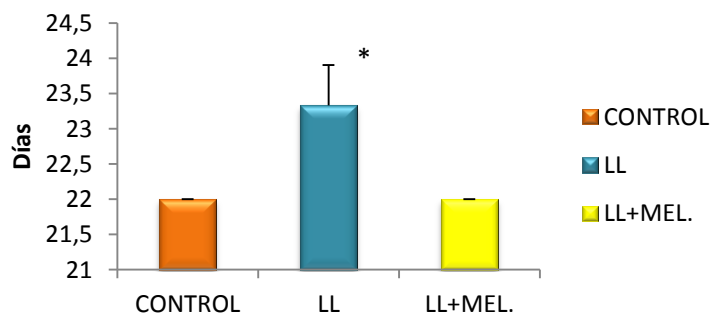
Las Figuras 29, 30 y 31 muestran la proporción de espermatozoides móviles totales (MT) de cada uno de los machos estudiados de los grupos Control, LL y LL+MEL, respectivamente. En todos los casos se observa una proporción mucho más elevada de MT al añadir melatonina a las muestras de espermatozoides. Este efecto se ve tanto a 10mM como a 30mM de melatonina, sin embargo a 10mM la cantidad de MT es mayor que a 30mM prácticamente en todos los casos. Además tienden a permanecer activos durante más tiempo a 10mM que a 30mM. En el Anexo 2 se muestran de forma detallada los porcentajes de MT de cada uno de los machos de los tres grupos a las concentraciones y tiempos estudiados.

## Ganancia de peso durante la preñez



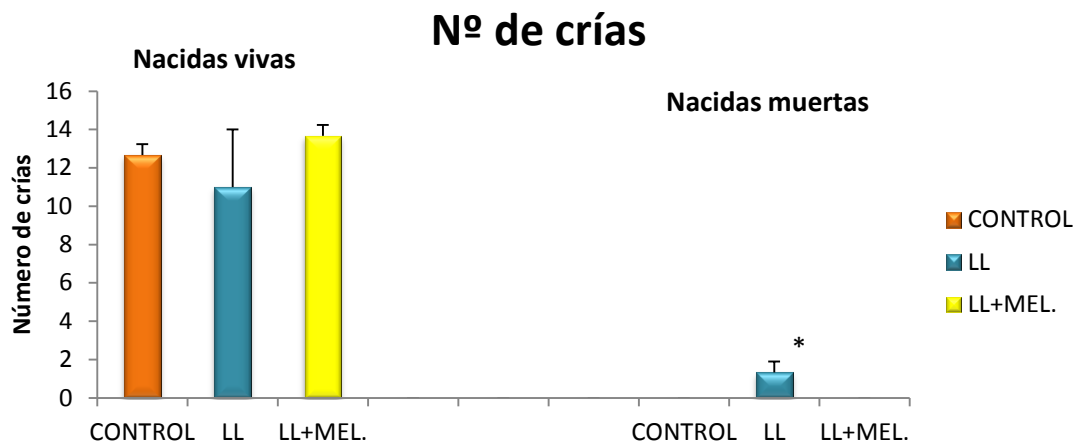
**Figura 14.** Ganancia de peso (g) durante la preñez de madres Control, expuestas a luz continua (LL) durante la noche y LL tratadas con melatonina a lo largo de la gestación (250 $\mu$ g/100g P.C.). Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. (N=3 en todos los grupos).

## Duración de la gestación



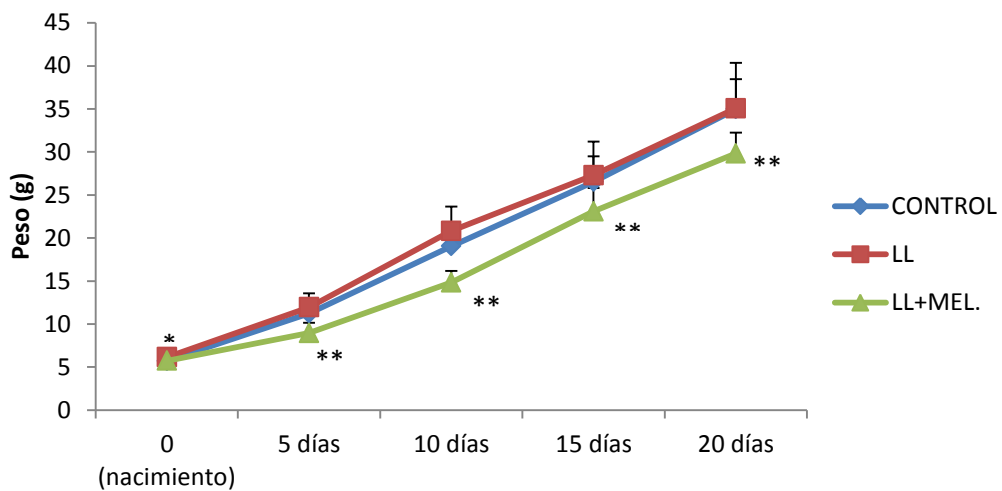
**Figura 15.** Duración de la gestación (días) en madres Control, expuestas a luz continua (LL) durante la noche y LL tratadas con melatonina a lo largo de la preñez (250 $\mu$ g/100g P.C.). Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. (N=3 en todos los grupos). \*: p<0,05 vs. Control y LL+MEL.





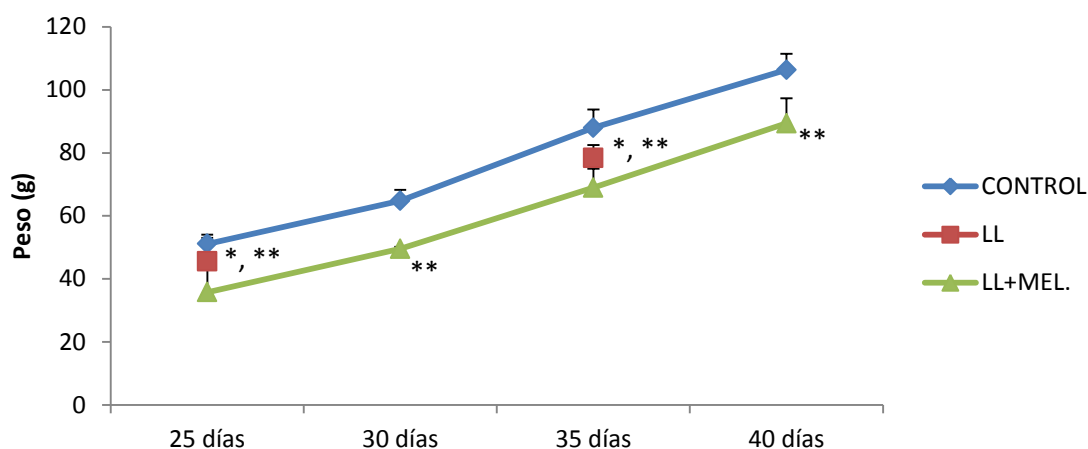
**Figura 16.** Número de crías nacidas vivas y muertas de madres Control, expuestas a luz continua (LL) durante la noche y LL tratadas con melatonina a lo largo de la preñez (250µg/100g P.C.). Los datos representan la media ± desviación estándar de la media. (N=3 en todos los grupos). \*: p<0,05 vs. Control y LL+MEL.

### Evolución del peso de los descendientes



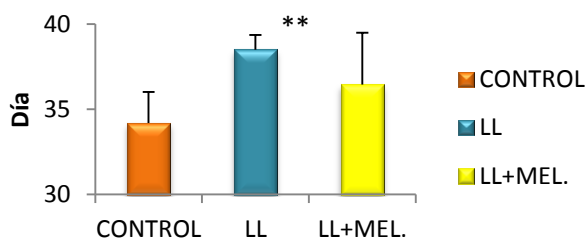
**Figura 17.** Evolución del peso (g) de las descendientes de madres Control, expuestas a luz continua (LL) durante la noche y LL tratadas con melatonina a lo largo de la preñez (250µg/100g P.C.). Los datos representan la media ± desviación estándar de la media. (Control: N=38; LL: N=33; LL+MEL: N=41). \*: p<0,05 vs. Control y LL+MEL; \*\*: p<0,01 vs. Control y LL.

## Evolución del peso de las descendientes (hembras)



**Figura 18.** Evolución del peso (g) de las hembras descendientes de madres Control, expuestas a luz continua (LL) durante la noche y LL tratadas con melatonina a lo largo de la preñez (250µg/100g P.C.). Los datos representan la media ± desviación estándar de la media. (Control: N=9-15; LL: N=10-20; LL+MEL: N=2-22). 25 y 35 días, \*: p<0,05 vs. LL+MEL, \*\*: p<0,01 vs. Control; 30 y 40 días, \*\*: p<0,01 vs. Control.

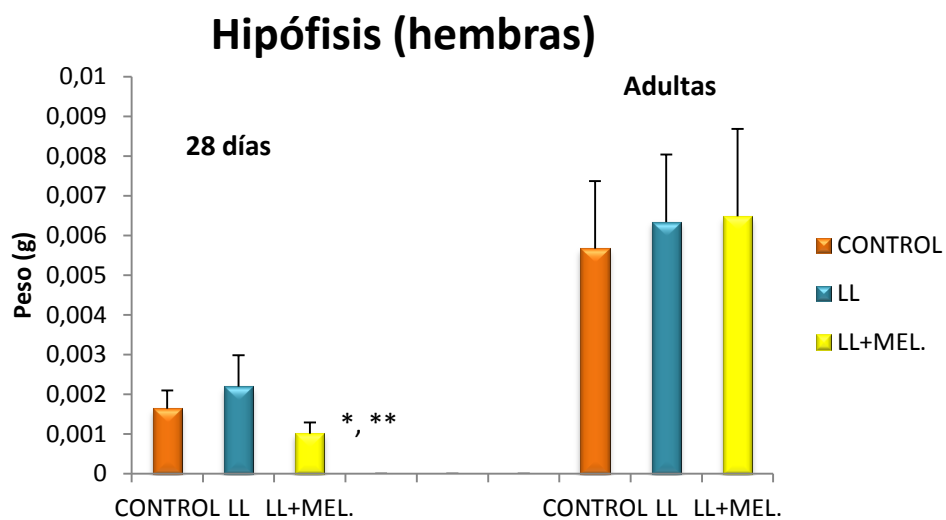
## Edad de la apertura vaginal



**Figura 19.** Edad de inicio de la pubertad de las descendientes de madres Control, expuestas a luz continua (LL) durante la noche y LL tratadas con melatonina a lo largo de la preñez (250µg/100g P.C.). Los datos representan la media ± desviación estándar de la media. (Control: N=10, LL: N=11, LL+MEL: N=10). \*\*: p<0,01 vs. Control.

**Tabla 1.** Porcentaje de hembras que ciclan de forma adecuada en cada uno de los grupos estudiados. (Control: N=10; LL: N=10; LL+MEL: N=6).

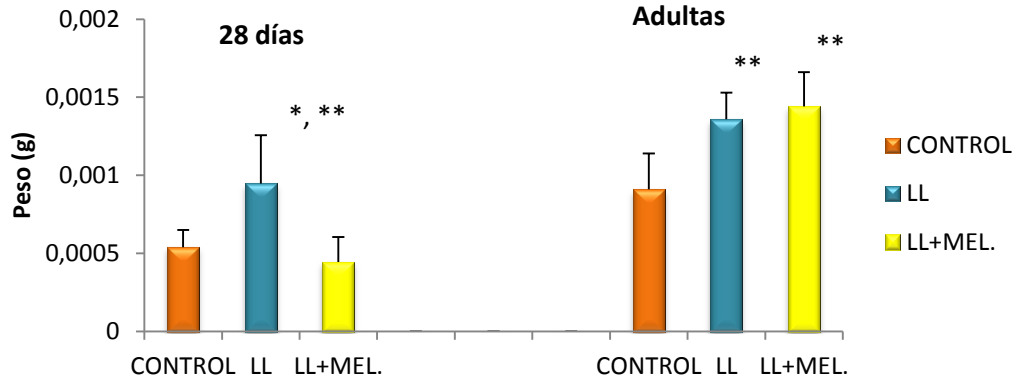
	<b>Hembras cíclicas (%)</b>
<b>Control</b>	70
<b>LL</b>	90
<b>LL+MEL</b>	0



**Figura 20.** Peso (g) de la hipófisis de las descendientes de madres Control, expuestas a luz continua (LL) durante la noche y LL tratadas con melatonina a lo largo de la preñez (250µg/100g P.C.). Los datos representan la media ± desviación estándar de la media. (28 días: Control: N=5, LL: N=11, LL+MEL: N=9. Adultas: Control: N=10, LL: N=11, LL+MEL: N=9).

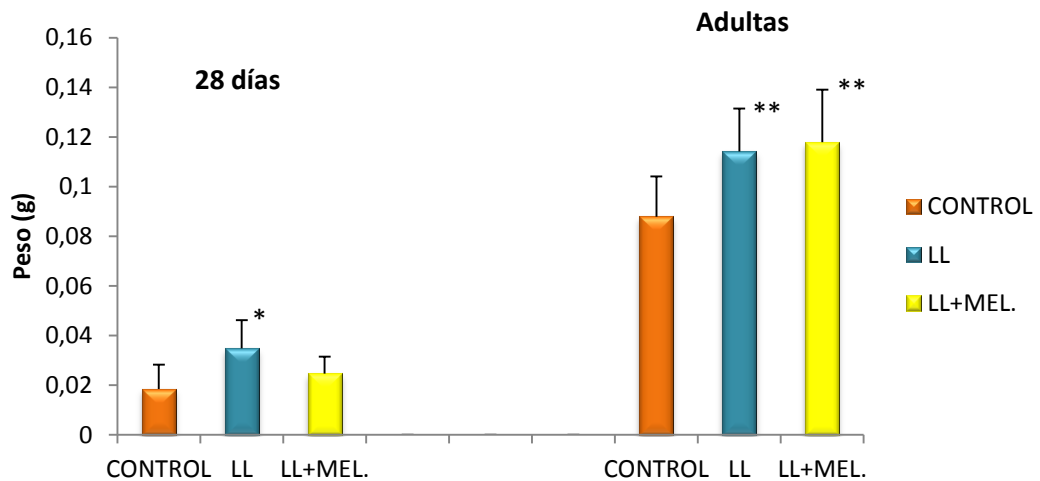
\*:  $p < 0,05$  vs. Control; \*\*:  $p < 0,01$  vs. LL.

## Glándula pineal (hembras)

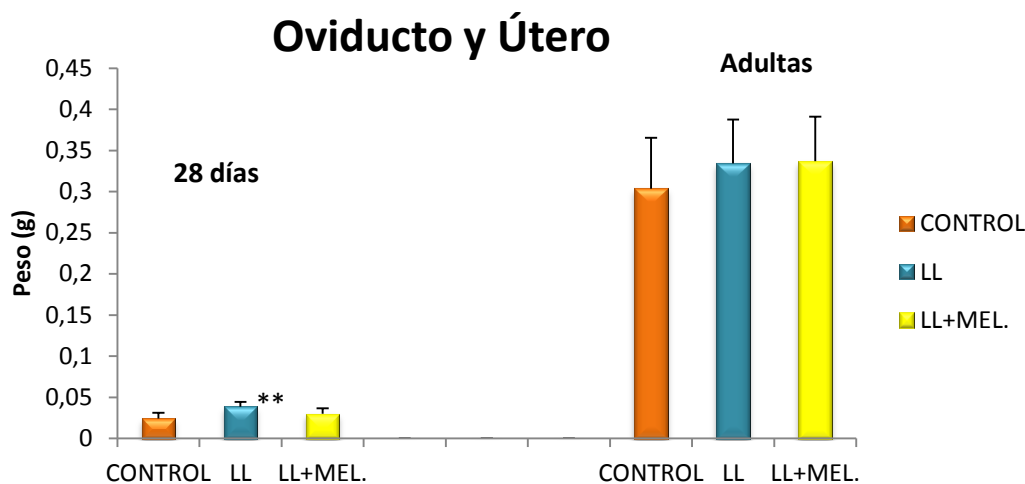


**Figura 21.** Peso (g) de la glándula pineal de las descendientes de madres Control, expuestas a luz continua (LL) durante la noche y LL tratadas con melatonina a lo largo de la preñez (250µg/100g P.C.). Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. (28 días: Control: N=5, LL: N=11, LL+MEL: N=9. Adultas: Control: N=10, LL: N=11, LL+MEL: N=11). 28 días, \*:  $p < 0,05$  vs. LL+MEL; \*\*:  $P < 0,01$  vs. Control. Adultas, \*\*:  $p < 0,01$  vs. Control.

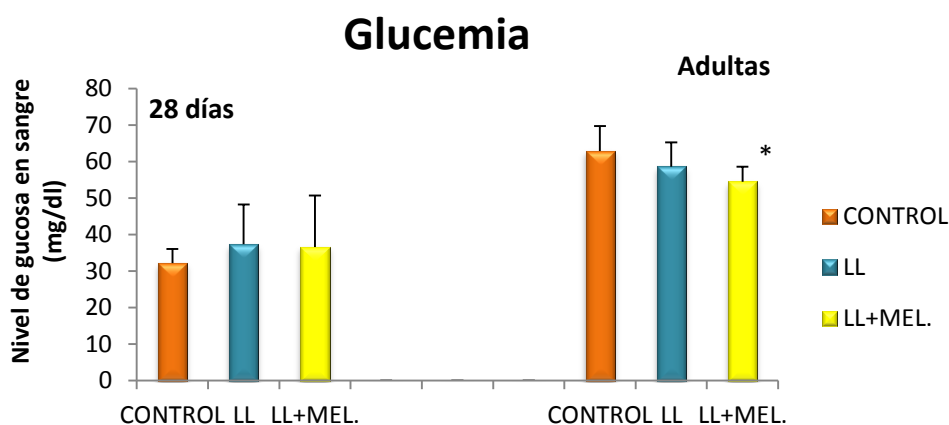
## Ovarios



**Figura 22.** Peso de los ovarios (g) de las descendientes de madres Control, expuestas a luz continua (LL) durante la noche y LL tratadas con melatonina a lo largo de la preñez (250µg/100g P.C.). Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. (28 días, Control: N=5, LL: N=11, LL+MEL: N=9. Adultas, Control: N=10, LL: N=11, LL+MEL: N=11). 28 días, \*:  $p < 0,05$  vs. Control. Adultas, \*\*:  $p < 0,01$  vs. Control.

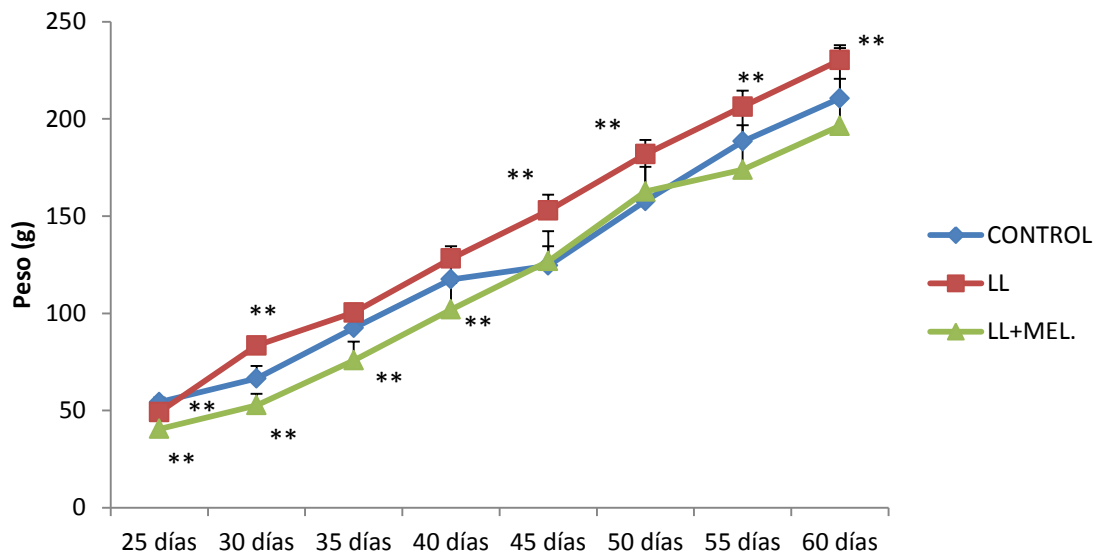


**Figura 23.** Peso del oviducto y útero (g) de las descendientes de madres Control, expuestas a luz continua (LL) durante la noche y LL tratadas con melatonina a lo largo de la preñez (250µg/100g P.C.). Los datos representan la media ± desviación estándar de la media. (28 días, Control: N=5, LL: N=11, LL+MEL: N=9. Adultas, Control: N=10, LL: N=11, LL+MEL: N=11). 28 días, \*\*: p<0,01 vs. Control y LL+MEL.



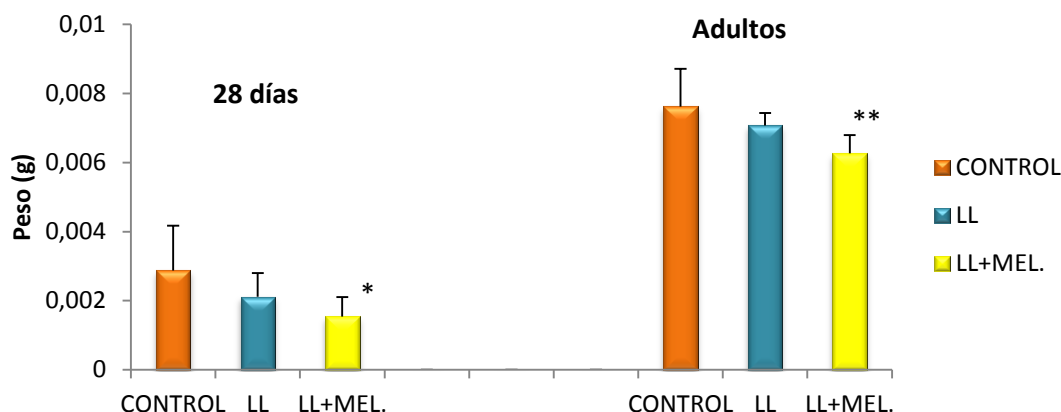
**Figura 24.** Glucemia (mg/dl) de las descendientes de madres Control, expuestas a luz continua (LL) durante la noche y LL tratadas con melatonina a lo largo de la preñez (250µg/100g P.C.). Los datos representan la media ± desviación estándar de la media. (28 días, Control: N=5, LL: N=9, LL+MEL: N=11. Adultas, Control: N=10, LL: N=10, LL+MEL: N=11). \*: p<0,05 vs. Control.

## Evolución del peso de los descendientes (machos)



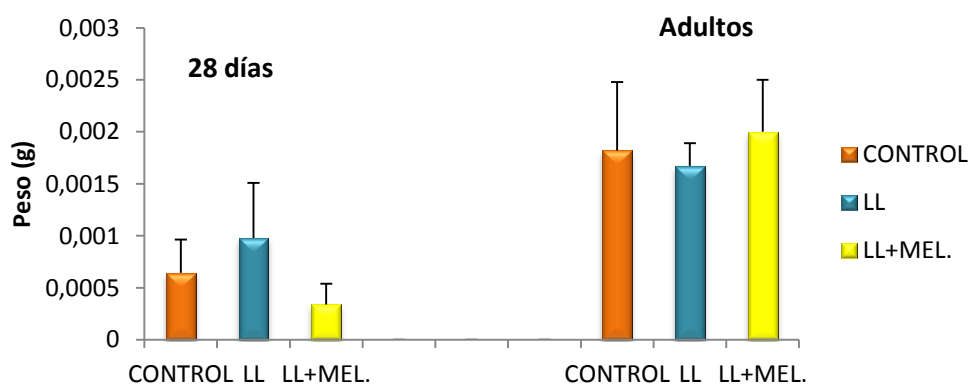
**Figura 25.** Evolución del peso (g) de los machos descendientes de madres Control, expuestas a luz continua (LL) durante la noche y LL tratadas con melatonina a lo largo de la preñez ( $250\mu\text{g}/100\text{g P.C.}$ ). Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. (Control: N=8-23, LL: N=6-16, LL+MEL: N=5-19). 25 días, \*\*:  $p < 0,01$  LL vs. Control; y LL+MEL vs. Control y LL. 30 días, \*\*:  $p < 0,01$  LL vs. Control y LL+MEL; y LL+MEL vs. Control. 35 y 40 días, \*\*:  $p < 0,01$  LL+MEL vs. Control y LL. 45 días, \*\*:  $p < 0,01$  vs Control y LL+MEL. 50 días, \*\*:  $p < 0,01$  vs Control. 55 y 60 días, \*\*:  $p < 0,01$  vs. LL+MEL.

## Hipófisis (machos)

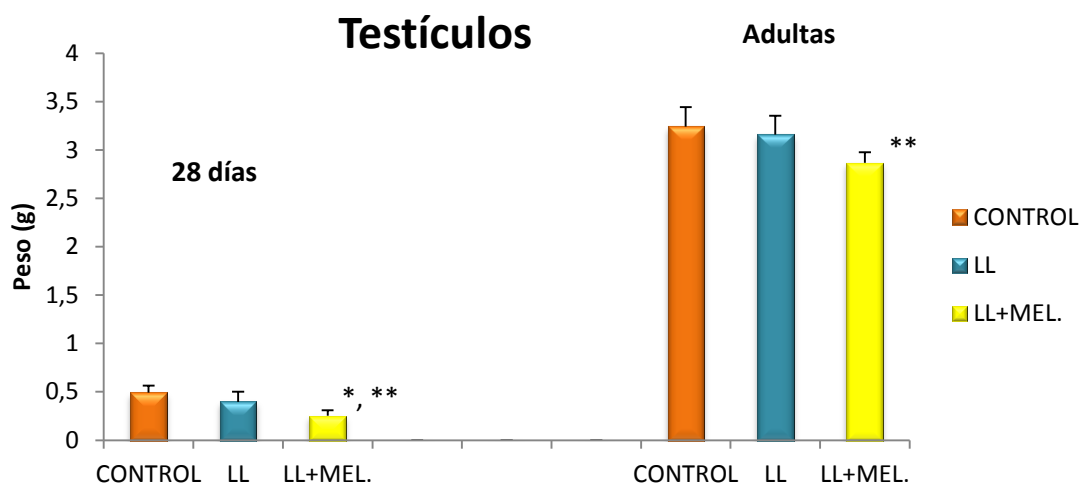


**Figura 26.** Peso de la hipófisis (g) de los machos descendientes de madres Control, expuestas a luz continua (LL) durante la noche y LL tratadas con melatonina a lo largo de la preñez (250 $\mu$ g/100g P.C.). Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. (28 días, Control: N=4, LL: N=6, LL+MEL: N=9. Adultas, Control: N=16, LL: N=7, LL+MEL: N=10). 28 días, \*:  $p < 0,05$  vs. Control. Adultas, \*\*:  $p < 0,01$  vs. Control y LL.

## Glándula pineal (machos)



**Figura 27.** Peso (g) de la glándula pineal de los machos descendientes de madres Control, expuestas a luz continua (LL) durante la noche y LL tratadas con melatonina a lo largo de la preñez (250 $\mu$ g/100g P.C.). Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de la media. (28 días, Control: N=7, LL: N=6, LL+MEL: N=9. Adultas: Control: N=16, LL: N=7, LL+MEL: N=10).

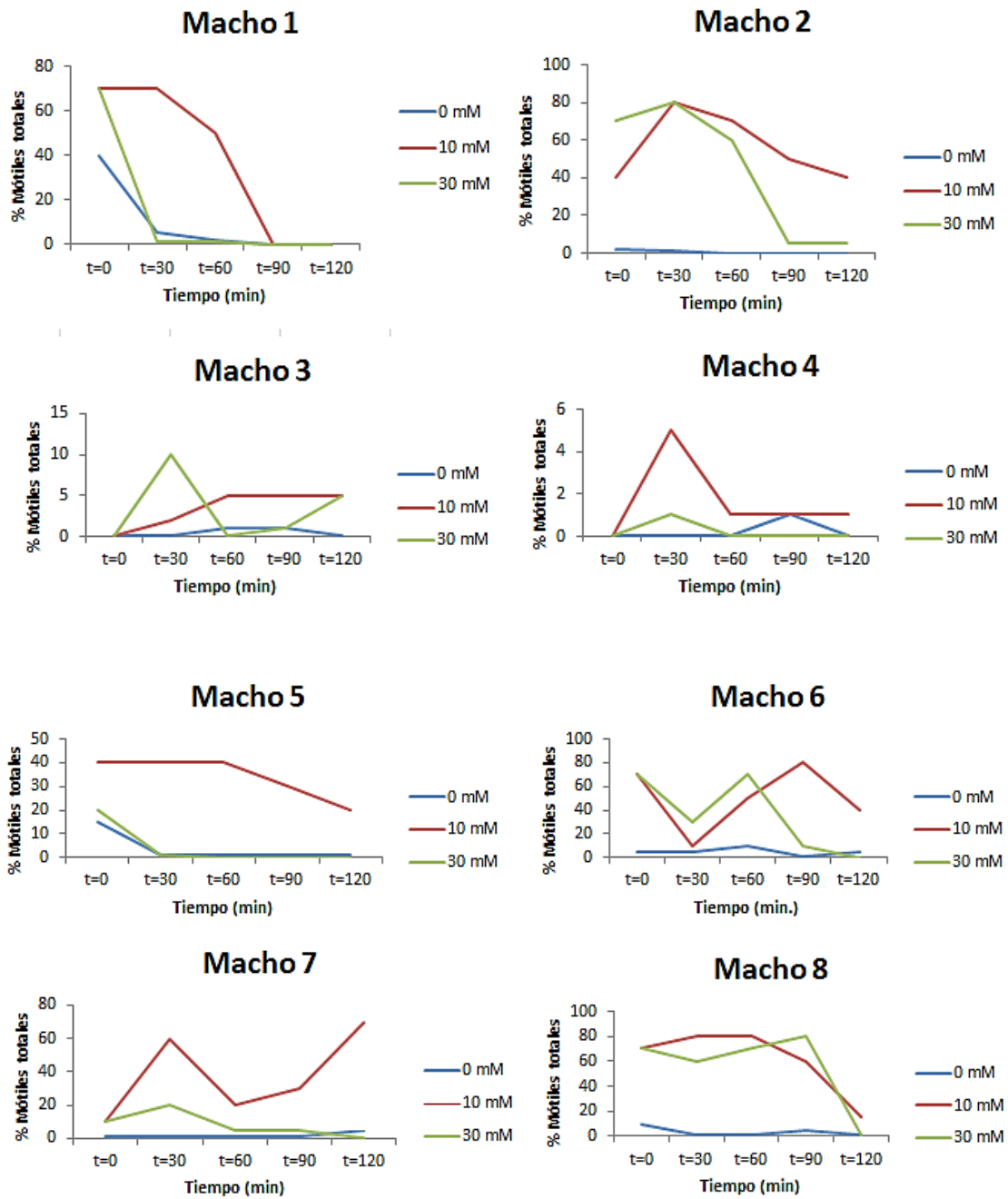


**Figura 28.** Peso (g) de los testículos de los descendientes de madres Control, expuestas a luz continua (LL) durante la noche y LL tratadas con melatonina a lo largo de la preñez (250µg/100g P.C.). Los datos representan la media ± desviación estándar de la media. (28 días, Control: N=7, LL: N=6, LL+MEL: N=9. Adultos, Control: N=16, LL: N=7, LL+MEL: N=10). 28 días, \*: p<0,05 vs. LL; \*\*: p<0,01 vs. Control. Adultos, \*\*: p<0,01 vs. Control y LL+MEL.

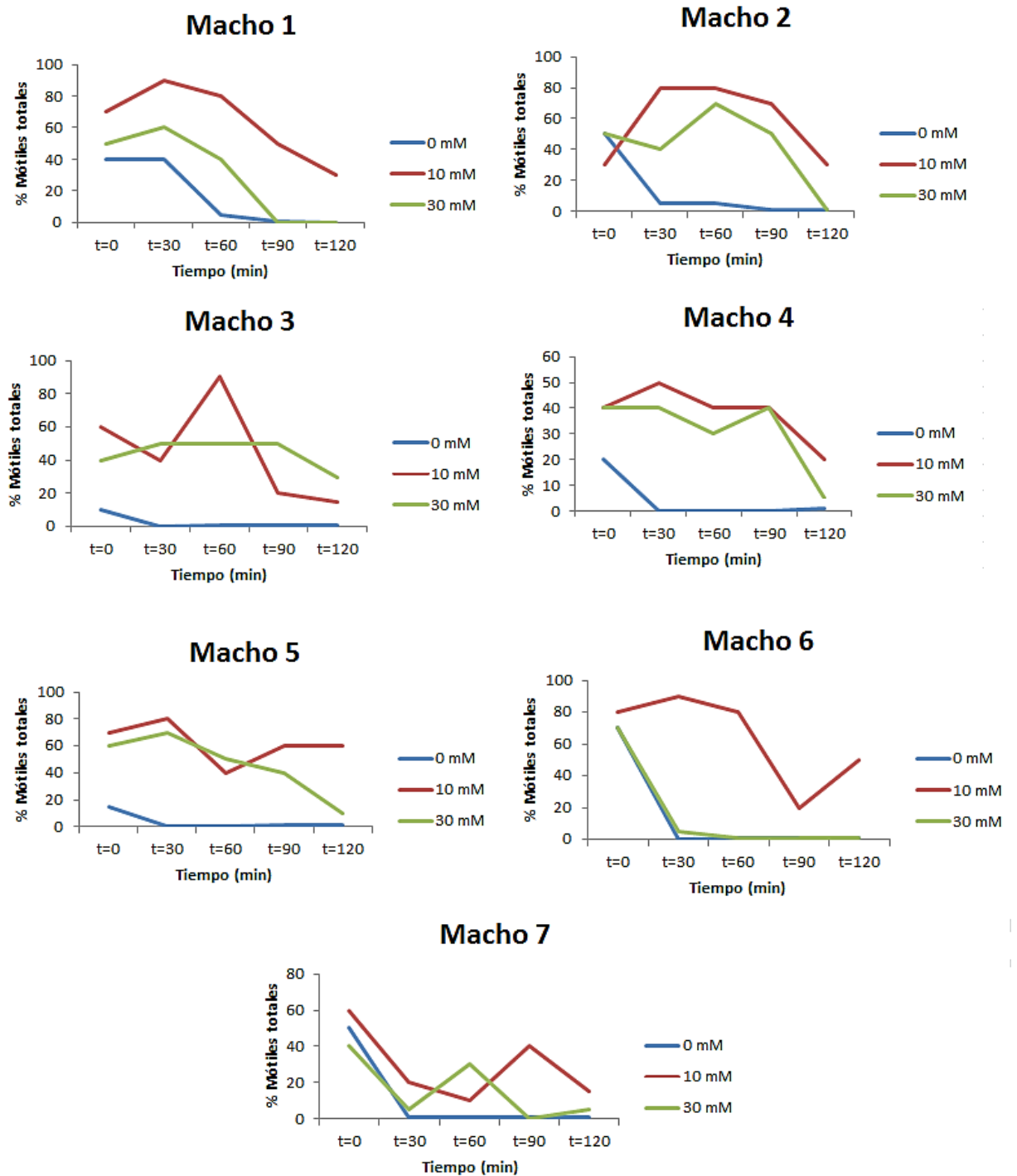
**Tabla 2.** Porcentaje de machos que presentan hiperactivación de la motilidad espermática a las concentraciones de melatonina estudiadas (0mM, 10mM y 30mM) durante dos horas (tiempos de observación: t=0 minutos, t=30 minutos, t=60 minutos, t=90 minutos y t=120 minutos).

	Concentración	Machos con hiperactivación (%)				
		t=0	t=30	t=60	t=90	t=120
CONTROL	0mM	12,5	25	12,5	0	0
	10mM	75	87,5	87,5	75	75
	30mM	75	100	50	50	12,5
LL	0mM	100	42,85	71,42	0	0
	10mM	100	100	100	100	100
	30mM	100	100	85,71	57,14	42,85
LL+MEL	0mM	62,5	37,5	50	37,5	87,5
	10mM	100	100	100	100	100
	30mM	100	75	37,5	25	87,5

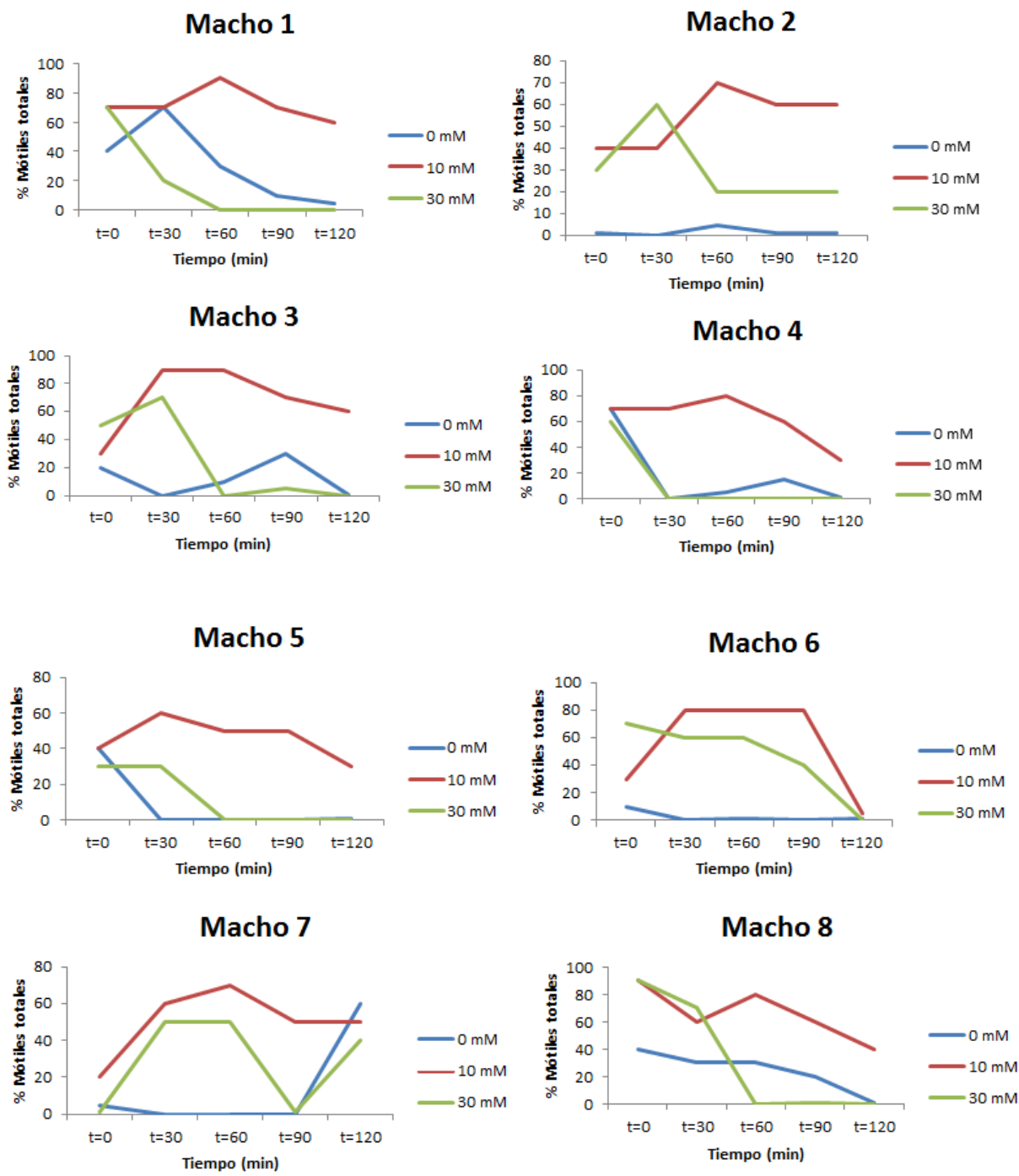




**Figura 29.** Porcentaje de espermatozoides m3viles totales de los machos descendientes del grupo Control a las diferentes concentraciones (0mM, 10mM y 30mM) y tiempos estudiados (t=0, t=30, t=60, t=90, t=120 minutos).



**Figura 30.** Porcentaje de espermatozoides m3viles totales de los machos descendientes del grupo LL a las diferentes concentraciones (0mM, 10mM y 30mM) y tiempos estudiados (t=0, t=30, t=60, t=90, t=120 minutos).



**Figura 31.** Porcentaje de espermatozoides mótiles totales de los machos descendientes del grupo LL+MEL a las diferentes concentraciones (0mM, 10mM y 30mM) y tiempos estudiados (t=0, t=30, t=60, t=90, t=120 minutos).

## **5. DISCUSIÓN**

La exposición a luz artificial durante la noche da lugar a una mayor ganancia de peso, mientras que el tratamiento con melatonina exógena conduce a una menor ganancia. Esto nos muestra la importancia de la melatonina en la regulación del peso corporal durante la gestación, ya que en una situación en la que carecemos de síntesis rítmica de melatonina hay un mayor aumento de peso que en condiciones normales. Nuestros resultados coinciden con los de trabajos realizados previamente por otros autores, también en rata, en los que se muestra que la ausencia de melatonina conduce a una mayor ingesta de alimentos que justificaría el aumento en dicha ganancia (Wolden-Hanson et al., 2000). Es necesario que los niveles de melatonina circulantes sean los adecuados para que se produzca en el organismo un metabolismo energético eficiente, por lo que en situaciones en las que se produce exposición a luz continua, como es nuestro caso, se favorece una mayor ganancia de peso. Además vemos en la melatonina exógena el efecto contrario, dificultando dicha ganancia.

Varios estudios muestran que el aumento de peso como consecuencia de la exposición a luz nocturna puede ser normalizado por el tratamiento con melatonina (Mendes et al., 2013) de forma independiente de las condiciones ambientales a las que se vean sometidos los individuos tratados. Incluso se ha demostrado que cuando los individuos dejan de tomar melatonina vuelven a recuperar su peso, y viceversa (Wolden-Hanson et al., 2000). En nuestro trabajo, los resultados obtenidos apoyan a los citados anteriormente, ya que el tratamiento con melatonina a lo largo de la preñez a las madres expuestas a luz durante la noche revierte el aumento en la ganancia, siendo de hecho las gestantes de este grupo quienes menos peso ganan durante la gestación.

La exposición a luz nocturna aumenta el riesgo de parto prematuro. Numerosos estudios llevados a cabo, sobre todo en trabajadoras a turnos, por otros autores, muestran un adelanto en el momento del parto como consecuencia de la exposición a un fotoperiodo alterado (Armstrong et al., 1989). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran, al contrario que los anteriores, que la exposición a luz continua produce un retraso en el día del parto. Estos contrastes pueden ser debidos a diferencias en el diseño experimental, ya que en nuestro caso la exposición a luz artificial fue

permanente durante toda la preñez. En este sentido Zhu et al. (2004) encontraron que en trabajadoras nocturnas permanentes el parto se retrasaba hasta la semana 41 de gestación. La situación de las trabajadoras del trabajo de Zhu es más parecida a las condiciones a las que estaban expuestas las madres gestantes de nuestro trabajo (luz continua, las 24 horas del día) que las de los trabajos anteriormente citados, ya que en la mayoría de los casos las trabajadoras a turnos alternan el trabajo en turnos de noche y de día. La duración de la gestación en el grupo LL+MEL fue idéntica a la del grupo Control, lo que nos indica que el tratamiento con melatonina revierte los efectos que la exposición a luz continua tiene sobre la duración de la gestación. Igualmente, en roedores, tampoco se encontraron diferencias significativas en la duración de la gestación entre el grupo control y el grupo tratado con melatonina (Domínguez Rubio et al., 2013).

La exposición a un fotoperiodo alterado conduce a una disminución en el tamaño de la camada. Sin embargo, está demostrado que el tratamiento con melatonina da lugar a un número de crías que no se diferencia del encontrado en condiciones naturales (Mousa-Balabel y Mohamed, 2011). En el presente trabajo la tendencia que muestran los datos es comparable a los resultados encontrados en otros estudios, ya que observamos que el número de crías nacidas vivas de madres LL es menor que en los otros dos, mientras que el tratamiento con melatonina corrige esta situación. De hecho, el tamaño de la camada es mayor en el grupo LL+MEL que en el grupo Control.

En cuanto al número de crías nacidas muertas, hay estudios que muestran que la cronodisrupción aumenta el riesgo de aborto, muchos de estos estudios se han llevado a cabo en trabajadoras a turnos, y en ellos se pone de manifiesto una alta tasa de aborto (McDonald et al., 1988). En nuestro caso no se produjo muerte de las crías en los grupos Control y LL+MEL, mientras que en el grupo LL sí que se encontraron crías nacidas muertas. Si bien el tratamiento con melatonina al que sometimos a las madres del grupo LL+MEL fue capaz de corregir los efectos sobre la mortalidad asociados a la exposición a luz continua, aunque es importante indicar que esto no siempre es así debido al efecto bifásico que presenta la melatonina y que fue puesto de manifiesto por Singh et al., (2013), donde apuntaron que los efectos de la melatonina sobre la mortalidad de las crías era debida a las concentraciones usadas. En función de la dosis de melatonina utilizada sus efectos sobre el tamaño de la camada y la mortalidad varían

(Singh et al., 2013). Es sabido que la exposición a luz continua afecta a la tasa de implantación, mientras que el tratamiento con melatonina restaura esta situación y además favorece el desarrollo embrionario temprano (Ishizuka et al., 2000). Además hay que tener en cuenta que el fotoperiodo afecta a la tasa de ovulación y a su vez esto se relaciona con el número de crías (Mousa-Balabel y Mohamed, 2011).

El desencadenamiento del parto presenta un fuerte carácter rítmico. La exposición a luz durante las horas de la noche hace que este carácter rítmico se pierda, pudiendo producirse en cualquier momento del día, mientras que la melatonina exógena favorece el ritmo circadiano del momento del parto.

A lo largo de la evolución humana la mayor probabilidad de supervivencia tanto de las madres como de las crías ha conducido a la producción del parto durante la noche, momento en el que la presión de depredación era la más baja (Reiter et al., 2013). Un comportamiento similar se ha encontrado en otras especies, como la rata (Lincoln y Porter, 1976). Si bien, esta ritmicidad circadiana en el momento de producirse el parto se está viendo seriamente afectada como consecuencia del mal uso que estamos haciendo de la luz durante la noche, ya que el fotoperiodo es un importante factor en el control del momento del parto (Golombek et al., 2013). En humanos el momento más frecuente de producirse el parto es durante las últimas horas de la noche y primeras horas del día, mientras que en la rata el momento de producirse el parto es durante el día subjetivo, incluso en las situaciones en las que hay alteraciones en el ciclo LO (Tamura et al., 2008). En mamíferos el ritmo circadiano del parto se sincroniza en su fase nocturna o diurna adecuada gracias al NSQ (Olcese, 2012). La eliminación del ritmo de melatonina endógeno afecta al momento en el que se desencadena en parto, que en rata debe ser durante el día. Sin embargo, se ha visto que la suplementación con melatonina en las últimas horas de la tarde es capaz de restaurar el momento del parto (Takayama et al., 2003; Olcese, 2012). Nuestros resultados apoyan estos datos, ya que el parto de las hembras del grupo Control se produjo en general durante el día. Por el contrario, en las madres expuestas a LL esta ritmicidad se vio alterada, produciéndose en la mayoría de los casos el parto durante la noche. Además en el grupo de madres expuestas a LL y tratadas con melatonina el ritmo del parto se normalizó, produciéndose en todos los casos durante las horas del día. Varios autores han estudiado el efecto de la melatonina sobre el momento del parto y han mostrado que ejerce su efecto actuando de

forma local a nivel de sus receptores de membrana presentes en las células miometriales uterinas (Zhao et al., 2002). La vía de señalización intracelular que activa la melatonina es la misma que la activada por la oxitocina, de modo que actúan de forma sinérgica (Sharkey et al., 2009; 2010). La melatonina actúa favoreciendo las contracciones uterinas, aumentando su intensidad y sensibilizando al útero a la oxitocina (Olcese, 2012; Olcese et al., 2013). La exposición a luz nocturna hace las contracciones uterinas sean mucho más débiles (Revell y Skene, 2007; Reiter et al., 2013).

Respecto al peso de los descendientes, la exposición a luz continua durante la gestación conduce a un aumento en el peso de los descendientes al nacer, que no se corresponde con los resultados encontrados por otros autores, ya que muestran que la exposición a luz artificial durante la noche provoca un menor peso en el momento del nacimiento (Amaral et al., 2014). La melatonina administrada a las madres expuestas a LL durante la gestación hace que el peso de los descendientes al nacer se normalice y alcance valores similares a los del grupo Control. Dicha normalización fue recientemente descrita por Singh et al. (2013), en un estudio muy similar al nuestro, en el que no hallaron diferencias significativas en los pesos de las crías al nacer de los grupos Control y las madres tratadas con melatonina.

Estos resultados nos hacen pensar que la exposición a luz artificial durante la noche no solo afecta a la ganancia de peso de los individuos expuestos a ella, sino que también afecta a la evolución del mismo durante la vida fetal, produciendo un aumento en el peso de los descendientes de madres expuestas a estas condiciones, ya que, como ya hemos mencionado, el número de crías nacidas en el grupo LL fue menor que el encontrado en los otros dos grupos, por lo que cabría esperar que la ganancia de peso de las madres durante la gestación también fuera menor en este grupo que en el resto. Sin embargo la ganancia de peso de las madres durante la gestación fue mayor en las expuestas a LL, lo que se corresponde con el mayor peso de las descendientes y no con el número de crías.

Si nos fijamos en la evolución del peso de los descendientes hasta los 20 días de edad observamos un cambio en el comportamiento de los descendientes de madres expuestas a luz continua durante la gestación, ya que tanto la ganancia de peso de las madres durante la gestación como su peso al nacer fue significativamente mayor que en

los otros dos grupos. Sin embargo durante el periodo infantil y juvenil el efecto de la luz artificial durante la noche deja de ponerse de manifiesto, ya que la evolución de su peso no se diferencia del grupo Control. El tratamiento con melatonina, sin embargo, sí afecta durante estas fases del desarrollo, reflejándose su influencia en un menor peso corporal, coincidiendo de nuevo con los resultados de Singh et al., (2013). Si bien, no valoramos la ingesta de alimento, parece que esta influencia de la melatonina se ejerce sin afectar a la ingesta de alimento (Wolden-Hanson et al., 2000; Prunet-Marcassus et al., 2003; Terrón et al., 2013; Depner et al., 2014).

Al estudiar la evolución del peso de los descendientes macho hasta los 60 días de edad, observamos un cambio en el comportamiento justo a partir de los 20 días, donde de nuevo la cronodisrupción vivida por la madre durante la gestación provoca en los descendientes de madres expuestas a LL el mayor peso, mientras que en general en todos los periodos de edad estudiados el grupo que menos peso consiguió fue LL+MEL. Los grupos LL+MEL y LL se comportan de acuerdo a lo referido en la bibliografía citada previamente, donde se muestra que la exposición a luz durante la noche da lugar a una mayor ganancia de peso y el tratamiento con melatonina disminuye dicha ganancia (Amaral et al., 2014).

En el caso de las hembras encontramos el menor peso en el grupo tratado con melatonina, al igual que en los machos. Sin embargo, a diferencia de lo observado en los machos, las descendientes de madres expuestas a luz continua no muestran un peso mayor que el grupo Control. Este comportamiento difiere de lo encontrado en estudios sobre trabajadores a turnos citados anteriormente, en los que hay una mayor ganancia de peso que en trabajadores durante el día (lo que puede ser debido a los factores sociales que entran en juego al trabajar con humanos y que no se dan en trabajos con animales, como puede ser la ingesta de alimentos durante el tiempo que están despiertos por la noche, que no ocurre en animales) o en otros estudios llevados a cabo en ratas jóvenes en los que no hay diferencias en la evolución del peso entre ratas control y tratadas con melatonina (Díaz et al., 2001). Además, la contaminación lumínica supone una fuente de estrés, que a su vez es una importante causa de ganancia de peso. Si bien, no todos los tipos de estrés afectan al peso del mismo modo, e incluso se observan efectos diferentes en función del sexo (García-Cáceres et al., 2010). La función metabólica de los descendientes se ve afectada al someterlos a este tipo de situaciones tanto en la vida



prenatal como posnatal. El aumento del estrés al que nos vemos sometidos como consecuencia de nuestro ritmo de vida, tanto en la vida prenatal como durante la vida posnatal, es una importante causa de aumento de peso y obesidad (Dallman et al., 2004; Tamashiro et al., 2009). Aunque existe controversia al respecto ya que algunos artículos apoyan la idea de que el estrés al que nos vemos sometidos durante la vida prenatal es una causa de menor peso durante la vida posnatal, mientras que otros muestran que conduce a un aumento de peso e incluso algunos autores no encuentran efectos del estrés sobre el peso (Lesage et al., 2004). El hecho de someter a las madres a un fotoperiodo alterado (jet lag social) es una situación estresante que esperamos afecte a las descendientes en la vida posnatal.

Del análisis llevado a cabo sobre la influencia de la luz nocturna y el tratamiento con melatonina sobre la evolución del peso corporal a madres sometidas a esta situación, deducimos que la melatonina exógena previene la ganancia de peso excesiva.

Las condiciones a las que se ven expuestas las madres durante la gestación pueden conducir a una alteración en el momento de inicio de la pubertad de los descendientes (Smith y Spencer, 2012). Nuestros resultados nos indican que la cronodisrupción sufrida por las madres gestantes produce un retraso en la edad de la apertura vaginal de sus descendientes.

Hay estudios que muestran que alteraciones en el ritmo de melatonina afectan al momento de inicio de la pubertad, pudiendo producir un adelanto o un retraso (Waldhauser et al., 1991). En este sentido, la ingesta de melatonina exógena, que tiene como consecuencia un aumento en los niveles normales de melatonina, produce un retraso en el momento de inicio de la pubertad (Srinivasan et al., 2009), sin embargo otros muestran que tratar a niños incluso durante un largo periodo de tiempo con melatonina no afecta al desarrollo normal de la pubertad (van Geijlswijk et al., 2011), y en roedores se ha visto que el tratamiento con melatonina produce un adelanto de la apertura vaginal (Colmenero et al., 1994). Además, Silman et al. (1979) mostraron que los niveles de melatonina en niños que presentaron retraso en la pubertad eran más bajos de lo normal, mientras que en niños con adelanto en la pubertad los niveles de melatonina eran más altos.

Nuestros resultados, junto con los de Silman et al., (1979) ponen de manifiesto una clara dependencia del momento de inicio de la pubertad de la melatonina, ya que la carencia de melatonina a la que se vieron sometidas las ratas estudiadas durante la gestación parece la responsable de este retraso. Además se comprobó que el tratamiento con melatonina revierte en parte esta situación producida como consecuencia de la luz artificial durante la noche, ya que las descendientes de madres tratadas con melatonina presentaron la apertura vaginal a una edad algo más retrasada que las descendientes del grupo Control, pero no tanto como las del grupo expuesto a luz continua.

El tratamiento con melatonina a las madres durante la gestación afecta de forma negativa a la ciclicidad estral de sus descendientes. Numerosos artículos ponen de manifiesto el efecto regulador de la melatonina sobre la función reproductora (Chuffa et al., 2011; Fernández et al., 2013). Se ha demostrado la capacidad de la melatonina de reparar la función reproductora de ratas pre-acíclicas, ya que el tratamiento con melatonina a estas ratas permitió un mantenimiento de los niveles de estradiol similares a los de ratas jóvenes cíclicas, encontrándose además la resincronización de la periodicidad estral. El tratamiento con melatonina altera la duración del ciclo estral, aunque depende del momento de administración, del periodo de vida de la rata y de la duración del tratamiento (Fernández et al., 2013). Hay estudios que muestran que el efecto ejercido por la melatonina sobre la ciclicidad estral es beneficioso (Horton y Yellon, 2001), Chuffa et al., (2011) indican que la melatonina aumenta la duración del ciclo estral y conduce a una alta frecuencia de metaestro y diestro, mientras que otros autores muestran que en ratas la exposición a luz continua y su tratamiento con melatonina produce periodos de estro más largos (Prata Lima et al., 2004) y de proestro y estro más largos (Colmenero et al., 1994). En todos estos estudios el tratamiento con melatonina tuvo lugar durante la vida postnatal, pero en nuestro caso mostramos que el tratamiento a las madres durante la gestación también produce alteraciones en el ciclo estral de las descendientes, aumentando la duración del ciclo estral, ya que se alarga la fase de estro. Nuestros resultados coinciden con los encontrados por Prata Lima et al., (2004) ya que es la fase de estro la que se ve afectada.

De los resultados obtenidos en las descendientes de ratas expuestas a LL, deducimos que el ciclo estral no se ve alterado como consecuencia de la exposición a luz continua. Resultados similares fueron obtenidos por Takayama (2003).

Sin embargo, la exposición a luz artificial en las horas de la noche durante la gestación afecta al desarrollo gonadal de las descendientes hembra en todas las etapas del desarrollo estudiadas, existiendo un efecto reparador en la infancia y el periodo juvenil de la melatonina exógena con la que tratamos a las madres durante la gestación. Sin embargo, la influencia reparadora de la melatonina desaparece en la vida adulta. Otros trabajos ponen de manifiesto que la melatonina, tanto endógena como exógena, produce una disminución del peso de los ovarios (Chuffa et al., 2011). A priori estos resultados se contradicen con los nuestros, pero hay que tener en cuenta que la melatonina ejerce un efecto u otro sobre diferentes parámetros corporales, entre ellos el peso de los ovarios, en función de la edad a la que se administre y a la que se estudien dichos parámetros (Díaz-Rodríguez et al., 2001). Por esta razón, las diferencias en nuestros resultados con los de otros autores pueden deberse a la diferencia en las edades a las que se realizaron los estudios, a la dosis de melatonina administrada y al hecho de que en nuestro caso las que se vieron sometidas a los tratamientos aplicados fueron las madres de los individuos estudiados. Se podría pensar que el peso de los ovarios está en función del peso corporal, es decir, que a mayor peso corporal mayor peso de los ovarios, pero si comparamos los pesos de los ovarios y el peso corporal aparentemente no se correlacionan. Esto nos muestra un efecto directo de la melatonina materna sobre el eje neuroendocrino-reproductor de las descendientes.

Esta influencia se ve reforzada ya que los resultados de nuestro trabajo ponen de manifiesto un importante efecto del fotoperiodo materno en el periodo juvenil sobre el peso del oviducto y el útero de las descendientes de madres expuestas a luz continua, ya que muestran un peso significativamente mayor de dichas estructuras que los otros dos grupos estudiados. Además se pone de manifiesto de nuevo el efecto reparador de la melatonina exógena, ya que disminuye el peso del oviducto y el útero de los descendientes de madres tratadas hasta valores similares a los encontrados en el grupo Control. Previamente otros autores pusieron de manifiesto que niveles alterados de melatonina afectan al peso del tracto reproductor femenino. Este efecto se mostró en roedores que estuvieron expuestos a fotoperiodo corto, donde se vio una disminución del peso de los ovarios, oviducto, útero y vagina (Devries et al., 1989). Justo el efecto contrario se puso de manifiesto en el trabajo de Benson (1989) con ratas, donde mostró que el tratamiento con melatonina aumenta de forma significativa el peso del útero.

Estas ideas nos indican que niveles elevados de melatonina endógena disminuyen el peso del tracto reproductor femenino, mientras que la melatonina exógena lo aumenta. Hay que tener en cuenta que en nuestro experimento el grupo tratado con melatonina no presenta unos niveles excesivos de dicha hormona, sino que la inyección administrada aporta la melatonina que no pueden producir de forma natural como consecuencia de su exposición a luz artificial constante. Por esta razón el resultado que encontramos no se contradice con lo citado anteriormente, ya que el aumento del peso que observaron se produjo en roedores expuestos a fotoperiodo normal y que por tanto no tenían alterada la producción de melatonina.

En base a nuestros resultados podemos afirmar que la exposición de las madres a luz artificial durante la noche, a lo largo de la gestación, no afecta al metabolismo de la glucosa en las descendientes durante el periodo infantil y juvenil.

Situaciones de estrés durante la vida prenatal puedan dar lugar a un aumento de los niveles de glucosa durante la vida posnatal (García-Cáceres et al., 2010). Como la exposición a luz artificial durante la noche puede ser considerada como una situación de estrés en la que se ven afectados los niveles de melatonina, la glucemia puede verse en consecuencia afectada. Hay trabajos que apuntan que la ausencia total de esta hormona o una disminución de sus niveles normales en ratas da lugar a una alteración del metabolismo que conduce a situaciones como resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, produciéndose un aumento en los niveles de glucosa en plasma (Lima et al., 1998). Además se ha demostrado que estas disfunciones metabólicas se ven compensadas por el tratamiento con melatonina (Zanquetta et al., 2003). Este efecto inhibitorio de la melatonina sobre el metabolismo de la glucosa en roedores (Dauchy et al., 2010) no se pone de manifiesto en nuestros resultados. No obstante, hay que indicar que las condiciones experimentales no son las mismas en nuestro estudio que en los citados previamente, ya que en ellos la exposición a fotoperiodo alterado se produjo en los propios sujetos experimentales, mientras que en nuestro caso fueron las madres de las hembras estudiadas las expuestas a luz artificial durante la noche.

El efecto del tratamiento con melatonina a ratas expuestas a fotoperiodo alterado descrito previamente sí se pone de manifiesto en este trabajo, ya que los niveles de glucosa en sangre de las descendientes de madres del grupo LL+MEL son menores que

los de las descendientes del grupo LL en la edad adulta. A pesar de que las diferencias encontradas entre ellas no sean significativas se observa una tendencia a una mayor actividad del metabolismo de la glucosa. De modo que podemos deducir que la exposición de las madres a luz artificial durante la gestación no afecta al metabolismo de la glucosa de las descendientes y que, a diferencia del efecto inhibitor de la melatonina endógena sobre el metabolismo de la glucosa (Díaz y Blázquez, 1986; la Fleur et al., 2001) el tratamiento con melatonina exógena activa dicha actividad metabólica.

La melatonina ejerce una importante influencia en el desarrollo testicular (Amano et al., 2000; Flynn et al., 2000; Horton y Yellon, 2001). Si analizamos los resultados que encontramos en cuanto al peso de los testículos, la ausencia de diferencias entre los grupos Control y LL nos indica que la exposición a luz artificial durante la gestación no afecta al peso de los testículos de los descendientes. Sin embargo, se observa un claro efecto del tratamiento con melatonina exógena, ya que encontramos que tanto a los 28 días como en la edad adulta hay un peso significativamente más bajo de los testículos de machos descendientes de madres del grupo LL+MEL. Otros trabajos realizados en roedores apoyan nuestros resultados, ya que encontraron que el aumento en los niveles de melatonina como consecuencia de la exposición a días cortos o al tratamiento con melatonina produce atrofia testicular, es decir, un menor peso de los testículos (Colmenero et al., 1994; Horton y Yellon, 2001).

En cuanto al peso de la glándula pineal, en los descendientes machos de nuestras madres sometidas a los diferentes tratamientos durante la gestación no se observa ningún efecto de la exposición a luz continua ni del tratamiento con melatonina exógena. Estos resultados se apoyan en los encontrados por Colmenero (1991; 1994) en trabajos también realizados en ratas.

Por el contrario, en las descendientes hembra la alteración del fotoperiodo en las madres da lugar a un mayor peso de la glándula pineal durante el periodo juvenil, mientras que el tratamiento con melatonina durante la gestación es capaz de revertir este efecto. El mayor peso de la glándula pineal puede ser debido a que la ausencia de melatonina materna durante la gestación conduce a un mayor desarrollo de la glándula pineal de las descendientes para poder producir una mayor cantidad de melatonina y

contrarrestar estas deficiencias. Esta tendencia cambia en la edad adulta ya que el tratamiento con melatonina materna solo ejerce su efecto reparador durante el periodo juvenil, mientras que en la edad adulta no se pone de manifiesto.

Hemos valorado también la influencia de la desincronización circadiana a otro nivel del eje neuroendocrino-reproductor como es la hipófisis, si bien, no hay muchos trabajos que estudien el peso de la hipófisis en unas condiciones similares a las nuestras, se ha descrito un menor peso de la hipófisis en ratas pinealectomizadas respecto a las Control y tratadas con melatonina (Colmenero et al., 1994). En nuestro trabajo, las condiciones experimentales son diferentes, ya que son las madres las sometidas a las diferentes condiciones experimentales durante la gestación, aunque también se pone de manifiesto un efecto de la cronodisrupción sobre el peso de la hipófisis.

En el caso de las hembras, a los 28 días de edad, la alteración del fotoperiodo no produce diferencias entre las descendientes, sino que estas son debidas al tratamiento con melatonina exógena, produciendo un retraso en el desarrollo de la hipófisis. Sin embargo, en la edad adulta desaparece la influencia de la melatonina. Este desarrollo más lento de la hipófisis durante el periodo infantil y juvenil podría estar relacionado con cierto retraso que se produce en el momento de inicio de la pubertad descrito más arriba.

En cuanto a los machos, el comportamiento del peso de la hipófisis es el mismo a los dos periodos de edad estudiados. Al igual que ocurría con las hembras a los 28 días, el tratamiento con melatonina afecta al desarrollo de la hipófisis durante el periodo infantil y juvenil, y que además en este caso se mantiene este menor desarrollo durante la vida adulta.

Se pone de manifiesto de nuevo el diferente efecto de la melatonina exógena, en esta ocasión en función del sexo.

Finalmente comprobamos que en los descendientes de los tres tipos de madres se producía la espermatogénesis entre los 70-80 días de edad, o lo que es lo mismo, que todos los machos habían alcanzado la pubertad a las edades indicadas.

Numerosos estudios muestran los efectos de la melatonina sobre los espermatozoides humanos, sin embargo ninguno reproduce unas condiciones similares a las nuestras. La presencia de melatonina en el líquido seminal (Bornman et al., 1989)

junto con la de receptores en la superficie espermática hace pensar que esta molécula ejerce algún efecto sobre los espermatozoides (van Vuuren et al., 1992).

En los descendientes del grupo Control observamos que el tratamiento con melatonina favorece la motilidad, hiperactivación y resistencia de los espermatozoides. Además observamos que la melatonina comienza a ejercer su efecto muy pronto, ya que incluso a  $t=0$  se observa una mayor proporción de espermatozoides móviles que en la muestra sin melatonina y deducimos que la concentración de melatonina debe ser tenida en cuenta, ya que concentraciones demasiado elevadas pueden ejercer efectos negativos sobre la motilidad espermática.

Resultados similares encontramos en el caso de los machos descendientes de madres de los dos grupos experimentales. Cabe destacar que incluso el porcentaje de hiperactivación es superior en ambos grupos que en el Control, lo que indica que la exposición a luz nocturna de las madres durante la gestación produce curiosamente un efecto positivo sobre la motilidad espermática de los descendientes, mientras que el tratamiento con melatonina no modifica los efectos producidos por la cronodisrupción en este sentido. Además en esta misma situación, los resultados que encontramos nos indican que los espermatozoides de los descendientes del grupo LL+MEL permanecen en movimiento más tiempo que en los otros dos grupos. Esto nos hace pensar que el tratamiento con melatonina a las madres durante la gestación aumenta la resistencia de los mismos, permitiéndoles que sigan moviéndose durante más tiempo. La situación que se encontró a 10mM fue idéntica en ambos grupos, mientras que a 30mM la proporción de machos que permanecen con hiperactivación espermática es mayor en el grupo expuesto a LL que en el grupo LL+MEL. Deducimos de ello que la exposición a LL durante la gestación hace que los espermatozoides presenten una mayor resistencia, a altas concentraciones de melatonina, o lo que es lo mismo, que son capaces de soportar concentraciones de melatonina más altas.

En cuanto al porcentaje de espermatozoides MT en cada macho, los resultados encontrados nos muestran un claro efecto de la melatonina sobre el porcentaje de espermatozoides MT, así como, de nuevo, una importante influencia de la concentración de melatonina usada.

El estrés oxidativo afecta de forma negativa a la capacitación espermática. La

melatonina protege a los espermatozoides de la apoptosis y del daño oxidativo causado por las ROS y RNS, aunque hay estudios que muestran que ejerce su efecto fundamentalmente contra las RNS (Sönmez et al., 2007). Además no afecta a los niveles de AMPc, molécula fundamental en la hiperactivación de la movilidad del flagelo (Fujinoki, 2008). La melatonina favorece la hiperactivación actuando sobre MT1. Esta hiperactivación de la motilidad se debe al aumento de los niveles de ATP a nivel mitocondrial, ya que estabiliza la membrana mitocondrial interna (Fujinoki, 2008). Hay estudios que apoyan la idea de que la melatonina presente en el líquido seminal favorece la motilidad espermática, mientras que otros apuntan que no ejerce ningún efecto importante sobre la motilidad, ya que no hay diferencias significativas en la concentración de melatonina del semen de pacientes con buena y mala motilidad espermática (Bornman et al., 1989; van Vuuren et al., 1988; 1992). Se ha apuntado también que la melatonina aportada por los ovarios aumenta la hiperactivación de los espermatozoides, por lo que la hiperactivación no se produciría hasta alcanzar el tracto reproductor femenino (Fujinoki, 2008).

Lo que está claro es el efecto positivo que ejerce la melatonina sobre la calidad seminal general y en particular sobre la motilidad espermática. Numerosos estudios han revelado que muestras tratadas in vitro con melatonina en concentraciones adecuadas muestran un mayor porcentaje de espermatozoides totales y progresivos, un aumento en la velocidad espermática y una disminución del número de espermatozoides inmóviles y no viables (Fujinoki, 2008; Du Plessis et al., 2010; Ortiz et al., 2011), resultados que apoyan los encontrados en nuestro trabajo.



## **6. CONCLUSIONES**

1.- La exposición a luz artificial durante la noche produce una mayor ganancia de peso durante la gestación. El tratamiento con melatonina exógena revierte esta situación y conduce a una menor ganancia de peso.

2.- La exposición a luz continua durante la gestación produce un retraso del día del parto. El tratamiento con melatonina exógena es capaz de corregir esta situación.

3.- La ritmicidad circadiana del momento del día en el que se produce el parto se ve alterada por la exposición a luz continua, mientras que el tratamiento con melatonina exógena permite que se produzca en el momento adecuado.

4.- La exposición a luz continua de las madres durante la gestación produce un aumento en el número de crías nacidas muertas, pero el tratamiento con melatonina exógena puede corregir esta situación.

5.- Tanto la exposición a luz continua como la capacidad reparadora de la melatonina afectan de forma diferente a la ganancia de peso corporal en función del sexo y de la fase de desarrollo.

6.- La exposición a luz continua durante la gestación retrasa la apertura vaginal de sus descendientes. Mientras que el tratamiento con melatonina afecta de forma negativa a la ciclicidad estral de sus descendientes.

7.- La exposición a luz artificial durante la gestación no afecta al metabolismo de la glucosa, mientras que el tratamiento con melatonina exógena activa dicha actividad metabólica.

8.- La influencia de la luz nocturna durante la gestación afecta al desarrollo del eje neuroendocrino-reproductor de las descendientes hembras, pero no de los machos. La melatonina exógena tiene una influencia reparadora dependiente del sexo y del estado de desarrollo.

9.- Tanto la luz nocturna como el tratamiento con melatonina favorecen la motilidad de los espermatozoides.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

Abeyseena, C., Jayawardana, P., and DE A Seneviratne, R. (2009). Maternal sleep deprivation is a risk factor for small for gestational age: a cohort study. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 49, 382–387.

Aguilar-Roblero, R., Guadarrama, P., Mercado, C., and Chá, J. 2004. El núcleo supraquiasmático y la glándula pineal en la regulación de los ritmos circadianos en roedores. *Temas Selectos de Neurociencias III*. Ed. Javier Velázquez Moctezuma. UAM.

Amano, M., Iigo, M., Ikuta, K., Kitamura, S., Yamada, H., and Yamamori, K. (2000). Roles of melatonin in gonadal maturation of underyearling precocious male masu salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 120, 190–197.

Amaral, F.G., Castrucci, A.M., Cipolla-Neto, J., Poletini, M.O., Mendez, N., Richter, H.G., and Sellix, M.T. (2014). Environmental Control of Biological Rhythms: Effects on Development, Fertility and Metabolism. *J. Neuroendocrinol.*

Andrews, W.W., Advis, J.P., and Ojeda, S.R. (1981). The maturation of estradiol-negative feedback in female rats: evidence that the resetting of the hypothalamic “gonadostat” does not precede the first preovulatory surge of gonadotropins. *Endocrinology* 109, 2022–2031.

Armstrong, B.G., Nolin, A.D., and McDonald, A.D. (1989). Work in pregnancy and birth weight for gestational age. *Br. J. Ind. Med.* 46, 196–199.

Aubert, M.L., Begeot, M., Winiger, B.P., Morel, G., Sizonenko, P.C., and Dubois, P.M. (1985). Ontogeny of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (GnRH) and pituitary GnRH receptors in fetal and neonatal rats. *Endocrinology* 116, 1565–1576.

Axelsson, G., Rylander, R., and Molin, I. (1989). Outcome of pregnancy in relation to irregular and inconvenient work schedules. *Br. J. Ind. Med.* 46, 393–398.

Axelrod, J, y Weissbach, H. 1960. «Enzymatic O-Methylation of N-Acetylserotonin to Melatonin». *Science (New York, N.Y.)* 131 (3409): 1312.

Becker, Jill B. 2002. *Behavioral Endocrinology*. Editores: Jill B. Becker, S. Marc Breedlove, David Crews and Margaret M. McCarthy.

Begeot, M, G Morel, R W Rivest, M L Aubert, M P Dubois, y P M Dubois. 1984. «Influence of Gonadoliberin on the Differentiation of Rat Gonadotrophs: An in Vivo and in Vitro Study». *Neuroendocrinology* 38 (3): 217-25.

Bellastella, A, T Criscuolo, A A Sinisi, S Iorio, A Mazzuca, F Parlato, L Perrone, y M Faggiano. 1987. «Influence of Blindness on Plasma Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone, Prolactin, and Testosterone Levels in Prepubertal Boys». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 64 (4): 862-64.

Benson, Bryant. 1989. «Bovine Pineal Tripeptide Threonylseryllysine Retards Puberty in Female Rats». *Journal of Pineal Research* 6 (4): 351-57.

Borjigin, Jimo, L Samantha Zhang, y Anda-Alexandra Calinescu. 2012. «Circadian Regulation of Pineal Gland Rhythmicity». *Molecular and Cellular Endocrinology* 349 (1): 13-19.

Bornman, M S, J M Oosthuizen, H C Barnard, G W Schulenburg, D Boomker, y S Reif. 1989. «Melatonin and Sperm Motility». *Andrologia* 21 (5): 483-85.

Brainard, G C, B A Richardson, T S King, S A Matthews, y R J Reiter. 1983. «The Suppression of Pineal Melatonin Content and N-Acetyltransferase Activity by Different Light Irradiances in the Syrian Hamster: A Dose-Response Relationship». *Endocrinology* 113 (1): 293-96.

Brainard, G C, B A Richardson, T S King, y R J Reiter. 1984. «The Influence of Different Light Spectra on the Suppression of Pineal Melatonin Content in the Syrian Hamster». *Brain Research* 294 (2): 333-39.

Bronson, F H. 1995. «Seasonal Variation in Human Reproduction: Environmental Factors». *The Quarterly Review of Biology* 70 (2): 141-64.

Cardinali, D.P., Jordá, M.P., and Sánchez-Barceló, E.J. (1994). Introducción a la cronobiología: fisiología de los ritmos biológicos.

Carlomagno, G, M Nordio, T T Chiu, y V Unfer. 2011. «Contribution of Myo-Inositol and Melatonin to Human Reproduction». *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 159 (2): 267-72.

Chappell, P E. 2005. «Clocks and the Black Box: Circadian Influences on Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion». *Journal of Neuroendocrinology* 17 (2): 119-30.

Chiappa, S A, y G Fink. 1977. «Releasing Factor and Hormonal Changes in the Hypothalamic-Pituitary-Gonadotrophin and -Adrenocorticotrophin Systems before and after Birth and Puberty in Male, Female and Androgenized Female Rats». *The Journal of Endocrinology* 72 (2): 211-24.

Chuffa, L G A, J P A Amorim, G R Teixeira, L O Mendes, B A Fioruci, P F F Pinheiro, F R F Seiva, et al. 2011. «Long-Term Melatonin Treatment Reduces Ovarian Mass and Enhances Tissue Antioxidant Defenses during Ovulation in the Rat». *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]* 44 (3): 217-23.

Cipolla-Neto, J., F. G. Amaral, S. C. Afeche, D. X. Tan, y R. J. Reiter. 2014. «Melatonin, Energy Metabolism, and Obesity: A Review». *Journal of Pineal Research* 56 (4): 371-81.

Colmenero, M D, B Díaz, M L Moreno, A Esquifino, y B Marín. 1994. «Effect of Continuous Light and Melatonin on the Sexual Maturation of the Female Rat». *Revista Española de Fisiología* 50 (3): 193-94.

Colmenero, M.d., B. Diaz, J.l. Miguel, M.l.i. González, A. Esquifino, y B. Marin. 1991. «Melatonin Administration during Pregnancy Retards Sexual Maturation of Female Offspring in the Rat». *Journal of Pineal Research* 11 (1): 23-27.

Dallman, Mary F, Susanne E la Fleur, Norman C Pecoraro, Francisca Gomez, Hani Houshyar, y Susan F Akana. 2004. «Minireview: Glucocorticoids--Food Intake, Abdominal Obesity, and Wealthy Nations in 2004». *Endocrinology* 145 (6): 2633-38

Dauchy, Robert T, Erin M Dauchy, Robert P Tirrell, Cody R Hill, Leslie K Davidson, Michael W Greene, Paul C Tirrell, Jinghai Wu, Leonard A Sauer, y David E

Blask. 2010. «Dark-Phase Light Contamination Disrupts Circadian Rhythms in Plasma Measures of Endocrine Physiology and Metabolism in Rats». *Comparative Medicine* 60 (5): 348-56.

Davis, Fred C., y Steven M. Reppert. 2001. «Development of Mammalian Circadian Rhythms». En *Circadian Clocks*, editado por Joseph S. Takahashi, Fred W. Turek, y Robert Y. Moore, 247-90. *Handbook of Behavioral Neurobiology* 12. Springer US

De Jonge, Christopher. 2005. «Biological Basis for Human Capacitation». *Human Reproduction Update* 11 (3): 205-14.

Depner, Christopher M, Ellen R Stothard, y Kenneth P Wright Jr. 2014. «Metabolic Consequences of Sleep and Circadian Disorders». *Current Diabetes Reports* 14 (7): 507.

Devries, Martinus J., Suzie A. Ferreira, y J. David Glass. 1989. «Evidence that short photoperiod-induced gonadal regression in the Mongolian gerbil is mediated by the action of melatonin in the medial hypothalamus». *Brain Research* 494 (2): 241-46.

Díaz, B., y Blázquez, E. 1986. «Effect of Pinealectomy on Plasma Glucose, Insulin and Glucagon Levels in the Rat». *Hormone and Metabolic Research = Hormon-Und Stoffwechselforschung = Hormones et Métabolisme* 18 (4): 225-29.

Díaz Rodríguez, E., N. Garnacho Gayarre, M. M. Valdés Cañedo, B. Marín Fernández, y B. Díaz López. 2001. «Efectos de la melatonina sobre el mantenimiento de parámetros corporales durante el envejecimiento. Estudio en *Rattus norvegicus*». *Revista Española de Geriatría y Gerontología* 36 (5): 287-92.

Domínguez Rubio, Ana Paula, Micaela Sordelli, Ana Inés Salazar, Julieta Aisemberg, María Victoria Bariani, Maximiliano Cella, Ruth E Rosenstein, y Ana María Franchi. 2013. «Melatonin Prevents Experimental Preterm Labor And Increases Offspring Survival». *Journal of Pineal Research*, diciembre.

Dominoni, Davide M, Wolfgang Goymann, Barbara Helm, y Jesko Partecke. 2013. «Urban-like Night Illumination Reduces Melatonin Release in European Blackbirds (*Turdus Merula*): Implications of City Life for Biological Time-Keeping of Songbirds». *Frontiers in Zoology* 10 (1): 60.

Du Plessis, S. S., K. Hagenaar, y F. Lampiao. 2010. «The in Vitro Effects of Melatonin on Human Sperm Function and Its Scavenging Activities on NO and ROS». *Andrologia* 42 (2): 112-16.

Egger, Garry, y John Dixon. 2014. «Beyond Obesity and Lifestyle: A Review of 21st Century Chronic Disease Determinants». *BioMed Research International*.

Fernández, Blanca E, Elena Díaz, Carmen Fernández, Paula Núñez, y Beatriz Díaz. 2013. «Ovarian Aging: Melatonin Regulation of the Cytometric and Endocrine Evolutive Pattern». *Current Aging Science* 6 (1): 1-7.

Ferramosca, Alessandra, y Vincenzo Zara. 2014. «Bioenergetics of Mammalian Sperm Capacitation». *BioMed Research International* 2014.

Flynn, Alison K., David A. Freeman, Irving Zucker, y Brian J. Prendergast. 2000. «Testicular Development in Siberian Hamsters Depends on Frequency and Pattern of Melatonin Signals». *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279 (4): R1182-R1189.

Fonken, Laura K, y Randy J Nelson. 2011. «Illuminating the Deleterious Effects of Light at Night». *F1000 Medicine Reports* 3: 18.

Fujinoki, Masakatsu. 2008. «Melatonin-Enhanced Hyperactivation of Hamster Sperm». *Reproduction (Cambridge, England)* 136 (5): 533-41.

Funkenstein, B, A Nimrod, y H R Lindner. 1980. «The Development of Steroidogenic Capability and Responsiveness to Gonadotropins in Cultured Neonatal Rat Ovaries». *Endocrinology* 106 (1): 98-106.

Garaulet, Marta, y Purificación Gómez-Abellán. 2013. «Chronobiology and Obesity». *Nutrición Hospitalaria* 28 Suppl 5 (septiembre): 114-20

Garaulet, M, J M Ordovás, y J A Madrid. 2010. «The Chronobiology, Etiology and Pathophysiology of Obesity». *International Journal of Obesity (2005)* 34 (12): 1667-83.

García-Cáceres, Cristina, Yolanda Diz-Chaves, Natalia Lagunas, Isabel Calmarza-Font, Iñigo Azcoitia, Luis M Garcia-Segura, Laura M Frago, Jesús Argente, y Julie A

Chowen. 2010. «The Weight Gain Response to Stress during Adulthood Is Conditioned by Both Sex and Prenatal Stress Exposure». *Psychoneuroendocrinology* 35 (3): 403-13.

Gillette, M.U., and Tischkau, S.A. (1999). Suprachiasmatic nucleus: the brain's circadian clock. *Recent Prog. Horm. Res.* 54, 33–58; discussion 58–59.

Golombek, Diego A, Leandro P Casiraghi, Patricia V Agostino, Natalia Paladino, José M Duhart, Santiago A Plano, y Juan J Chiesa. 2013. «The Times They're a- Changing: Effects of Circadian Desynchronization on Physiology and Disease». *Journal of Physiology, Paris* 107 (4): 310-22.

Hagenauer, Megan Hastings, y Theresa M. Lee. 2012. «The neuroendocrine control of the circadian system: Adolescent chronotype». *Frontiers in Neuroendocrinology* 33 (3): 211-29.

Henkel, R, R Menkveld, M Kleinhappl, y W B Schill. 2001. «Seasonal Changes in Human Sperm Chromatin Condensation». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 18 (7): 371-77.

Ho, Anthony K., y Constance L. Chik. 2010. «Modulation of Aanat Gene Transcription in the Rat Pineal Gland». *Journal of Neurochemistry* 112 (2): 321-31.

Horton, T H, y S M Yellon. 2001. «Aging, Reproduction, and the Melatonin Rhythm in the Siberian Hamster». *Journal of Biological Rhythms* 16 (3): 243-53.

Huang, Zheping, Tiecheng Liu, Asamanja Chatteraj, Samreen Ahmed, Michael M. Wang, Jie Deng, Xing Sun, y Jimo Borjigin. 2008. «Posttranslational regulation of TPH1 is responsible for the nightly surge of 5-HT output in the rat pineal gland». *Journal of pineal research* 45 (4): 506-14.

Ishizuka, B, Y Kuribayashi, K Murai, A Amemiya, y M T Itoh. 2000. «The Effect of Melatonin on in Vitro Fertilization and Embryo Development in Mice». *Journal of Pineal Research* 28 (1): 48-51.

Kennaway, David J. 2005. «The Role of Circadian Rhythmicity in Reproduction». *Human Reproduction Update* 11 (1): 91-101.

Kim, Min-Ju, Kuk-Hui Son, Hyun-Young Park, Dong-Ju Choi, Chang-Hwan Yoon, Hea-Young Lee, Eun-Young Cho, y Myeong-Chan Cho. 2013. «Association

between shift work and obesity among female nurses: Korean Nurses' Survey». *BMC Public Health* 13 (diciembre): 1204.

Klein, D.C. (1972). Evidence for the placental transfer of 3 H-acetyl-melatonin. *Nature. New Biol.* 237, 117–118.

Klein, D.C. (1985). Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Found. Symp.* 117, 38–56.

Klein, D.C. (2007). Arylalkylamine N-acetyltransferase: “the Timezyme.” *J. Biol. Chem.* 282, 4233–4237.

Klein, D.C., and Weller, J.L. (1970). Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* 169, 1093–1095.

Klein, D.C., Roseboom, P.H., and Coon, S.L. (1996). New light is shining on the melatonin rhythm enzyme: the first postcloning view. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 7, 106–112.

Knutsson, Anders. 2003. «Health Disorders of Shift Workers». *Occupational Medicine (Oxford, England)* 53 (2): 103-8.

La Fleur, S E, A Kalsbeek, J Wortel, J van der Vliet, y R M Buijs. 2001. «Role for the Pineal and Melatonin in Glucose Homeostasis: Pinealectomy Increases Night-Time Glucose Concentrations». *Journal of Neuroendocrinology* 13 (12): 1025-32.

Lanoix, Dave, Hamza Beghdadi, Julie Lafond, y Cathy Vaillancourt. 2008. «Human Placental Trophoblasts Synthesize Melatonin and Express Its Receptors». *Journal of Pineal Research* 45 (1): 50-60.

Lax, P, S Zamora, y J A Madrid. 1998. «Coupling Effect of Locomotor Activity on the Rat's Circadian System». *The American Journal of Physiology* 275: 580-587.

Lax, P., Zamora, S., and Madrid, J.A. (1999). Food-entrained feeding and locomotor circadian rhythms in rats under different lighting conditions. *Chronobiol. Int.* 16, 281–291.

Lerner, A., Case, J., Mori, W. and Wright, M. (1959). «Melatonin in peripheral nerve». *Nature.* 183: 1821.



Lesage, J, F Del-Favero, M Leonhardt, H Louvart, S Maccari, D Vieau, y M Darnaudery. 2004. «Prenatal Stress Induces Intrauterine Growth Restriction and Programmes Glucose Intolerance and Feeding Behaviour Disturbances in the Aged Rat». *The Journal of Endocrinology* 181 (2): 291-96.

Li, Min-Dian, Chao-Min Li, y Zhong Wang. 2012. «The Role of Circadian Clocks in Metabolic Disease». *The Yale Journal of Biology and Medicine* 85 (3): 387-401.

Lima, F B, U F Machado, I Bartol, P M Seraphim, D H Sumida, S M Moraes, N S Hell, et al. 1998. «Pinelectomy Causes Glucose Intolerance and Decreases Adipose Cell Responsiveness to Insulin in Rats». *The American Journal of Physiology* 275: 934-941.

Lincoln, D W, y D G Porter. 1976. «Timing of the Photoperiod and the Hour of Birth in Rats». *Nature* 260 (5554): 780-81.

Maronde, Erik, y Jörg H. Stehle. 2007. «The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 18 (4): 142-49.

Mason, C A, y D W Lincoln. 1976. «Visualization of the Retino-Hypothalamic Projection in the Rat by Cobalt Precipitation». *Cell and Tissue Research* 168 (1): 117-31.

McDonald, A D, J C McDonald, B Armstrong, N M Cherry, A D Nolin, y D Robert. 1988. «Prematurity and Work in Pregnancy». *British Journal of Industrial Medicine* 45 (1): 56-62.

Meijs-Roelofs, H M, P Kramer, y H J Sander. 1983. «Changes in Serum Concentration of Luteinizing Hormone in the Female Rat Approaching Puberty». *The Journal of Endocrinology* 98 (2): 241-49.

Mendes, Caroline, Ana Maria de Souza Lopes, Fernanda Gaspar do Amaral, Rodrigo A Peliciari-Garcia, Ariane de Oliveira Turati, Sandro M Hirabara, Julieta H Scialfa Falcão, y José Cipolla-Neto. 2013. «Adaptations of the Aging Animal to Exercise: Role of Daily Supplementation with Melatonin». *Journal of Pineal Research* 55 (3): 229-39.

Méndez, Natalia, Lorena Abarzua-Catalan, Nelson Vilches, Hugo A Galdames, Carlos Spichiger, Hans G Richter, Guillermo J Valenzuela, Maria Seron-Ferre, y

Claudia Torres-Farfan. 2012. «Timed Maternal Melatonin Treatment Reverses Circadian Disruption of the Fetal Adrenal Clock Imposed by Exposure to Constant Light». *PloS One* 7 (8).

Meng, Yang, Zhenni He, Jian Yin, Yu Zhang, y Tianhao Zhang. 2011. «Quantitative Calculation of Human Melatonin Suppression Induced by Inappropriate Light at Night». *Medical & Biological Engineering & Computing* 49 (9): 1083-88.

Miller, B.H., and Takahashi, J.S. (2013). Central Circadian Control of Female Reproductive Function. *Front. Endocrinol.* 4, 195.

Møller, Morten, y Florian M. Baeres. 2002. «The Anatomy and Innervation of the Mammalian Pineal Gland». *Cell and Tissue Research* 309 (1): 139-50.

Morris, Christopher J, Daniel Aeschbach, y Frank A J L Scheer. 2012. «Circadian System, Sleep and Endocrinology». *Molecular and Cellular Endocrinology* 349 (1): 91-104.

Moore, R.Y. (1996). Neural control of the pineal gland. *Behav. Brain Res.* 73, 125–130.

Mousa-Balabel, T M, y R A Mohamed. 2011. «Effect of Different Photoperiods and Melatonin Treatment on Rabbit Reproductive Performance». *The Veterinary Quarterly* 31 (4): 165-71.

Murcia García, J, A Muñoz Hoyos, A Molina Carballo, J M Fernández García, E Narbona López, y J Uberos Fernández. 2002. «[Puberty and melatonin]». *Anales españoles de pediatría* 57 (2): 121-26.

Navara, Kristen J, y Randy J Nelson. 2007. «The Dark Side of Light at Night: Physiological, Epidemiological, and Ecological Consequences». *Journal of Pineal Research* 43 (3): 215-24.

Ojeda, S R, y V D Ramírez. 1972. «Plasma Level of LH and FSH in Maturing Rats: Response to Hemigonadectomy». *Endocrinology* 90 (2): 466-72.

Ojeda, S.R y Urbanski, H.F. (1994). Puberty in the rat. Eds. E. Knobil, J.D. Neill, *The Physiology of Reproduction*, Raven, pp. 363–409.

Ojeda, S R, H F Urbanski, y C E Ahmed. 1986. «The Onset of Female Puberty: Studies in the Rat». *Recent Progress in Hormone Research* 42: 385-442.

Olcese, James. 2012. «Circadian Aspects of Mammalian Parturition: A Review». *Molecular and Cellular Endocrinology* 349 (1): 62-67.

Olcese, James, Stephen Lozier, y Courtney Paradise. 2013. «Melatonin and the Circadian Timing of Human Parturition». *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 20 (2): 168-74.

Ortiz, A, J Espino, I Bejarano, G M Lozano, F Monllor, J F García, J A Pariente, y A B Rodríguez. 2011. «High Endogenous Melatonin Concentrations Enhance Sperm Quality and Short-Term in Vitro Exposure to Melatonin Improves Aspects of Sperm Motility». *Journal of Pineal Research* 50 (2): 132-39.

Pinilla, L. (1992). «Determinación y diferenciación sexual. Pubertad». En: *Fisiología humana*. Tresguerres, JAF. McGraw-Hill - Interamericana de España. Madrid. 1046-1060.

Prata Lima, M F, E C Baracat, y M J Simões. 2004. «Effects of Melatonin on the Ovarian Response to Pinealectomy or Continuous Light in Female Rats: Similarity with Polycystic Ovary Syndrome». *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]* 37 (7): 987-95.

Prunet-Marcassus, Bénédicte, Mathieu Desbazeille, Arnaud Bros, Katie Louche, Philippe Delagrangé, Pierre Renard, Louis Casteilla, y Luc Pénicaud. 2003. «Melatonin Reduces Body Weight Gain in Sprague Dawley Rats with Diet-Induced Obesity». *Endocrinology* 144 (12): 5347-52

Raisman, G, y K Brown-Grant. 1977. «The “Suprachiasmatic Syndrome”: Endocrine and Behavioural Abnormalities Following Lesions of the Suprachiasmatic Nuclei in the Female Rat». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character. Royal Society (Great Britain)* 198 (1132): 297-314.

Rajaratnam, S M, y J Arendt. 2001. «Health in a 24-H Society». *Lancet* 358 (9286): 999-1005.

Reiter, R J. 1991. «Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological Interactions». *Endocrine Reviews* 12 (2): 151-80.

Reiter, R J, S Rosales-Corral, A Coto-Montes, J A Boga, D-X Tan, J M Davis, P C Konturek, S J Konturek, y T Brzozowski. 2011. «The Photoperiod, Circadian Regulation and Chronodisruption: The Requisite Interplay between the Suprachiasmatic Nuclei and the Pineal and Gut Melatonin». *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 62 (3): 269-74.

Reiter, Russel J, Dun Xian Tan, Ahmet Korkmaz, y Sergio A Rosales-Corral. 2013. «Melatonin and Stable Circadian Rhythms Optimize Maternal, Placental and Fetal Physiology». *Human Reproduction Update*, octubre.

Reiter, Russel J, Dun-Xian Tan, Lucien C Manchester, Sergio D Paredes, Juan C Mayo, y Rosa M Sainz. 2009. «Melatonin and Reproduction Revisited». *Biology of Reproduction* 81 (3): 445-56.

Reppert, S M. 1985. «Maternal Entrainment of the Developing Circadian System». *Annals of the New York Academy of Sciences* 453: 162-69.

Reppert, S.M., Chez, R.A., Anderson, A., and Klein, D.C. (1979). Maternal-fetal transfer of melatonin in the non-human primate. *Pediatr. Res.* 13, 788–791.

Revell, Victoria L, y Debra J Skene. 2007. «Light-Induced Melatonin Suppression in Humans with Polychromatic and Monochromatic Light». *Chronobiology International* 24 (6): 1125-37.

Rojansky, N, A Benschushan, S Meirsdorf, A Lewin, N Laufer, y A Safran. 2000. «Seasonal Variability in Fertilization and Embryo Quality Rates in Women Undergoing IVF». *Fertility and Sterility* 74 (3): 476-81.

Roseboom, P H, S L Coon, R Baler, S K McCune, J L Weller, y D C Klein. 1996. «Melatonin Synthesis: Analysis of the More than 150-Fold Nocturnal Increase in Serotonin N-Acetyltransferase Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Pineal Gland». *Endocrinology* 137 (7): 3033-45.

Schenker, S, Y Yang, A Perez, R V Acuff, A M Papas, G Henderson, y M P Lee. 1998. «Antioxidant Transport by the Human Placenta». *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)* 17 (4): 159-67.

Sellix, Michael T., y Michael Menaker. 2010. «Circadian clocks in the ovary». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 21 (10): 628-36.

Serón-Ferré, M, R Riffo, G J Valenzuela, y A M Germain. 2001. «Twenty-Four-Hour Pattern of Cortisol in the Human Fetus at Term». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 184 (6): 1278-83.

Serón-Ferre, Maria, Gullermo J Valenzuela, y Claudia Torres-Farfan. 2007. «Circadian Clocks during Embryonic and Fetal Development». *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews* 81 (3): 204-14.

Serón-Ferré, María, Natalia Mendez, Lorena Abarzua-Catalan, Nelson Vilches, Francisco J. Valenzuela, Henry E. Reynolds, Aníbal J. Llanos, Auristela Rojas, Guillermo J. Valenzuela, y Claudia Torres-Farfan. 2012. «Circadian rhythms in the fetus». *Molecular and Cellular Endocrinology* 349 (1): 68-75.

Sharkey, James T, Casey Cable, y James Olcese. 2010. «Melatonin Sensitizes Human Myometrial Cells to Oxytocin in a Protein Kinase C Alpha/extracellular-Signal Regulated Kinase-Dependent Manner». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95 (6): 2902-8.

Sharkey, James T, Roopashri Puttaramu, R Ann Word, y James Olcese. 2009. «Melatonin Synergizes with Oxytocin to Enhance Contractility of Human Myometrial Smooth Muscle Cells». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94 (2): 421-27.

Signorelli, Janetti, Emilce S Diaz, y Patricio Morales. 2012. «Kinases, Phosphatases and Proteases during Sperm Capacitation». *Cell and Tissue Research* 349 (3): 765-82.

Silman, R E, R M Leone, R J Hooper, y M A Preece. 1979. «Melatonin, the Pineal Gland and Human Puberty». *Nature* 282 (5736): 301-3.

Silverthorn, F.H. (2007). *Un Enfoque Integrado* (Argentina, Editorial Médica Panamericana).

Singh, Harbindar Jeet, Hisham Ibrahim Saleh, Sergey Gupalo, y Effat Omar. 2013. «Effect of Melatonin Supplementation on Pregnancy Outcome in Wistar-Kyoto

and Sprague-Dawley Rats». *Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]* 65 (2): 149-57.

Slominski, Radomir M., Russel J. Reiter, Natalia Schlabritz-Loutsevitch, Rennolds S. Ostrom, y Andrzej T. Slominski. 2012. «Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions». *Molecular and Cellular Endocrinology* 351 (2): 152-66.

Smith, Jeremy T, y Sarah J Spencer. 2012. «Prewaning over- and Underfeeding Alters Onset of Puberty in the Rat without Affecting Kisspeptin». *Biology of Reproduction* 86 (5): 145, 1-8.

Smith-White, S., and Ojeda, S. (1981). «Changes in ovarian luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor content and in gonadotropin-induced ornithine decarboxylase activity during prepuberal and puberal development of the female rat». *Endocrinology*. 109: 152-161.

Smith-White, S., and Ojeda, S. (1984). «Maternal modulation of infantil ovarian development and available ovarian luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptors via milk (LHRH)». *Endocrinology*. 115: 1973-1983.

Sokka, T A, y I T Huhtaniemi. 1995. «Functional Maturation of the Pituitary-Gonadal Axis in the Neonatal Female Rat». *Biology of Reproduction* 52 (6): 1404-9.

Sönmez, Mustafa, Abdurrauf Yüce, y Gaffari Türk. 2007. «The Protective Effects of Melatonin and Vitamin E on Antioxidant Enzyme Activities and Epididymal Sperm Characteristics of Homocysteine Treated Male Rats». *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 23 (2): 226-31.

Srinivasan, Venkatramanujam, Warren D Spence, Seithikurippu R Pandi-Perumal, Rahima Zakharia, Kunwar P Bhatnagar, y Amnon Brzezinski. 2009. «Melatonin and Human Reproduction: Shedding Light on the Darkness Hormone». *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 25 (12): 779-85.

Swanson, L.W., and Cowan, W.M. (1975). The efferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 160, 1–12.

Takayama, Hisako, Yasuhiko Nakamura, Hiroshi Tamura, Yoshiaki Yamagata, Ayako Harada, Masahiko Nakata, Norihiro Sugino, y Hiroshi Kato. 2003. «Pineal Gland (melatonin) Affects the Parturition Time, but Not Luteal Function and Fetal Growth, in Pregnant Rats». *Endocrine Journal* 50 (1): 37-43.

Tamashiro, Kellie L K, Chantelle E Terrillion, Jayson Hyun, James I Koenig, y Timothy H Moran. 2009. «Prenatal Stress or High-Fat Diet Increases Susceptibility to Diet-Induced Obesity in Rat Offspring». *Diabetes* 58 (5): 1116-25

Tamura, Hiroshi, Yasuhiko Nakamura, M Pilar Terron, Luis J Flores, Lucien C Manchester, Dun-Xian Tan, Norihiro Sugino, y Russel J Reiter. 2008. «Melatonin and Pregnancy in the Human». *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 25 (3): 291-303.

Tamura, Hiroshi, Akihisa Takasaki, Toshiaki Taketani, Manabu Tanabe, Lifa Lee, Isao Tamura, Ryo Maekawa, Hiromi Aasada, Yoshiaki Yamagata, y Norihiro Sugino. 2014. «Melatonin and Female Reproduction». *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 40 (1): 1-11.

Tan, D.-X., Manchester, L.C., Liu, X., Rosales-Corral, S.A., Acuna-Castroviejo, D., and 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, 127–138.

Terrón, M P, J Delgado-Adámez, J A Pariente, C Barriga, S D Paredes, y A B Rodríguez. 2013. «Melatonin Reduces Body Weight Gain and Increases Nocturnal Activity in Male Wistar Rats». *Physiology & Behavior* 118 (junio): 8-13.

Thut, Gregor, Carlo Miniussi, y Joachim Gross. 2012. «The Functional Importance of Rhythmic Activity in the Brain». *Current Biology: CB* 22 (16): R658-663.

Van Drongelen, Alwin, Cécile R L Boot, Suzanne L Merkus, Tjabe Smid, y Allard J van der Beek. 2011. «The Effects of Shift Work on Body Weight Change - a Systematic Review of Longitudinal Studies». *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 37 (4): 263-75.

Van Geijlswijk, Ingeborg M, Robert H Mol, Toine C G Egberts, y Marcel G Smits. 2011. «Evaluation of Sleep, Puberty and Mental Health in Children with Long-

Term Melatonin Treatment for Chronic Idiopathic Childhood Sleep Onset Insomnia». *Psychopharmacology* 216 (1): 111-20.

Van Vuuren, R J, D J du Plessis, y J J Theron. 1988. «Melatonin in Human Semen». *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde* 73 (6): 375-76.

Van Vuuren, R J, M J Pitout, C H van Aswegen, y J J Theron. 1992. «Putative Melatonin Receptor in Human Spermatozoa». *Clinical Biochemistry* 25 (2): 125-27.

Vanecek, J, D Sugden, J Weller, y D C Klein. 1985. «Atypical Synergistic Alpha 1- and Beta-Adrenergic Regulation of Adenosine 3',5'-Monophosphate and Guanosine 3',5'-Monophosphate in Rat Pinealocytes». *Endocrinology* 116 (6): 2167-73.

Voigt, R.M., Forsyth, C.B., and Keshavarzian, A. (2013). Circadian disruption: potential implications in inflammatory and metabolic diseases associated with alcohol. *Alcohol Res. Curr. Rev.* 35, 87–96.

Waldhauser, F, P A Boepple, M Schemper, M J Mansfield, y W F Crowley Jr. 1991. «Serum Melatonin in Central Precocious Puberty Is Lower than in Age-Matched Prepubertal Children». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 73 (4): 793-96.

Wang, X.-L., Gao, X.-Q., and Wang, X.-C. (2011). Stochastic dynamics of actin filaments in guard cells regulating chloroplast localization during stomatal movement. *Plant Cell Environ.* 34, 1248–1257.

Wilkinson, M, J Arendt, J Bradtke, y D de Ziegler. 1977. «Determination of a Dark-Induced Increase of Pineal N-Acetyl Transferase Activity and Simultaneous Radioimmunoassay of Melatonin in Pineal, Serum and Pituitary Tissue of the Male Rat». *The Journal of Endocrinology* 72 (2): 243-44.

Wolden-Hanson, T, D R Mitton, R L McCants, S M Yellon, C W Wilkinson, A M Matsumoto, y D D Rasmussen. 2000. «Daily Melatonin Administration to Middle-Aged Male Rats Suppresses Body Weight, Intraabdominal Adiposity, and Plasma Leptin and Insulin Independent of Food Intake and Total Body Fat». *Endocrinology* 141 (2): 487-97.



Wu, Y.-H., Zhou, J.-N., Balesar, R., Unmehopa, U., Bao, A., Jockers, R., Van Heerikhuize, J., and Swaab, D.F. (2006). Distribution of MT1 melatonin receptor immunoreactivity in the human hypothalamus and pituitary gland: colocalization of MT1 with vasopressin, oxytocin, and corticotropin-releasing hormone. *J. Comp. Neurol.* 499, 897–910.

Zanquetta, Melissa M., Patricia M. Seraphim, Doris H. Sumida, Jose Cipollaneto, y Ubiratan F. Machado. 2003. «Calorie Restriction Reduces Pinealectomy-Induced Insulin Resistance by Improving GLUT4 Gene Expression and Its Translocation to the Plasma Membrane». *Journal of Pineal Research* 35 (3): 141-48.

Zawilska, Jolanta B, Debra J Skene, y Josephine Arendt. 2009. «Physiology and Pharmacology of Melatonin in Relation to Biological Rhythms». *Pharmacological Reports: PR* 61 (3): 383-410.

Zhao, H, S F Pang, y A M S Poon. 2002. «Variations of mt1 Melatonin Receptor Density in the Rat Uterus during Decidualization, the Estrous Cycle and in Response to Exogenous Steroid Treatment». *Journal of Pineal Research* 33 (3): 140-45.

Zhu, Jin Liang, Niels H Hjollund, Jørn Olsen, y National Birth Cohort in Denmark. 2004. «Shift Work, Duration of Pregnancy, and Birth Weight: The National Birth Cohort in Denmark». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 191 (1): 285-91.

**ANEXO 1. Ciclicidad estral de las descendientes.**

**Tabla 3.** Resultados de la ciclicidad estral de las descendientes de madres del grupo Control.

	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6	Rata 7	Rata 8	Rata 9	Rata 10
10-mar	Proestro	Diestro				Proestro	Proestro			
11-mar	Estro	Proestro	Metaestro			Proestro	Estro	Estro		
12-mar	Metaestro	Metaestro	Diestro	Estro		Estro	Metaestro	Diestro	Metaestro	Diestro
13-mar	Diestro	Diestro	Proestro	Diestro		Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro
14-mar	Estro	Diestro	Estro	Diestro	Metaestro	Proestro	Diestro	Diestro	Proestro	Estro
15-mar										
16-mar										
17-mar	Metaestro	Proestro	Diestro	Estro	Estro	Proestro	Estro	Estro	Diestro	Diestro
18-mar	Diestro	Diestro	Proestro	Estro	Diestro	Estro	Diestro	Metaestro	Diestro	Estro
19-mar	Proestro	Diestro	Estro	Diestro	Metaestro	Metaestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Estro
20-mar	Estro	Proestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Proestro	Proestro	Estro	Diestro
21-mar	Estro	Estro	Diestro	Diestro	Proestro	Estro	Estro	Estro	Proestro	Metaestro
22-mar										
23-mar										
24-mar			Metaestro	Diestro	Diestro			Proestro	Proestro	Diestro
25-mar				Diestro	Proestro				Estro	Diestro
26-mar					Estro					
27-mar				Diestro	Diestro					

**Tabla 4.** Resultados de la ciclicidad estral de las descendientes de madres del grupo LL.

	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6	Rata 7	Rata 8	Rata 9	Rata 10
<b>21-abr</b>	Diestro	Estro	Proestro	Diestro	Proestro	Metaestro	Estro	Diestro	Metaestro	Estro
<b>22-abr</b>	Proestro	Metaestro	Estro	Diestro	Estro	Proestro	Diestro	Proestro	Proestro	Diestro
<b>23-abr</b>	Estro	Diestro	Estro	Proestro	Metaestro	Proestro	Diestro	Estro	Estro	Diestro
<b>24-abr</b>	Diestro	Proestro	Diestro	Estro	Diestro	Estro	Proestro	Diestro	Metaestro	Proestro
<b>25-abr</b>	Diestro	Estro	Proestro	Diestro	Proestro	Diestro	Estro	Diestro	Metaestro	Estro
<b>26-abr</b>	Proestro	Metaestro	Estro	Diestro	Estro	Diestro	Metaestro	Proestro	Proestro	Metaestro
<b>27-abr</b>	Estro	Diestro	Metaestro	Proestro	Diestro	Proestro	Diestro	Estro	Estro	Diestro
<b>28-abr</b>	Estro	Proestro	Diestro	Estro	Proestro	Estro	Proestro	Diestro	Proestro	Proestro
<b>29-abr</b>	Diestro	Estro	Proestro	Metaestro	Proestro	Diestro	Estro	Diestro	Metaestro	Estro
<b>30-abr</b>	Proestro	Metaestro	Estro	Diestro	Estro	Diestro	Metaestro	Proestro	Estro	Diestro

**Tabla 5.** Resultados de la ciclicidad estral de las descendientes del grupo LL+MEL.

	<b>Rata 1</b>	<b>Rata 2</b>	<b>Rata 3</b>	<b>Rata 4</b>	<b>Rata 5</b>	<b>Rata 6</b>
<b>24-mar</b>	Proestro	Estro				
<b>25-mar</b>	Proestro	Estro	Estro	Estro		
<b>26-mar</b>	Proestro	Estro	Estro	Estro	Estro	Estro
<b>27-mar</b>	Estro	Metaestro	Diestro	Estro	Estro	Proestro
<b>28-mar</b>	Estro	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Estro
<b>29-mar</b>						
<b>30-mar</b>						
<b>31-mar</b>	Metaestro	Estro	Estro	Proestro	Proestro	Proestro
<b>01-abr</b>	Estro	Estro	Proestro	Estro	Estro	Estro
<b>02-abr</b>	Estro	Metaestro	Metaestro	Estro	Estro	Estro
<b>03-abr</b>	Estro	Diestro	Proestro	Metaestro	Metaestro	Metaestro
<b>04-abr</b>	Estro	Diestro	Estro	Estro	Proestro	Proestro
<b>05-abr</b>						
<b>06-abr</b>						
<b>07-abr</b>			Estro	Diestro	Metaestro	Diestro
<b>08-abr</b>					Metaestro	Diestro

## ANEXO 2. Porcentaje de espermatozoides móviles totales de cada macho.

**Tabla 3.** Porcentaje de espermatozoides móviles totales de cada macho del grupo Control a las concentraciones de melatonina estudiadas (0mM, 10mM y 30mM) durante dos horas (tiempos de observación: t=0 minutos, t=30 minutos, t=60 minutos, t=90 minutos y t=120 minutos).

Rata	Concentración	Tiempo				
		t=0	t=30	t=60	t=90	t=120
Macho 1	0mM	40	5	2	0	0
	10mM	70	70	50	0	0
	30mM	70	1	1	0	0
Macho 2	0mM	2	1	0	0	0
	10mM	40	80	70	50	40
	30mM	70	80	60	5	5
Macho 3	0mM	0	0	1	1	0
	10mM	0	2	5	5	5
	30mM	0	10	0	1	5
Macho 4	0mM	0	0	0	1	0
	10mM	0	5	1	1	1
	30mM	0	1	0	0	0
Macho 5	0mM	15	1	1	1	1
	10mM	40	40	40	30	20
	30mM	20	1	0	0	0
Macho 6	0mM	5	5	10	1	5
	10mM	70	10	50	80	40
	30mM	70	30	70	10	0
Macho 7	0mM	1	1	1	1	5
	10mM	10	60	20	30	70
	30mM	10	20	5	5	0
Macho8	0mM	10	1	1	5	1
	10mM	70	80	80	60	15
	30mM	70	60	70	80	1

**Tabla 4.** Porcentaje de espermatozoides móviles totales de cada macho del grupo LL a las concentraciones de melatonina estudiadas (0mM, 10mM y 30mM) durante dos horas (tiempos de observación: t=0 minutos, t=30 minutos, t=60 minutos, t=90 minutos y t=120 minutos).

Rata	Concentración	% Móviles				
		t=0	t=30	t=60	t=90	t=120
Macho 1	0mM	40	40	5	1	0
	10mM	70	90	80	50	30
	30mM	50	60	40	0	0
Macho 2	0mM	50	5	5	1	1
	10mM	30	80	80	70	30
	30mM	50	40	70	50	1
Macho 3	0mM	10	0	1	1	1
	10mM	60	40	90	20	15
	30mM	40	50	50	50	30
Macho 4	0mM	20	0	0	0	1
	10mM	40	50	40	40	20
	30mM	40	40	30	40	5
Macho 5	0mM	15	0	0	1	1
	10mM	70	80	40	60	60
	30mM	60	70	50	40	10
Macho6	0mM	70	0	1	1	1
	10mM	80	90	80	20	50
	30mM	70	5	1	1	1
Macho 7	0mM	50	1	1	1	1
	10mM	60	20	10	40	15
	30mM	40	5	30	0	5

**Tabla 5.** Porcentaje de espermatozoides móviles totales de cada macho del grupo LL+MEL a las concentraciones de melatonina estudiadas (0mM, 10mM y 30mM) durante dos horas (tiempos de observación: t=0 minutos, t=30 minutos, t=60 minutos, t=90 minutos y t=120 minutos).

Rata	Concentración	% Móviles				
		t=0	t=30	t=60	t=90	t=120
Macho 1	0mM	40	70	30	10	5
	10mM	70	70	90	70	60
	30mM	70	20	0	0	0
Macho 2	0mM	1	0	5	1	1
	10mM	40	40	70	60	60
	30mM	30	60	20	20	20
Macho 3	0mM	20	0	10	30	1
	10mM	30	90	90	70	60
	30mM	50	70	0	5	0
Macho 4	0mM	70	0	5	15	1
	10mM	70	70	80	60	30
	30mM	60	0	0	0	0
Macho 5	0mM	40	0	0	0	1
	10mM	40	60	50	50	30
	30mM	30	30	0	0	0
Macho 6	0mM	10	0	1	0	1
	10mM	30	80	80	80	5
	30mM	70	60	60	40	0
Macho 7	0mM	5	0	0	0	60
	10mM	20	60	70	50	50
	30mM	1	50	50	1	40
Macho 8	0mM	40	30	30	20	1
	10mM	90	60	80	60	40
	30mM	90	70	0	1	0