

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA
DE ENZIMAS LIGADAS A LA SÍNTESIS DE MELATONINA EN EL
TRACTO REPRODUCTOR DE MORUECO**

Memoria presentada por la alumna Ana Elena Gaspar Torrubia para optar al
título de Graduada en Biotecnología por la Universidad de Zaragoza

Dirigida por:

José Álvaro Cebrián Pérez

Adriana Casao Gascón

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

Facultad de Veterinaria

ÍNDICE

Resumen español	2
Resumen inglés	3
Antecedentes	4
Objetivos y planteamiento del trabajo	8
Material y métodos	9
<i>Expresión génica de AANAT y ASMT en tejidos del tracto reproductor del macho ovino</i>	9
<i>Obtención de tejidos</i>	9
<i>Aislamiento y limpieza del RNA total</i>	9
<i>Síntesis de cDNA</i>	10
<i>Amplificación de cDNA</i>	11
<i>q-PCR</i>	12
<i>Western-blot</i>	13
<i>Extracción de proteínas</i>	13
<i>SDS PAGE e Immunoblotting</i>	13
Resultados	
<i>Expresión génica de AANAT y ASMT en el tracto reproductor</i>	14
<i>Obtención de RNA y cDNA</i>	14
<i>AANAT</i>	15
<i>ASMT</i>	16
<i>q-PCR</i>	16
<i>Inmunodetección de las enzimas</i>	18
<i>AANAT</i>	18
<i>ASMT</i>	19
Discusión	20
Conclusiones	22
Bibliografía	23

RESUMEN

La hormona melatonina es una de las sustancias biológicamente activas más antiguas de los organismos vivos, y su función principal es la defensa antioxidante. Su síntesis es principalmente llevada a cabo por la glándula pineal durante la noche, y su concentración en plasma sanguíneo es prácticamente nula durante el día.

Estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación han determinado su presencia en plasma seminal ovino de manera constante y en, algunos momentos, en concentraciones superiores a las detectadas en sangre. Este hecho podía explicarse por la síntesis de esta hormona en el tracto reproductor del morueco, independiente de los ciclos de luz y oscuridad.

Con el fin de dilucidar la existencia de esta posible síntesis en el tracto genital masculino, se llevaron a cabo una serie de estudios en los distintos tejidos del aparato reproductor (testículo, epidídimo y glándulas accesorias), centrados en demostrar la existencia de las dos enzimas principales de la síntesis: serotonina -N-acetiltransferasa (AANAT) y N-acetilserotonin-O-metiltransferasa (ASMT). Mediante RT-PCR se demostró la expresión génica de dichas enzimas en todos los tejidos estudiados, y la q-PCR permitió comprobar que es mucho mayor en el testículo que en los demás tejidos. Por otra parte, mediante Western-blot se demostró la traducción y presencia de estas dos enzimas en todos los tejidos, lo que implica la existencia activa de un proceso de síntesis de melatonina en el tracto reproductor del morueco, principalmente en testículo.

La importancia de dichos resultados radica en la existencia de la ruta de síntesis de melatonina y que su presencia en plasma seminal es un factor importante a la hora de determinar la supervivencia y maduración de las células espermáticas, aspecto fundamental en la capacidad fecundante, máxime si se considera que esta hormona va a ser transferida al tracto genital femenino tras la eyaculación.

ABSTRACT

The hormone melatonin is one of the oldest active biological substances of live organisms, and one of his mainly function is antioxidant defense, but it has gone acquiring different functions during the evolutionary process, highlighting, between them, its chemotactic effect. Melatonin synthesis is mainly carry out by pineal gland during the night, and his concentration in blood plasma is negligible during the day.

Researches carried out by our group have determined its presence in ram seminal plasma during light-day periods and, sometimes, in concentrations higher than those detected in blood. This fact could be explained by the synthesis of this hormone in the ovine reproductive tract, independent of light and darkness cycles.

In order to elucidate the possible existence of this synthesis in the male genital tract, were conducted a series of studies in various reproductive tissues (testis, epididymis and accessory glands), focusing on proving the existence of the two main synthesis

enzymes: serotonin-N-acetyltransferase (AANAT) and Nacetylserotonin-O-metiltransferase (ASMT). RT-PCR results demonstrate the gene expression of these enzymes in all the tissues studied, and q-PCR assays have allowed verifying that expression it's higher in the testicle than in the rest of tissues. Moreover, by Western-blot it was demonstrated the translation and presence of this two enzymes in all the tissues, which implies the active existence of a melatonin synthesis process in the ram reproductive tract, mainly in testicle.

The importance of these results lies in the existence of melatonin synthesis pathway and that its presence in seminal plasma is an important factor in determining the survival and maturation of sperm cells, which would give it a direct role on the fertilizing capacity, especially considering that this hormone will be transferred to the female genital tract after ejaculation.

ANTECEDENTES

La melatonina ha estado presente en los organismos vivos desde las primeras etapas de la evolución, hecho que le ha permitido evolucionar funcionalmente a la par que la vida (Cebrian-Perez et al. 2014). Por esta razón, y su versatilidad química, esta pequeña molécula ha adquirido una gran variedad de funciones biológicas diferentes que la convierten en una hormona fundamental en la fisiología de la mayor parte de los organismos.

Un hecho característico de la melatonina es que una de sus principales funciones biológicas en la actualidad, la defensa antioxidante frente a los daños producidos por radicales libres de oxígeno, es también una de las más antiguas, ya vigente en organismos unicelulares primitivos y que no se ha visto relegada por las nuevas funciones adquiridas (Tan et al. 2010).

A su vez, durante la evolución ha adquirido otras funciones, como la regulación del fotoperiodo y los ritmos circadianos, la actividad sexual en pájaros, peces y algunos mamíferos, la inmunomodulación, la regulación de la inflamación, la estacionalidad reproductiva en algunos mamíferos en función del fotoperiodo, o incluso está relacionada con el reloj biológico de los seres vivos puesto que la disminución de la producción de melatonina durante el envejecimiento es señal de senescencia en muchos organismos (Tan, Hardeland et al. 2010).

Dicha pluralidad de funciones puede atribuirse, entre otras causas, a un metabolismo poco convencional, que incluye múltiples enzimas y vías no específicas. Además, se está empezando a sugerir que parte de las funciones anteriormente atribuidas a la melatonina podrían ser desempeñadas también por los metabolitos generados de su degradación, lo que aun ampliaría más el espectro de actuación de la misma (Mayo et al. 2005).

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina, es un derivado del aminoácido triptófano cuya síntesis se realiza principalmente en la glándula pineal en una reacción que consta de cuatro pasos (Figura1). En primer lugar se produce la transformación de triptófano en 5-hidroxitriptófano por acción de la Triptófano-5-monooxigenasa (T5M); este pasa a 5-hidroxitriptamina o serotonina por acción de la Aromatic-L-amino-acid descaboxilasa (AAAD); la serotonina es acetilada a N-acetilserotonina por acción de la serotonin-N-acetiltransferasa (AANAT) y finalmente la Hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), también denominada N-acetylserotonin-O-methyltransferasa (ASMT) cataliza su paso a melatonina. (Boutin et al. 2005)

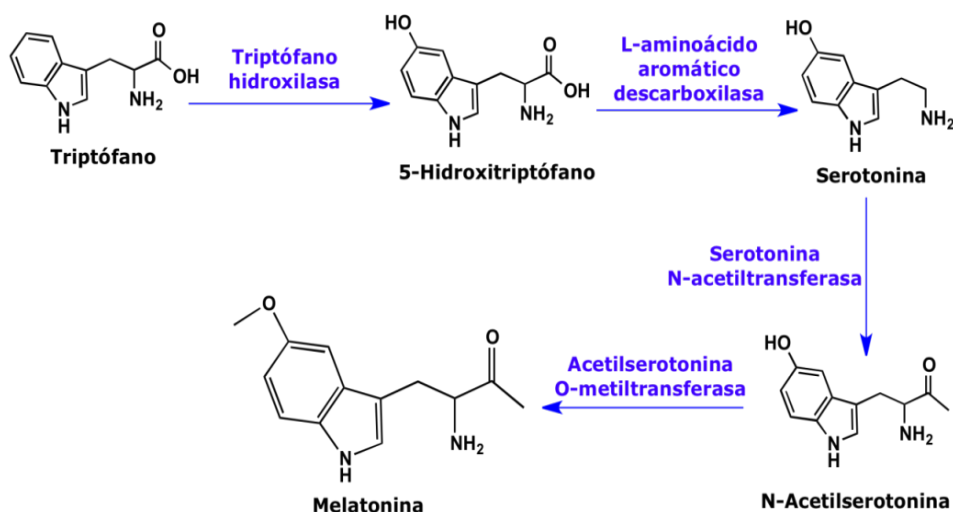


Figura 1: Ruta de la síntesis de melatonina a partir del aminoácido triptófano.

Hay dos pasos limitantes en la síntesis de melatonina: El primero se debe al carácter saturable de la Triptófano-5-monooxigenasa, y el segundo, regulador del ritmo de secreción de la melatonina, es la actividad de la AANAT. La actividad de la ASMT en la oveja no sufre oscilación bajo diferencias de luz y oscuridad. Sin embargo, también controla el nivel de producción de la melatonina por realizar la conversión final de N-acetilserotonina, por metilación del grupo hidroxilo en posición 5 prima del anillo indólico, a melatonina, utilizando como donador de grupos metilo a la S-Adenosil Metionina o SAM (Zarazaga et al 2000).

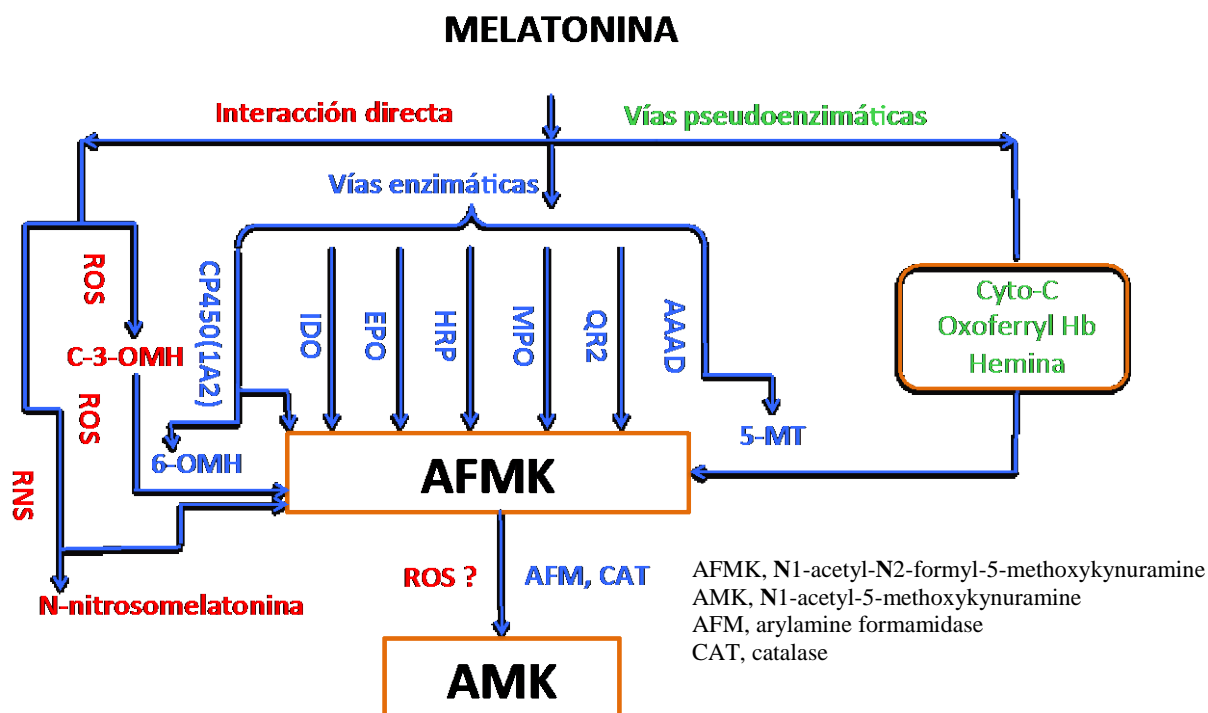


Figura 2: Posibles rutas de degradación de la melatonina

Sólo un pequeño porcentaje de la melatonina secretada por la glándula pineal permanece sin degradarse, mientras que el resto es metabolizado en un proceso parcialmente inducido por la luz. En su metabolismo interviene varias rutas alternativas (Figura 2), dentro de las cuales la principal es llevada a cabo por el citocromo P450 1A2. La expresión de miembros de la familia de genes del citocromo P450 está regulada por el reloj biológico, de manera que está controlado en parte por la propia melatonina (Froy 2009). Otra ruta alternativa de degradación sería por la acción enzimática de mieloperoxidasa (MPO), indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO), eosinofil-peroxidase (EPP) y horseradish-peroxidase (HRP).

También, y contrariamente a lo que se creyó durante mucho tiempo, se ha demostrado biosíntesis de melatonina en otros tejidos distintos de la glándula pineal como la retina (CARDINALI and ROSNER 1971), las glándulas salivares (Shimozuma et al. 2011), la glándula harderiana (Cardinali and Wurtman 1972), el hígado (Tan et al. 1999), el intestino (Bubenik 2002), los ovarios (Brzezinski et al. 1987), la placenta (Lanoix et al. 2008) y otros órganos (Acuña-Castroviejo et al. 2014).

Una de las principales funciones de la melatonina es su papel como regulador de la reproducción en animales estacionales, entre los que se incluye la especie ovina. Esta regulación es llevada a cabo mediante cambios en los niveles de melatonina endógena secretada por la glándula pineal durante el periodo de oscuridad (Zarazaga et al. 2000). Estos cambios en los niveles de melatonina nocturna modulan la actividad del eje hipotálamo/hipofisario/gonadal, lo que se traduce en una modulación de la actividad ovárica en hembras y la producción de espermatozoides en machos (Malpoux et al. 1997, Malpoux et al. 1999, Misztal et al. 2002).

En relación a si la melatonina actúa como estimulador o inhibidor del eje hipotálamo/hipofisario/gonadal se definen dos grupos de organismos: los reproductores de días cortos y de días largos. La especie ovina pertenece al grupo de los reproductores de días cortos, de manera que la secreción de melatonina durante las noches largas de otoño e invierno tiene un efecto estimulador en su reproducción. Durante la época no reproductiva, en primavera y verano, la calidad seminal, la libido y la fertilidad de los moruecos caen, lo cual se ha asociado a una menor actividad del eje hipotálamo/hipófisis/testículo (Schanbacher and Lunstra 1976, Lincoln et al. 1990).

De hecho, el tratamiento con melatonina exógena de los machos ovinos durante la estación no reproductiva revierte parcialmente estos efectos (Kaya et al. 2000, Palacín et al. 2008), aumentando los niveles de testosterona (Lincoln and Ebling 1985, Webster et al. 1991, Kokolis et al. 2000), mejorando el comportamiento sexual (Rosa et al. 2000), la calidad del espermatozoides y de los parámetros testiculares (Coyan et al. 1998), y aumentando la espermatogénesis y la fertilidad (Palacín, Abecia et al. 2008, Casao et al. 2010, Rosa et al. 2012). Sin embargo, la incubación de espermatozoides, ovinos y de otras especies, con melatonina, sugiere que esta hormona también tiene un efecto directo sobre la célula espermática.

Son muchos los estudios que demuestran a día de hoy los efectos positivos de la melatonina sobre los espermatozoides, principalmente por sus acciones antioxidantes. Se ha demostrado un aumento de la motilidad en estudios in vitro, disminución del daño oxidativo producido por ROS y NO (Rao and Gangadharan 2008, Du Plessis et al. 2010, Jang et al. 2010), una disminución en los marcadores de apoptosis (Espino et al. 2011), y un efecto discapacitante (Casao et al. 2010). Además, los receptores para melatonina MT1 y MT2, han sido identificados en la membrana plasmática del espermatozoide (Casao et al. 2012), lo que sugiere un efecto directo de esta hormona sobre la célula espermática.

Los espermatozoides podrían entrar en contacto con la melatonina durante su formación en el testículo y/o su maduración en el epidídimo, o bien en el momento de la eyaculación al mezclarse con el plasma seminal. El semen eyaculado está compuesto por los espermatozoides producidos en los testículos, diluidos en una fracción líquida denominada plasma seminal (Senger et al 1997)

Se ha demostrado la presencia de melatonina en numerosos órganos y recientemente en el plasma seminal (Casao et al. 2009). En la especie ovina, las concentraciones de melatonina en este fluido son superiores a los niveles plasmáticos, están presentes en horas diurnas y sufren variaciones estacionales (Casao et al. 2009). Por tanto, es posible que los altos niveles de melatonina detectados en plasma seminal ovino se deban a la síntesis de esta hormona por algún órgano de tracto reproductor del macho. Esta hipótesis avalaría, en gran medida, el efecto descrito para esta hormona sobre la maduración y calidad espermáticas, pudiendo así mismo, tener implicaciones en algunos de los procesos fisiológicos posteriores que tienen lugar en el tracto genital femenino, tras la eyaculación.

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

La melatonina es una hormona ampliamente distribuida en todos los organismos y su síntesis en mamíferos ha sido principalmente atribuida a la glándula pineal. Aunque, actualmente se han encontrado evidencias de su síntesis en otros tejidos, además de su presencia en fluidos biológicos distintos al plasma sanguíneo, como es el caso del plasma seminal ovino.

Investigaciones anteriores, demuestran la presencia de melatonina en altas concentraciones en el plasma seminal durante el día (Casao et al. 2010a), lo que conceptualmente llevaría a dos posibles hipótesis:

- a- La melatonina nocturna secretada por la glándula pineal sea transportada al plasma seminal y se acumule allí sin metabolizarse
- b- Que exista una secreción extrapineal de melatonina en alguno de los tejidos y/o glándulas del sistema reproductor del macho.

Hay que tener en cuenta también que, en general, la melatonina es una hormona con una vida media muy corta, y que en el sistema circulatorio es rápidamente metabolizada (Gibbs and Vriend 1981) lo cual sugiere que es más plausible la segunda hipótesis, explicando mejor los datos obtenidos sobre los niveles de esta hormona en el plasma seminal ovino durante el día y la noche (Casao et al. 2010).

Por ello, se analizará la posible presencia de las enzimas implicadas en la síntesis de melatonina en los tejidos y glándulas del tracto genital masculino (ovino), tanto a nivel genético, como a nivel molecular, centrando estos estudios en testículo, epidídimo y glándulas accesorias del morueco. Las enzimas a estudiar son las dos más relevantes de la síntesis de melatonina, y las que catalizan los dos procesos últimos que intervienen en su síntesis: Arilalquilamina n-acetiltransferasa (AANAT) e N-acetylserotonin-O-methyltransferasa (ASMT). Su presencia se estudiará en los distintos tejidos del aparato reproductor del macho: testículo anterior y posterior, cabeza, cuerpo y cola de epidídimo, ampolla deferente, próstata, vesícula seminal, conducto deferente y glándulas bulbouretrales.

A nivel transcripcional, esta identificación se hará tanto a nivel cualitativo, con RT-PCR, como cuantitativo, con una q-PCR. Para ello, en primer lugar se extraerá el RNA de los distintos tejidos, y se procederá a su purificación y retrotranscripción, obteniendo así el cDNA correspondiente, con el que se llevará a cabo la RT-PCR y q-PCR, utilizando primers específicos para las dos enzimas.

La presencia de estas enzimas a nivel molecular se realizará mediante la técnica inmunoquímica de Western-blot. Los pasos para ello también consistirán en extracción de las proteínas de cada tejido y su posterior detección mediante anticuerpos específicos.

PARTE EXPERIMENTAL: MATERIAL Y MÉTODOS

EXPRESIÓN GENICA DE AANAT Y ASMT EN TEJIDOS DEL TRACTO REPRODUCTOR DEL MACHO OVINO

OBTENCIÓN DE TEJIDOS

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

AISLAMIENTO Y LIMPIEZA DEL RNA TOTAL

El RNA total fue extraído de los diferentes tejidos del tracto reproductor masculino por homogenización de 300 mg de tejido en TRI REAGENT (Sigma) según el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). La concentración de RNA se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm en un NanoDrop ND-100 Spectrophotometer (Wilmington Delaware). También se comprobó que la relación entre absorbancias a 260/280 nm fuera mayor a 1,2 para comprobar que el RNA extraído estuviera libre de proteínas. La calidad del RNA se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE (10.8g/L TRIS base, 0.4% de EDTA y 5.5 g/L de Ácido bórico) con bromuro de etidio en concentración 200 ng/ml. Los geles se corrieron en 1X TBE a 80 V durante 30 min (EPS 1000, Pharmacia Biotech) tras lo cual se visualizaron en luz ultravioleta (Gel Doc, Biorad Laboratorios, Hercules, California) para visualizar la integridad de las bandas del RNA ribosómico 28S Y 18S.

La eliminación de restos de DNA en el RNA se llevó a cabo por medio del kit TURBO DNA-free de Ambión. El volumen de reacción fue 50µL compuestos por: 5 µL de buffer, 1 µL de enzima, 10 µg de RNA (se calcula el volumen necesario dependiendo de la concentración de cada muestra) y agua DEPC hasta 50 µL. Se incubó a 37°C durante 30 minutos, tras lo cual se añadió 5 µL de DNase Inactivation Reagent. Se dejó 2 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 1.5 minutos a 10000 xg y se recogió el sobrenadante. Se midió la concentración con el nanodrop y se guardó a -80°C.

SÍNTESIS DE cDNA

El cDNA se obtuvo a partir del RNA de diferentes tejidos del tracto reproductor masculino mediante retrotranscripción con el kit Super Script III First-Strand Síntesis System (Invitrogen, Carlsbad, California). Para ello, 500 ng de RNA total se sometieron a retrotranscripción usando como primers Oligo (dT) y la enzima SuperScript III RT. El proceso consistió en una primera desnaturalización del RNA, del primer Oligo (dT) y de

los dNTPs a 65° C durante 5 min, tras lo cual se añadió la mezcla de reacción que contiene tampón de RT, MgCl₂, DTT, RNaseOUT y la enzima SuperScript III RT. La síntesis del cDNA se llevó a cabo a 50° C durante 5 min, terminando la reacción a 85° C durante 5 min. Para eliminar las trazas de RNA no transcritas a cDNA se trató con RNase H e incubó a 37° C durante 20 min. Todos los pasos se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler (Biorad). Los cDNA obtenidos se almacenaron a -20° C hasta su uso o se utilizaron para PCR inmediatamente.

Para comprobar el estado del cDNA obtenido en todos los tejidos se realizó una PCR del gen endógeno GAPDH.

Se realizó utilizando la REDTaq DNA Polymerase de SIGMA. Los primers utilizados fueron: (Forward primer: **GCTGGTGCCCTTTTACCAGA**; Reverse Primer: **CAGTGCATCTCCGTGAAGGT**, de 90bp)

Para minimizar errores de pipeteo se hizo un mix con los compuestos necesarios para la PCR. Cada muestra constará de 48 µL del mix y 2 µL de cDNA o agua para el control negativo. Para las 13 muestras y el negativo se realizó el siguiente mix:

	1x	14,5x
H ₂ O	36.9 µl	535.05 µl
BUFFER	5 µl	72.5 µl
dNTPs	0.4 µl	5.8 µl
PF	1.6 µl	23.5 µl
PR	1.6 µl	23.5 µl
Taq	2.5 µl	36.25 µl
TOTAL	48 µl	696,6 µl

Tabla 1: Mix de reacción para la PCR de GAPDH

Se añadieron 48 µl del mix y 2 µl de cDNA o en el caso del negativo 48 µl de mix y 2 de agua DNase/RNase Free.

Las condiciones de la PCR en el termociclador (S1000TM Thermal Cycler with Dual 48/48 Fast Reaction Module#185-2148, Biorad, España) fueron: desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos, tras lo cual se suceden 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 45 segundos. Al terminar los ciclos se realizó una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

Una vez terminada la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE (89 mM TRIS base, 2 mM EDTA y 89 mM ácido bórico) con bromuro de etidio (0.5 µl/ml) durante 45 minutos a 100 V y 2 µl de un marcador de 50bp para comprobar el resultado.

AMPLIFICACIÓN DEL c-DNA PARA LA IDENTIFICACION DE AANAT Y ASMT

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

	1X	13x
Agua libre de nucleasas	34,4 μL	447.2 μL
Buffer 10x	5 μL	65 μL
dNTP mix 25 μM	0,4 μL	5.2 μL
Primer directo 10 μM	2,5 μL	32.5 μL
Primer reverso 10 μM	1,6 μL	20.8 μL
DMSO 10%	1,6 μL	20.8 μL
RED Taq DNA Polymerasa	2,5 μL	32.5 μL
Volumen total:	48 μL	600 μL

Tabla 2: Mix de reacción para la amplificación de AANAT y ASMT

Para cada enzima los primers fueron diseñados utilizando primer-BLAST (NCBI) y comprobando por análisis BLAST (NCBI) para verificar la especificidad génica. Los primers utilizados fueron: para AANAT (Forward primer: GCTGGTGGCCCTTTTACCAGA; Reverse Primer: CAGTGCATCTCCGTGAAGGT, de 90bp) y para ASMT (Forward primer: CTGCAGAGACTGTATCGGGC; Reverse primer: GAGTACAGCAGCGTGGTCAG, de 104 bp).

La PCR se llevó a cabo con el cDNA obtenido anteriormente. En primer lugar se realizó la desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, tras lo cual se sucedieron 35 ciclos de 95°C durante un minuto, 53°C durante 1 minuto y 72°C durante 30 segundos. Al terminar el ciclo se sucedieron 15 minutos para la extensión de las cadenas. Las muestras no utilizadas se conservaron a -20°C.

Los productos de la amplificación se separaron mediante un gel de agarosa al 2% en buffer 1xTris-borato-EDTA (TBE) con un 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de bromuro de etidio y el resultado se visualizó con luz ultravioleta.

q-PCR

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

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

La eficiencia de cada medida se calcula como: $E = 10(-1/S) - 1$, siendo S la pendiente de la curva estándar. La curva estándar es 0.99

Una vez obtenidas la curva de eficiencia y elegida la concentración óptima de primers (en este caso fue PF300/PR300 para la GAPDH y β -Actina y PF400/PR400 para AANAT y ASMT) se llevó a cabo la q-PCR para cada uno de los genes diana con todos los tejidos del estudio y la glándula pineal como control positivo. Para la cuantificación de los resultados se utilizó el método Pfaffl (Pfaffl, M.W., 2001, Nucleic Acids Res. 29(9):e45).

DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE TEJIDOS POR WESTERN BLOTTING

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LOS TEJIDOS

La extracción de proteínas en los distintos tejidos se hizo siguiendo el mismo procedimiento en todas las muestras: se partió de una porción de unos 300 mg aproximadamente para cada tejido, que se mantuvo en nieve carbónica para evitar la desnaturalización de las proteínas, se añadieron a continuación 3 ml de medio de extracción (125 mM de Tris-HCl pH 6.8, 4% de SDS (v/v), 10% (v/v) de inhibidor de proteasas 10x comeren agua ADDE) y se homogeneizaron con el homogeneizador de tejidos Ultra Turrax (IKA T25 Digital Ultra-Turrax((R) Homogenizer, IKA, Germany / Deutschland).

El homogeneizado se centrifugó a 13000xg, 5 minutos, a 4 °C y se extrajo el sobrenadante. A cada muestra se le añadió 0.02% de bromofenol de azul de bromofenol, 1 % de glicerol al 20% (v/v) y 5% de β -mercaptoetanol por cada 100 μ l y se alicuotó. Posteriormente se congeló a -20°C hasta su evaluación.

SDS-PAGE e INMUNOBLOTTING

Se utilizó el mismo protocolo para todas las proteínas estudiadas. Se utilizaron geles del 12% de acrilamida y de grosor 1,5 mm y 15 pocillos. Las proteínas se separaron en una dimensión siguiendo el método Laemmli (Laemmli, 1970), utilizando patrones de comparación de pesos moleculares, de 10 a 250 kDa (Sigmamarker, Sigma). Las condiciones de electroforesis fueron 135 V durante 90 min. a 4° C.

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF utilizando el Trans-blot Turbo (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Una vez transferidas las proteínas, los sitios no específicos de unión de las membranas se bloquearon incubándolas 4 horas en Tween-PBS (136 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10.1 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄ y) con 5% (p/v) BSA.

La detección de AANAT se realizó mediante la incubación durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario policlonal Anti-Serotonin N-acetyltransferase antibody (Abcam, Reino Unido), y ASMT mediante el anticuerpo anti-ASMT (Santa Cruz Biothecnology), ambos en una dilución 1:1000 en PBS-Tween-20 (0.5 % (v/v) de Tween-20, pH 7.4 en PBS; PBST) con BSA al 1% (p/v).

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

RESULTADOS

EXPRESIÓN GENICA DE AANAT Y ASMT EN TEJIDOS DEL TRACTO REPRODUCTOR DEL MACHO OVINO

OBTENCIÓN DE RNA Y c-DNA

Las concentraciones de RNA de cada tejido obtenidas tras su extracción y limpieza se muestran en la tabla 1:

Tabla 1: Concentración de RNA obtenido en los distintos tejidos del tracto reproductor del morueco y control positivo (glándula pineal)

Cuerpo de epidídimo	202.1 ng/ μ l	Cabeza de epidídimo	221 ng/ μ l
Cola de epidídimo	195.6 ng/ μ l	Glándulas bulbouretrales	235,1 ng/ μ l
Ampolla deferente	175.8 ng/ μ l	Testículo anterior	217 ng/ μ l
Próstata	225 ng/ μ l	Testículo posterior	217.1 ng/ μ l
Vesícula seminal	220.1 ng/ μ l	Glándula pineal	249.6 ng/ μ l
Conducto deferente	238,05 ng/ μ l		

Tras su limpieza y la posterior síntesis de c-DNA, los resultados de la retrotranscripción se comprobaron mediante una PCR del gen constitutivo de **GAPDH**, para comprobar el buen estado del cDNA con el que se va a trabajar posteriormente:

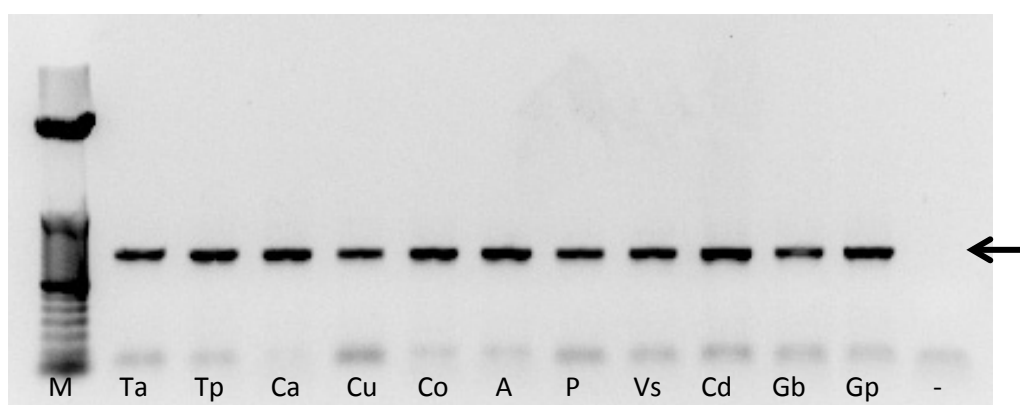


Figura 3: Expresión génica de GAPDH, evaluada por RT-PCR, en testículo anterior (Ta), testículo posterior (Tp), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) de epidídimo, ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (Vs), conducto deferente (Cd), glándulas bulbouretrales (Gb), glándula pineal (Gp), control negativo.

El resultado de esta PCR nos confirmó el buen estado de todos los c-DNA obtenidos, ya que se obtuvo una banda clara, la correspondiente a la amplificación deseada de GAPDH en todas las muestras a excepción del negativo. Una vez demostrada la validez del cDNA obtenido, se puede proceder a su utilización para la amplificación de los fragmentos correspondientes a las dos enzimas de síntesis buscadas, AANAT e ASMT.

AANAT

El resultado obtenido tras la PCR con los primers específicos para AANAT a partir de los c-DNA obtenidos a partir de los tejidos del tracto reproductor del morueco se muestra en la figura 4:

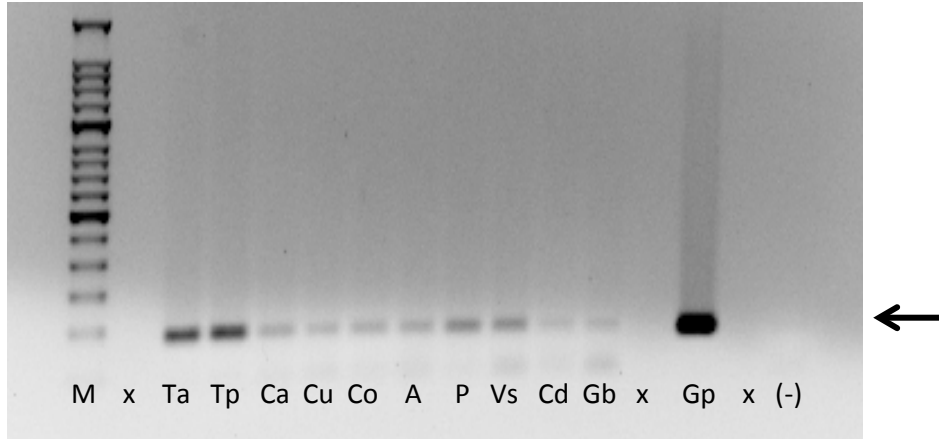


Figura 4: Expresión génica de AANAT, evaluada por RT-PCR, testículo anterior (Ta), testículo posterior (Tp), cabeza (Ca), cuerpo (Cu), cola (Co), ampolla (A), próstata (P), vesícula (Vs), conducto deferente (Cd), glándulas (Gb), vacío (x), pineal (Gp), y control negativo (-).

Mediante RT-PCR se obtuvo una banda de 90 pb en todos los tejidos estudiados, correspondiente a la amplificación del fragmento de la AANAT. De igual forma, no se obtuvo ningún fragmento de amplificación en el control negativo. De esta manera se demuestra la existencia en todos los tejidos del tracto reproductor del morueco la presencia de mRNA codificante para la síntesis de AANAT,.

Además, la RT-PCR también mostró unas intensidades de bandas distintas en los distintos tejidos, que podría deberse a calidad y cantidad de cDNA obtenido, pero también la cantidad de enzima que se esté expresando en cada tejido, lo que explicaría la gran intensidad de banda obtenida en la glándula pineal, nuestro control positivo. De esta forma, estos resultados parecen indicar que la síntesis de AANAT es mayor en el testículo que en el resto de los tejidos del tracto reproductor, por lo que es necesario un posterior estudio cuantitativo mediante q-PCR para corroborar este dato.

ASMT

Los resultados obtenidos en la RT-PCR para ASMT se muestran en la figura 5:

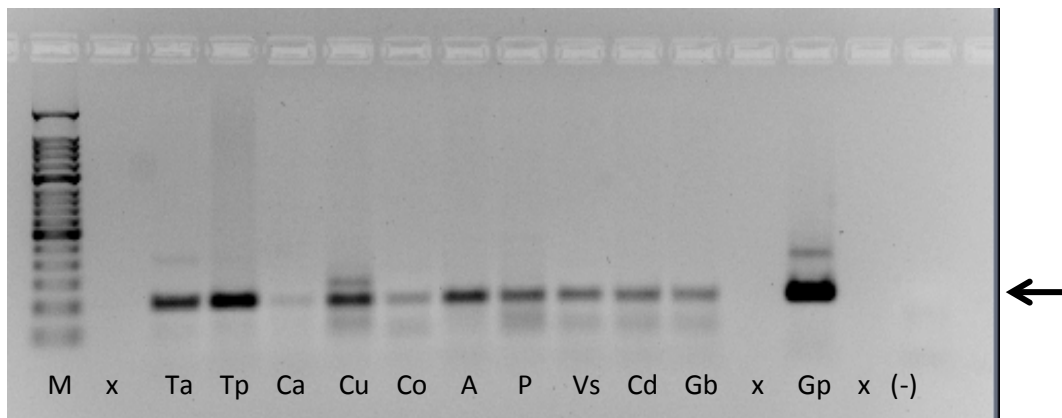


Figura 5: Expresión génica de ASMT, evaluada por RT-PCR en testículo anterior (Ta), testículo posterior (Tp), cabeza (Ca), cuerpo (Cu), cola (Co), ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (Vs), conducto deferente (Cd), glándulas (Gb), vacío (-), pineal (Gb), vacío (-) y control negativo (-).

Como se puede apreciar en la figura 5, la intensidad de la banda es variable y es completamente nula en el negativo, lo que permite dar por válido el experimento. Hay pequeñas bandas de inespecificidad posiblemente debidas a la utilización de DMSO, pero insignificantes en relación a los niveles de amplificación obtenidos, puesto que como se observa en la Imagen 3 se genera amplificación en todos los tejidos del fragmento a la altura esperada de 104 pb y correspondiente a ASMT.

De forma semejante al resultado descrito para la enzima AANAT, las bandas obtenidas poseen diferente intensidad y aquellos tejidos con mayores intensidades, nuevamente testículo anterior y posterior, son los que tendrán una mayor cantidad de síntesis.

Q-PCR

La q-PCR ha permitido determinar el grado de expresión génica de ambas enzimas en las distintas partes y/o tejidos del tracto reproductor estudiados, para ello, se utilizó la glándula pineal como control positivo. Los resultados de la q-PCR, tras la normalización mediante los dos genes de referencia utilizados, se muestran en las figuras 6 y 7:

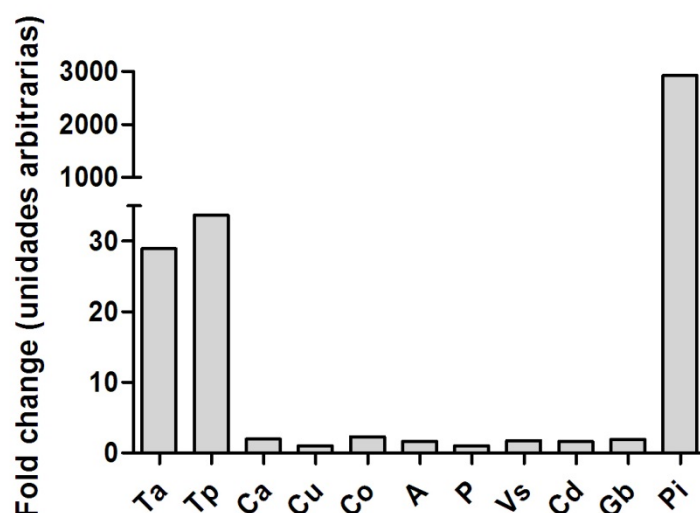


Figura 6: Expresión génica de AANAT, evaluada por q-PCR, en testículo anterior (Ta), testículo posterior (Tp), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola de epidídimo (Co), ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (Vs), conducto deferente (Cd), glándulas bulbouretrales (Gb) y glándula pineal (Pi)

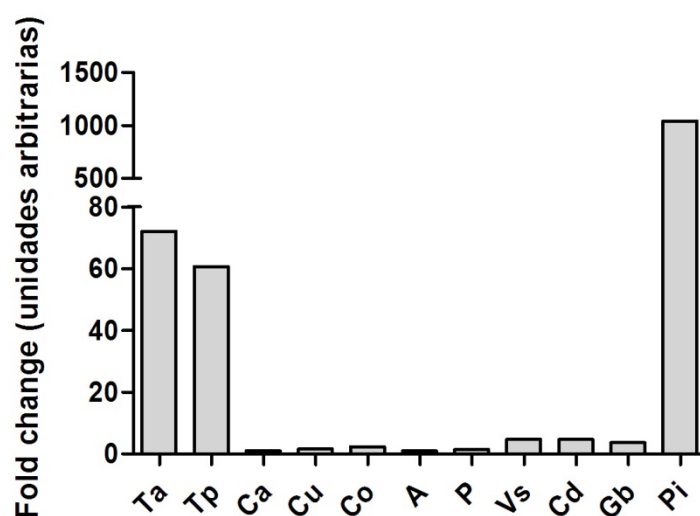


Figura 7: Expresión génica de ASMT, evaluada por q-PCR, en testículo anterior (Ta), testículo posterior (Tp), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola de epidídimo (Co), ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (Vs), conducto deferente (Cd), glándulas bulbouretrales (Gb) y glándula pineal (Pi)

Al igual que ocurría en los resultados obtenidos mediante RT-PCR, se obtuvieron resultados positivos para ambas enzimas en todos los tejidos estudiados, siendo de nuevo la glándula pineal (control positivo) la que mostró los mayores valores de expresión. Sin embargo, hay que destacar que, dentro de los tejidos del tracto reproductor del morueco, los mayores valores obtenidos son en el testículo, obteniéndose valores hasta 15 veces superiores en comparación con el siguiente tejido,

y por ello, el testículo es el que podría desempeñar el papel más decisivo en la síntesis de la melatonina presente en el plasma seminal. Aunque el grado de expresión génica es considerablemente menor que en la glándula pineal.

INMUNODETECCION DE LAS ENZIMAS AANAT Y ASMT EN TEJIDOS DEL TRACTO REPRODUCTOR DEL MACHO

WESTERN BLOT DE AANAT

Para determina la presencia de estas enzimas a estudio en los diferentes tejidos del tracto reproductor del morueco se procedió a su identificación mediante Western-blot.

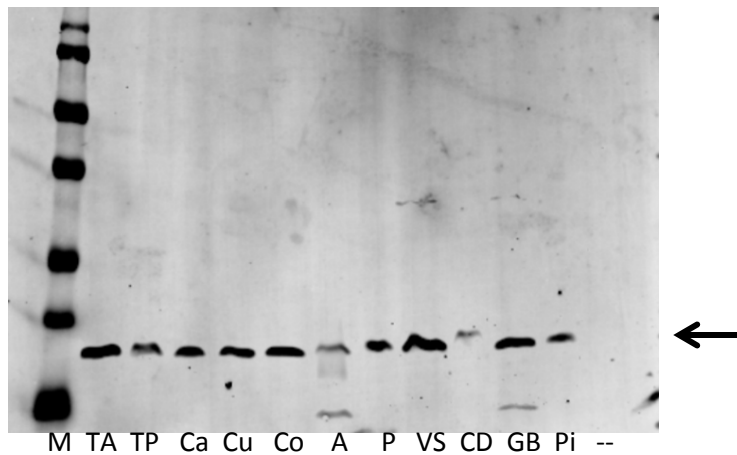


Figura 6: Presencia de AANAT, identificada mediante Western-blot con anticuerpos específicos en proteínas de testículo anterior (Ta), testículo posterior (Tp), cabeza (Ca), cuerpo (Cu), cola (Co), ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (Vs), conducto deferente (Cd), glándulas (Gb), pineal (Pi) y control negativo con espermatozoide (-).

Todos los tejidos, salvo el control negativo, presentan una banda de 23 kDa compatible con el peso molecular de la AANAT (Figura 6). De esta manera queda demostrada, no solo la transcripción, sino también la traducción del mRNA detectado por RT-PCR y q-PCR, y por tanto la síntesis de esta enzima por parte de prácticamente todos los tejidos del tracto reproductor del morueco.

WESTERN BLOT DE ASMT

Los resultados del Western blot para la ASMT se muestran en la figura 9:

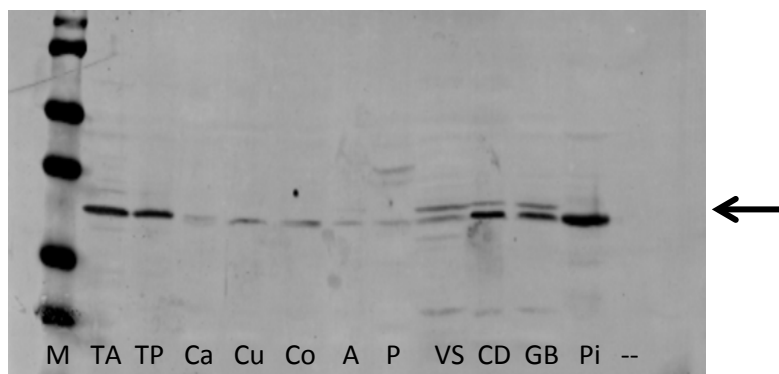


Figura 7: Presencia de ASMT, identificada mediante Western-blot con anticuerpos específicos en proteínas de testículo anterior (Ta), testículo posterior (Tp), cabeza (Ca), cuerpo (Cu), cola (Co), ampolla (A), próstata (P), vesícula seminal (Vs), conducto deferente (Cd), glándulas (Gb), pineal (Pi) y control negativo de espermatozoide (-).

Al igual que para AANAT aparece una banda de 38 kDa compatible con la presencia de ASMT. Además, en este caso, el testículo parece tener más cantidad de esta enzima que el resto de los tejidos del tracto reproductor, como indicaría la mayor intensidad de banda obtenida.

Estos resultados corroboran los datos obtenidos mediante RT-PCR y q-PCR, y demuestran que también hay síntesis de ASMT en todos los tejidos estudiados, pero principalmente en el testículo.

Los resultados demuestran la presencia de las dos enzimas clave de la ruta de síntesis de melatonina en tejidos del tracto reproductor del morueco, principalmente en el testículo.

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo demostrarían la existencia de la ruta de síntesis de la melatonina en el aparato reproductor del morueco mediante la identificación de las dos enzimas más determinantes de dicha ruta, la AANAT y ASMT, ya que existen y son sintetizadas en todos los tejidos estudiados. En la primera parte del trabajo se ha demostrado la presencia de mRNA para estas enzimas en todo el tracto reproductor del morueco, pero además la q-PCR ha permitido determinar que su expresión génica es mayoritaria en el testículo.

Además, los estudios realizados mediante Western-blot han demostrado que no solo hay transcripción, sino también traducción del mRNA detectado por RT-PCR y q-PCR, y por tanto la síntesis de estas enzimas por parte de prácticamente todos los tejidos del tracto reproductor del morueco, aunque de nuevo, siendo mayor en el testículo.

Estudios anteriores ya habían determinado la presencia de estas enzimas en testículo de rata, (Tijmez et al.1996) y otros estudios posteriores demostraron su expresión génica en la misma especie (Stefulj et al. 2001); sin embargo las células que eran responsables de la síntesis de dichas enzimas todavía no se han identificado. De esta forma, el estudio llevado a cabo en nuestro grupo, constata que en el tracto reproductor del macho, y de forma predominante en el testículo, existe la maquinaria enzimática para la síntesis de melatonina, lo que explicaría en parte los niveles de melatonina detectados en plasma seminal. La capacidad de síntesis de melatonina extrapineal por parte del testículo en el macho ovino explicaría la presencia de altos niveles de melatonina en el plasma seminal de esta especie durante las horas diurnas (Casao et al. 2010), aspecto que podría derivarse de la propia génesis espermática y la transición a través de distintos tipos celulares hasta la construcción de espermatozoides maduros. Por ello, parte de la melatonina presente en el plasma seminal podría no haberse originado en la glándula pineal, y por ende, no provenir del torrente sanguíneo, sino que sería sintetizada y secretada en el propio tracto reproductor del morueco, principalmente por el testículo.

Este no sería el primer caso en que se demuestra la secreción de melatonina extrapineal en altas concentraciones independientemente de la sintetizada por la glándula pineal, ya que este hecho también se ha demostrado en hígado, intestino y otros órganos (Acuña-Castroviejo et al. 2014). Aunque si sería la primera vez que la melatonina extrapineal podría actuar como hormona endocrina. Esta melatonina producida principalmente por el testículo podría tener una función similar a la producida localmente por el ovario. En este órgano, la melatonina es sintetizada por las células de la granulosa durante el desarrollo folicular (Itoh et al. 1999), y se acumula en el fluido folicular (Brzezinski, Seibel et al. 1987), lo cual parece proteger al ovocito durante su maduración (Adriaens et al. 2006).

La función de esta hormona en el desarrollo de los gametos podría estar relacionada con su capacidad para disminuir el daño oxidativo de las células, causa importante de infertilidad (Agarwal et al. 2003). Se ha visto como la melatonina puede proteger a los ovocitos de la apoptosis y del daño del DNA que causan las especies ROS (Na et al. 2005, El-Raey et al. 2011, Takada et al. 2012). De esta manera, una secreción de melatonina en el aparato reproductor del macho podría tener como función proteger a los espermatozoides durante la espermatogénesis, influyendo en el grado de fertilidad de los machos (Agarwal et al. 2008).

Además, el efecto protector de dicha hormona no solo se concentraría sobre los espermatozoides, si no que podría extenderse también sobre las espermatogonias y células germinales que se encuentran en los túbulos seminíferos (Guneli et al. 2008, Ozen et al. 2008) y los espermatozoides epididimarios (Huang et al. 2009, Sarabia et al. 2009), con los mismos efectos protectores.

Estos posibles efectos protectores de la melatonina durante la espermatogénesis, que influirían en la calidad seminal, no solo serían aplicables al caso del morueco, si no que otras especies, incluida la humana podrían verse influidas por los mismos parámetros, lo que indicaría el importante papel que desempeña esta hormona sobre la reproducción y la importancia de los beneficios que podrían suponer estos descubrimientos en el campo de la reproducción.

CONCLUSIONES

- Los experimentos llevados a cabo en este trabajo demuestran la existencia de la ruta de síntesis de melatonina en el tracto reproductor del morueco.
- Además, estos resultados parecen indicar, ya no solo la capacidad de síntesis de enzimas de la ruta en el tracto reproductor del morueco, si no que estas están presentes en el testículo en una concentración importante y capaz de sustentar un metabolismo propio
- El testículo, tanto su parte anterior como posterior, presentan los mayores niveles de expresión para las dos enzimas, siendo el epidídimo y vesícula seminal los siguientes.
- Esta capacidad de síntesis de melatonina por el testículo podría ser responsable de los altos niveles de melatonina detectados en plasma seminal en horas diurnas
- El papel de dicha hormona en el tracto reproductor del morueco puede que sea la protección frente al daño oxidativo generado por especies ROS, de manera similar a la función que desempeña en el ovario.
- La repercusión de esta vía metabólica en el tracto genital del morueco es extrapolable a otras especies, constituyéndose como un elemento de gran importancia a la hora de mejorar la capacidad reproductiva de las mismas.

CONCLUSIONS

- Experiments carried out by our research group show the existence of the melatonin synthesis in the ovine reproductive tract.
- Furthermore, these results seem to indicate, not only the capability of synthesis of pathway enzymes in the ram reproductive tract, also they are present in the testicle in an important concentration which is capable of sustaining its own metabolism.
- Testis, both the front and back of, have the highest expression levels for the two enzymes, follow by the seminal vesicle and epididymis.
- This capability of synthesis melatonin by the testicle could be responsible of the high melatonin levels detected in seminal plasma in daytime hours.
- The role of this hormone in the ram reproductive tract can be the protection against oxidative damage generated by ROS species, in a similar way as it works in the ovary.
- The impact of this pathway in ram genital tract can be extrapolated to other species, constituting an element of great importance to improve the reproductive capacity.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña-Castroviejo, D., G. Escames, C. Venegas, M. Díaz-Casado, E. Lima-Cabello, L. López, S. Rosales-Corral, D.-X. Tan and R. Reiter (2014). "Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions." Cellular and Molecular Life Sciences: 1-29.
- Adriaens, I., P. Jacquet, R. Cortvrindt, K. Janssen and J. Smitz (2006). "Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis." Toxicology **228**(2-3): 333-343.
- Agarwal, A., K. Makker and R. Sharma (2008). "Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update." American Journal of Reproductive Immunology **59**(1): 2-11.
- Agarwal, A., R. A. Saleh and M. A. Bedaiwy (2003). "Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction." Fertility and Sterility **79**(4): 829-843.
- Boutin, J. A., V. Audinot, G. Ferry and P. Delagrangé (2005). "Molecular tools to study melatonin pathways and actions." Trends Pharmacol Sci **26**(8): 412-419.
- Brzezinski, A., M. M. Seibel, H. J. Lynch, M. H. Deng and R. J. Wurtman (1987). "Melatonin in human preovulatory follicular fluid." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **64**(4): 865-867.
- Bubenik, G. (2002). "Gastrointestinal Melatonin: Localization, Function, and Clinical Relevance." Digestive Diseases and Sciences **47**(10): 2336-2348.
- CARDINALI, D. P. and J. M. ROSNER (1971). "Retinal Localization of the Hydroxyindole-O-methyl Transferase (HIOMT) in the Rat." Endocrinology **89**(1): 301-303.
- CARDINALI, D. P. and R. J. WURTMAN (1972). "Hydroxyindole—O—Methyl Transferases in Rat Pineal, Retina and Harderian Gland." Endocrinology **91**(1): 247-252.
- Casao, A., C. Luna, R. Perez-Pe, T. Muino-Blanco and J. A. Cebrian-Perez (2012). "Receptor mediated effect of melatonin on ram sperm calcium patterns." Reproduction in Domestic Animals **47**: 90-90.
- Casao, A., C. Luna, E. Serrano, R. Perez-Pe, T. Muino-Blanco and J. A. Cebrian-Perez (2009). Quantification of melatonin and oxidized proteins and lipids in ram semen in breeding and non-breeding season. XIII Jornadas sobre Producción Animal, AIDA, Zaragoza, Spain, AIDA.
- Casao, A., N. Mendoza, R. Pérez-Pé, A. Grasa, J. A. Abecia, F. Forcada, J. A. Cebrián-Pérez and T. Muino-Blanco (2010). "Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate." Journal of Pineal Research **48**(1): 39-46.
- Casao, A., S. Vega, I. Palacin, R. Perez-Pe, A. Lavina, F. J. Quintin, E. Sevilla, J. A. Abecia, J. A. Cebrian-Perez, F. Forcada and T. Muino-Blanco (2010). "Effects of Melatonin Implants During Non-Breeding Season on Sperm Motility and Reproductive Parameters in Rasa Aragonesa Rams." Reproduction in Domestic Animals **45**(3): 425-432.
- Cebrian-Perez, J. A., A. Casao, M. Gonzalez-Arto, T. R. dos Santos Hamilton, R. Perez-Pe and T. Muino-Blanco (2014). "Melatonin in sperm biology: breaking paradigms." Reprod Domest Anim **49** Suppl 4: 11-21.

Coyan, K., A. Kaya, F. Karaca, M. B. Ataman and C. Yildiz (1998). "The effect of melatonin on sperm quality and testicular size of normospermic and pathospermic rams in the anoestrous season." Wiener Tierarztliche Monatsschrift **85**(11): 383-388.

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

El-Raey, M., M. Geshi, T. Somfai, M. Kaneda, M. Hirako, A. E. Abdel-Ghaffar, G. A. Sosa, M. E. A. A. El-Roos and T. Nagai (2011). "Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle." Molecular Reproduction and Development **78**(4): 250-262.

Espino, J., Á. Ortiz, I. Bejarano, G. M. Lozano, F. Monllor, J. F. García, A. B. Rodríguez and J. A. Pariente (2011). "Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor- and extracellular signal-regulated kinase-mediated pathways." Fertility and Sterility **95**(7): 2290-2296.

Froy, O. (2009). "Cytochrome P450 and the biological clock in mammals." Curr Drug Metab **10**(2): 104-115.

Gibbs, F. P. and J. Vriend (1981). "The half-life of melatonin elimination from rat plasma." Endocrinology **109**(5): 1796-1798.

Guneli, E., K. Tugyan, H. Ozturk, M. Gumustekin, S. Cilaker and N. Uysal (2008). "Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats." European Surgical Research **40**(4): 354-360.

Huang, F., H. Ning, Q.-Q. Xin, Y. Huang, H. Wang, Z.-H. Zhang, D.-X. Xu, G. Ichihara and D.-Q. Ye (2009). "Melatonin pretreatment attenuates 2-bromopropane-induced testicular toxicity in rats." Toxicology **256**(1-2): 75-82.

Itoh, M. T., B. Ishizuka, Y. Kuribayashi, A. Amemiya and Y. Sumi (1999). "Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary." Molecular Human Reproduction **5**(5): 402-408.

Jang, H. Y., Y. H. Kim, B. W. Kim, I. C. Park, H. T. Cheong, J. T. Kim, C. K. Park, H. S. Kong, H. K. Lee and B. K. Yang (2010). "Ameliorative Effects of Melatonin against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress on Boar Sperm Characteristics and Subsequent In Vitro Embryo Development." Reproduction in Domestic Animals **45**(6): 943-950.

Kaya, A., N. Baspinar, C. Yildiz, F. Kurtoglu, M. B. Ataman and S. Haliloglu (2000). "Influence of melatonin implantation on sperm quality, biochemical composition of the seminal plasma and plasma testosterone levels in rams." Revue De Medecine Veterinaire **151**(12): 1143-1146.

Kokolis, N., E. Theodosiadou, M. Tsantarliotou, C. Rekkas, P. Goulas and A. Smokovitis (2000). "The effect of melatonin implants on blood testosterone and acrosin activity in spermatozoa of the ram." Andrologia **32**(2): 107-114.

Lanoix, D., H. Beghdadi, J. Lafond and C. Vaillancourt (2008). "Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors." Journal of Pineal Research **45**(1): 50-60.

- Lincoln, G. A. and F. J. Ebling (1985). "Effect of constant-release implants of melatonin on seasonal cycles in reproduction, prolactin secretion and moulting in rams." J Reprod Fertil **73**(1): 241-253.
- Lincoln, G. A., C. E. Lincoln and A. S. McNeilly (1990). "Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep." J Reprod Fertil. **88**(2): 623-633.
- Malpaux, B., J. C. Thiery and P. Chemineau (1999). "Melatonin and the seasonal control of reproduction." Reproduction Nutrition Development **39**(3): 355-366.
- Malpaux, B., C. ViguiE, D. C. Skinner, J. C. Thiery and P. Chemineau (1997). "Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe." Brain Research Bulletin **44**(4): 431-438.
- Mayo, J. C., R. M. Sainz, D. X. Tan, R. Hardeland, J. Leon, C. Rodriguez and R. J. Reiter (2005). "Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages." J Neuroimmunol **165**(1-2): 139-149.
- Misztal, T., K. Romanowicz and B. Barcikowski (2002). "Effect of melatonin on daily LH secretion in intact and ovariectomized ewes during the breeding season." Animal Reproduction Science **69**(3-4): 187-198
- Na, K., J. Kim, J. Lee, T. Yoon, K. Cha and D. Lee (2005). "Effect of melatonin on the maturation of mouse GV oocytes and apoptosis of cumulus cells in vitro." Fertility and Sterility **84**(Supplement 1): S103-S103.
- Ozen, O. A., M. A. Kus, I. Kus, O. A. Alkoc and A. Songur (2008). "Protective effects of melatonin against formaldehyde-induced oxidative damage and apoptosis in rat testes: an immunohistochemical and biochemical study." Systems biology in reproductive medicine **54**(4-5): 169-176.
- Palacín, I., J. A. Abecia, F. Forcada, A. Casao, J. A. Cebrian-Perez, T. Muino-Blanco, C. Palacios and J. M. Pontes (2008). "Effect of exogenous melatonin treatment on out of season ram fertility." Italian Journal of Animal Science **7**: 199-206.
- Rao, M. V. and B. Gangadharan (2008). "Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro." Toxicology in Vitro **22**(4): 935-942.
- Rosa, H. J., D. T. Juniper and M. J. Bryant (2000). "Effects of recent sexual experience and melatonin treatment of rams on plasma testosterone concentration, sexual behaviour and ability to induce ovulation in seasonally anoestrous ewes." J Reprod Fertil **120**(1): 169-176.
- Rosa, H. J. D., C. C. Silva and M. J. Bryant (2012). "The effect of melatonin treatment in rams on seasonal variation of testicular size and semen production parameters." Small Ruminant Research **102**(2-3): 197-201.
- Sarabia, L., I. Maurer and E. Bustos-Obregón (2009). "Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA." Ecotoxicology and Environmental Safety **72**(2): 663-668.

- Schanbacher, B. D. and D. D. Lunstra (1976). "Seasonal changes in sexual activity and serum levels of LH and testosterone in Finish Landrace and Suffolk rams." J. Anim Sci. **43**(3): 644-650.
- Shimozuma, M., R. Tokuyama, S. Tatehara, H. Umeki, S. Ide, K. Mishima, I. Saito and K. Satomura (2011). "Expression and cellular localization of melatonin-synthesizing enzymes in rat and human salivary glands." Histochemistry and Cell Biology **135**(4): 389-396.
- Takada, L., A. Martins, G. Z. Mingoti, J. C. C. Balieiro, J. Cipolla-Neto and L. A. Coelho (2012). "Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during in vitro maturation (IVM) and on in vitro embryo development." Research in Veterinary Science **92**(1): 124-127.
- Tan, D., L. C. Manchester, R. J. Reiter, W. Qi, M. A. Hanes and N. J. Farley (1999). "High physiological levels of melatonin in the bile of mammals." Life Sci **65**(23): 2523-2529.
- Tan, D. X., R. Hardeland, L. C. Manchester, S. D. Paredes, A. Korkmaz, R. M. Sainz, J. C. Mayo, L. Fuentes-Broto and R. J. Reiter (2010). "The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness." Biol Rev Camb Philos Soc **85**(3): 607-623.
- Webster, J. R., J. M. Suttie, B. A. Veenvliet, T. R. Manley and R. P. Littlejohn (1991). "Effect of melatonin implants on secretion of luteinizing hormone in intact and castrated rams." Journal of Reproduction and Fertility. **92**(1): 21-31.