



**Universidad**  
Zaragoza

**DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS ENZIMAS  
DE SÍNTESIS DE MELATONINA EN MACHOS OVINOS EN  
FUNCIÓN DE LA EDAD Y LA ESTACIÓN REPRODUCTIVA**

**DIFFERENCES IN GENE EXPRESSION OF MELATONIN-  
SYNTHESIZING ENZYMES IN RAM DEPENDING ON AGE  
AND BREEDING SEASON**

Trabajo Fin de Grado

**Sofía Lázaro Gaspar**

Dirigida por:

Adriana Casao Gascón

José Álvaro Cebrián Pérez

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

Facultad de Veterinaria

Junio 2016



La Dra. Adriana Casao Gascón, Profesora Contratada Doctor y el Dr. José Álvaro Cebrián Pérez, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

INFORMAN:

Que la alumna Dña. Sofía Lázaro Gaspar, ha realizado bajo nuestra dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin de Grado titulado "Diferencias en la expresión génica de las enzimas de síntesis de melatonina en machos ovinos en función de la edad y la estación reproductiva". Este trabajo cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFG en Biotecnología, por lo que consideran procedente su presentación.

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

Adriana Casao Gascón

José Álvaro Cebrián Pérez

# ÍNDICE

Resumen español	1
<i>Abstract</i>	2
Antecedentes	3
Objetivos y planteamiento del trabajo	8
Materiales y métodos	9
<i>Expresión génica de AANAT y ASMT en machos ovinos de diferente edad y estación reproductiva</i>	9
<i>Obtención de muestras</i>	9
<i>Aislamiento y limpieza del ARN total</i>	9
<i>Síntesis de ADNc</i>	10
<i>PCR a tiempo real</i>	11
<i>Detección de proteínas por Western-blot</i>	12
<i>Extracción de proteínas</i>	12
<i>SDS PAGE e Inmunoblotting</i>	12
<i>Análisis estadístico</i>	13
Resultados y discusión	14
<i>Expresión génica de AANAT y ASMT en machos ovinos de diferente edad y estación reproductiva</i>	14
<i>Obtención de ARN y ADNc</i>	14
<i>Cuantificación de la expresión génica de AANAT y ASMT mediante q-PCR</i>	14
<i>Análisis mediante Western-Blot de los niveles de proteína de AANAT y ASMT</i>	17
Conclusiones	21
<i>Conclusions</i>	21
Bibliografía	22

## RESUMEN

La melatonina es una molécula ampliamente distribuida en los seres vivos, cuya función principal es la protección frente al daño oxidativo, aunque en mamíferos estacionales también es el regulador de la estacionalidad reproductiva.

A pesar de que se sintetiza principalmente en la glándula pineal, la melatonina también puede ser sintetizada en tejidos extrapineales, y además se ha demostrado su presencia en fluidos biológicos como el plasma seminal, donde, en el morueco, sus niveles se incrementan en estación reproductiva. Además, durante el proceso de envejecimiento se ha demostrado una disminución de la síntesis por parte de glándula pineal.

Trabajos previos en nuestro grupo de investigación han determinado la presencia de las enzimas de síntesis de melatonina, serotonin-N-acetyltransferasa (AANAT) y N-acetylserotonin-O-metiltransferasa (ASMT), en el testículo. Por tanto, con el objetivo de determinar si las variaciones de melatonina en el plasma seminal observadas previamente en el morueco se deben a variaciones en los niveles de las enzimas de síntesis de esta hormona en el testículo y de determinar si el envejecimiento también influye en su secreción, en el presente trabajo se han determinado los niveles de expresión de AANAT y ASMT en testículo de machos ovinos de diferente edad en estación reproductiva y no reproductiva, mediante *real time* PCR y Western-Blot.

Se ha determinado que ni la estación reproductiva ni la edad afectan a la expresión génica de estas enzimas. Asimismo, los niveles de enzimas analizados por Western-Blot no disminuyen en la estación no reproductiva ni con el envejecimiento, por lo que la melatonina secretada por glándula pineal sería la responsable del aumento de la melatonina del plasma seminal observado en la época reproductiva. Finalmente, los niveles constantes de enzimas de síntesis, incluso superiores en el caso de ASMT, durante el envejecimiento sugieren algún tipo de mecanismo para mantener la protección antioxidante en el proceso de espermatogénesis a lo largo de la vida del individuo.

## **ABSTRACT**

Melatonin is a ubiquitous molecule found in a wide range of live organisms. The protection from oxidative damage it is its main function, but in seasonal mammals it is also the reproductive regulator.

Although it is mainly secreted by the pineal gland, melatonin could also be synthetized in other extrapineal tissues. It has been reported its presence in biological fluids, like seminal plasma, where melatonin levels are higher in breeding season in ram. In addition, it has been demonstrated that melatonin secreted by the pineal gland decreases during aging process.

Researchers carried out by our group have determined the presence of melatonin-synthesizing enzymes, serotonin-N-acetyltransferase (AANAT) and N-acetylserotonin-O-methyltransferase (ASMT), in ovine testis. The objective of this project is to determine whether high levels of melatonin in seminal plasma during reproductive season are due to changes in these enzymes levels. We have also studied if there is an influence of aging in the expression of the two key enzymes. The gene and protein expression of AANAT and ASMT depending on age and breeding season were determined and analyzed by real time PCR and Western-Blot, respectively.

We have determined that neither breeding season nor age affects the gene expression of these enzymes. On the other hand, protein levels analyzed by Western-Blot do not decrease in non-reproductive season and even with aging. Therefore, melatonin secreted by the pineal gland would be responsible of the high levels of this hormone in seminal plasma during breeding season. Finally, constant levels of synthesis enzymes, even higher in the case of ASMT, during aging suggest a possible mechanism that maintains antioxidant protection in spermatogenesis during male life.

## ANTECEDENTES

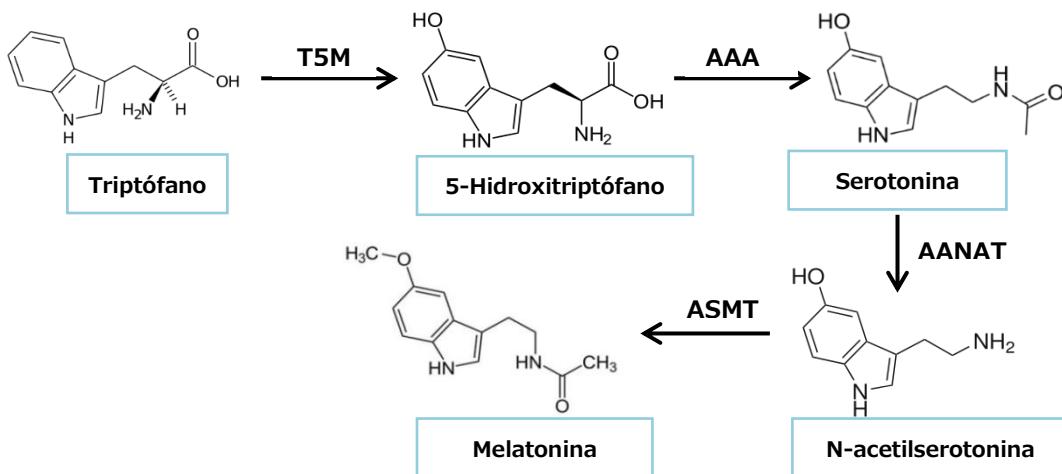
La melatonina es una molécula ubicua, ampliamente distribuida en casi todos los seres vivos, incluidas bacterias, eucariotas unicelulares, algas, plantas y animales invertebrados y vertebrados (Reiter et al. 2013). Su primera función en los organismos unicelulares primitivos sería la defensa antioxidante frente a los radicales libres (Tan et al. 2010); además, y en relación con dicha función, recientemente se han encontrado evidencias de que tanto mitocondrias como cloroplastos serían los principales sitios de síntesis de esta molécula en la mayoría de células eucariotas (Tan et al. 2013), lo que explicaría su amplia presencia en los organismos vivos.

Como consecuencia de los procesos evolutivos, en los organismos pluricelulares la melatonina ha ido adoptando nuevas funciones, entre las que se encuentra la señalización del fotoperíodo en vertebrados estacionales, regulación de la actividad sexual en pájaros y peces, estacionalidad reproductiva en mamíferos, tolerancia ambiental en hongos y plantas, inmunomodulación y actividad antiinflamatoria; también se ha relacionado con el reloj biológico, ya que su síntesis disminuye durante el envejecimiento en muchos organismos (ver revisión de Tan et al. (2010)).

Además, se ha demostrado que la melatonina controla diferentes eventos como el metabolismo lipídico y de azúcares (Alonso-Vale et al. 2008; Zhernakova and Rybnikova 2008), defensa frente al estrés oxidativo (Poeggeler et al. 1993), protección frente a la carcinogénesis (Tamura et al. 2008; Jena and Trivedi 2014) y regulación en el sistema inmunológico (Pena et al. 2007; Verburg-van Kemenade et al. 2013).

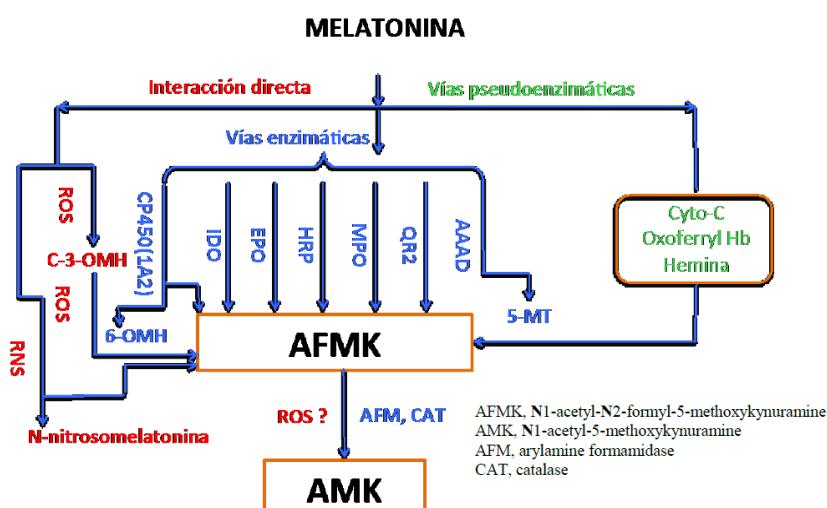
### **Metabolismo de la melatonina**

La melatonina o N-acetyl-5-metoxitriptamina, es sintetizada a partir del aminoácido triptófano. El proceso de biosíntesis consta de 4 pasos (Figura 1) y se produce principalmente en la glándula pineal. En primer lugar, la enzima triptófano-5-monooxigenasa (T5M) hidroxila al triptófano dando lugar a 5-hidroxitriptófano; a continuación se produce una descarboxilación que da lugar a la serotonina o 5-hidroxitriptamina por acción de la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AAAD); la serotonina a su vez es acetilada a N-acetilserotonina por acción de la serotonin-N-acetyltransferasa (AANAT) y finalmente la N-acetilserotonin-O-metiltransferasa (ASMT) cataliza el paso final a melatonina (Boutin et al. 2005).



**Figura 1:** Ruta de síntesis de melatonina en la glándula pineal. T5M: triptófano-5-monooxigenasa. AAAD: L-aminoácido aromático descarboxilasa. AANAT: serotonin-N-acetyltransferasa. ASMT: N-acetilserronin-O-metiltransferasa.

Sin embargo, los mecanismos que rigen el catabolismo de la melatonina son menos comprendidos y más complejos (Figura 2), ya que no existe una única vía de degradación (Tan et al. 2007). La melatonina puede interaccionar con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno para proporcionar N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxikinuramina (AFMK), también con capacidad antioxidante (Tan et al. 2007). La segunda opción es la degradación por vías pseudoenzimáticas, llevadas a cabo por las isoformas del citocromo P450 (CYP1A2 y CYP2C19) en el hígado de los mamíferos (Hardeland 2008). La vía enzimática comprende la acción de las enzimas ari y buril acilamidas o la enzima melatonina deacetylasa (Hardeland 2010), específicas de melatonina. Además, la transformación de melatonina en AFMK puede ser llevada a cabo por otras enzimas: indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), mieloperoxidasa (MPO), eosinofil peroxidasa (EPPO) y catalasa (CAT), siendo las dos primeras la vía principal (Hardeland 2008).



**Figura 2:** Rutas de degradación de melatonina. Tomado de (Tan et al. 2014).

## Melatonina pineal y extrapineal

En los vertebrados, la melatonina presente en el plasma sanguíneo es secretada principalmente por la glándula pineal en horas nocturnas y en función del fotoperiodo. De este modo, esta hormona presenta un máximo de concentración durante la noche y unos niveles basales durante el día, determina tanto los ritmos circadianos como los ciclos de sueño y vigilia (Turek et al. 1976; Odo et al. 2014) y la temperatura corporal (Castanho et al. 2014).

Sin embargo, la melatonina no se sintetiza exclusivamente en la glándula pineal, ya que se han identificado tanto las enzimas clave de la síntesis de melatonina, AANAT y ASMT, como la presencia de esta hormona en multitud de tejidos como el cerebro, la retina, cóclea, glándula Harderiana, piel, tracto gastrointestinal, hígado, riñón, páncreas, timo, células del sistema inmune y tracto reproductor, entre otros (ver revisión de Acuna-Castroviejo et al. (2014)). Además, también se ha detectado la presencia de melatonina extrapineal en fluidos biológicos como la saliva (McIntyre et al. 1987), orina (Claustrat et al. 2005), fluido folicular (Brzezinski et al. 1987) y plasma seminal (Luboshitzky et al. 2002; Casao et al. 2010).

## Melatonina y estacionalidad reproductiva en la especie ovina

En los mamíferos con reproducción estacional, la melatonina es el principal regulador tanto en especies de días largos como en las de días cortos (Ver revisión de Cebrian-Perez et al. (2014)). En los primeros, en los que la estación reproductiva es en primavera-verano, esta hormona ejerce un efecto inhibitorio en la reproducción; este es el caso del hámster sirio (Turek et al. 1976) y del caballo (Argo et al. 1991). Por el contrario, en los reproductores de días cortos, como por ejemplo la oveja, la cabra (Chemineau et al. 1992) y el ciervo (Adam et al. 1986), en los que la estación reproductiva es en otoño-invierno, tiene un efecto estimulante de la misma.

En estos reproductores de días cortos, como la especie ovina, los niveles crecientes de melatonina, secretada durante las noches de otoño e invierno, activa el eje hipotálamo/hipofisario/gonadal, lo que estimula la actividad reproductiva (Rosa and Bryant 2003). Así, la duración de la secreción nocturna de melatonina regula la secreción de GnRH en el hipotálamo, lo que se traduce en cambios en la secreción de la hormona luteinizante, la cual a su vez es responsable de la actividad ovárica en la hembra y de la producción de espermatozoides en el macho (Malpaux et al. 1997; Misztal et al. 2002). Esta estacionalidad reproductiva está menos marcada en el morueco que en la oveja, y es por ello que la síntesis de espermatozoides es continua a lo largo del año (Rosa and Bryant 2003). Sin embargo, durante la estación no reproductiva disminuye considerablemente tanto el comportamiento sexual y la libido de los moruecos, como la calidad espermática y el tamaño de los testículos (Karagiannidis et al. 2000; D'Alessandro and Martemucci 2003; Avdi et al. 2004).

Por otro lado, se han visto numerosos efectos beneficiosos de la melatonina en la capacidad espermática ovina, ya que *in vitro* esta hormona no solo mejora la motilidad

de los espermatozoides (Casao et al. 2010), sino que, debido a su capacidad antioxidante, la melatonina disminuye el daño oxidativo producido por los niveles intracelulares de ROS y NO (Rao and Gangadharan 2008; Jang et al. 2010), la peroxidación de lípidos de membrana (Gadella et al. 2008; Du Plessis et al. 2010), los marcadores de apoptosis (Casao et al. 2010; Espino et al. 2011) y la fragmentación del ADN (Sarabia et al. 2009).

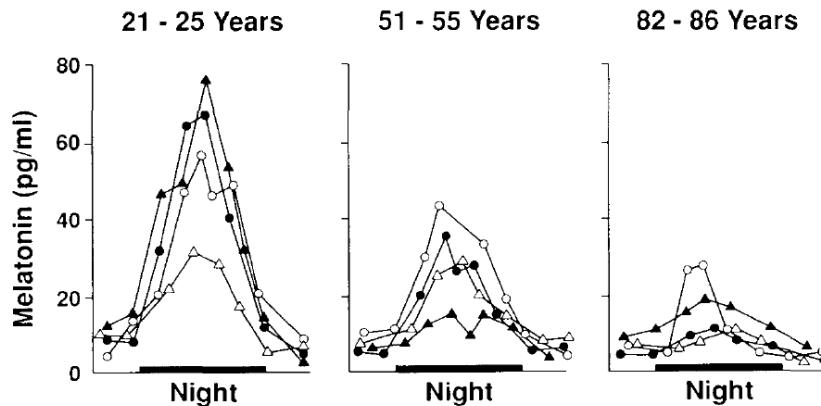
Al igual que ocurre con otras especies como la humana (Luboshitzky et al. 2002), la melatonina también está presente en el plasma seminal ovino, donde alcanza altos niveles, incluso superiores a los del plasma sanguíneo, en especial en la época reproductiva (Casao et al. 2010). La melatonina presente en este fluido proviene en parte de la sangre, ya que se ha visto que la administración exógena de melatonina provoca un aumento de la misma en el plasma seminal (Casao et al. 2013), pero también de algunos órganos del propio tracto reproductor del macho, principalmente del testículo, ya que recientemente, se ha demostrado la presencia de las enzimas esenciales de síntesis de melatonina AANAT y ASMT en este órgano (Gonzalez-Arto et al. 2016), lo que podría explicar los altos niveles de esta hormona en el plasma seminal.

Esta melatonina testicular podría desempeñar un papel similar al que ejerce esta hormona en el fluido preovulatorio folicular (Brzezinski et al. 1987), y sería proteger a los gametos del daño por estrés oxidativo, el cual puede perjudicar la fertilidad tanto del macho (Agarwal et al. 2008) como de la hembra (Tamura et al. 2013). En el macho, esta protección no solo tendría lugar a nivel del espermatozoide maduro sino también durante el proceso de espermatogénesis en los túbulos seminíferos (Guneli et al. 2008; Ozen et al. 2008).

### **Efecto de la edad en la secreción de melatonina**

Por otro lado, la edad parece afectar a la secreción de melatonina nocturna por parte de la glándula pineal. Se ha comprobado que en animales jóvenes, incluyendo la especie humana, el pico del melatonina nocturno es remarcado mientras que en individuos de avanzada edad, es apenas detectable (Pang et al. 1990). En el ser humano (Figura 3), los niveles de melatonina en sangre son mucho menores en octogenarios que en individuos de treinta años de edad (Reiter 1995).

Esta disminución de la melatonina nocturna con la edad es común a todos los mamíferos. La reducción de los niveles de la hormona se debe probablemente a una disminución en el número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la membrana de los pinealocitos, y a la destrucción de neuronas del SNC por el glutamato, neurotransmisor responsable de transmitir la información sobre el fotoperiodo desde la retina (Reiter 1995).



**Figura 3:** Niveles representativos de melatonina durante el día y la noche en humanos en tres grupos diferentes de edad. A mayor edad, la amplitud del pico así como la duración de la melatonina nocturna disminuye. Fuente: (Reiter 1995).

En cuanto a las variaciones de melatonina extrapineal en función de la edad, estudios realizados en ratón sobre la expresión génica de las enzimas de síntesis de esta hormona en múltiples tejidos demostraron que la expresión de AANAT desciende con la edad en algunos tejidos como bazo e hígado pero aumenta en otros como riñón y corazón, aunque su actividad y funcionalidad no parecen ser afectadas por el proceso de envejecimiento. Sin embargo, para ASMT se observó un aumento de su expresión génica con el envejecimiento en algunos tejidos como el bazo y el corazón, mientras que en otros, como el hígado, se produce un descenso (Sanchez-Hidalgo et al. 2009).

## **OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO**

La melatonina es una hormona ampliamente distribuida en todos los organismos. En los mamíferos, la melatonina circulante es secretada por la glándula pineal, pero además también existen otros tejidos capaces de sintetizar esta hormona de forma extrapineal (ver revisión de Acuna-Castroviejo et al. (2014)). También se ha identificado la presencia de melatonina en fluidos corporales como es el caso del plasma seminal ovino, con niveles superiores en época reproductiva (Casao et al. 2010).

Trabajos previos han demostrado la presencia de las principales enzimas de síntesis de melatonina, AANAT y ASMT, en los tejidos del tracto reproductor del morueco, principalmente en el testículo (Gonzalez-Arto et al. 2016) lo que permitiría explicar en parte estos altos niveles de hormona cuantificados en el plasma seminal, aunque no está claro que la melatonina producida por el testículo influya en las variaciones estacionales de concentración observadas en este fluido.

Por otro lado, también se ha visto que en mamíferos tiene lugar una disminución de la síntesis de melatonina pineal con la edad (Reiter 1995), aunque por otro lado, la edad no parece afectar a la síntesis de melatonina extrapineal (Sanchez-Hidalgo et al. 2009).

Atendiendo a estos hechos se formulan las siguientes hipótesis:

- a. Las variaciones en la concentración de melatonina en plasma seminal de morueco entre las estaciones reproductiva y no reproductiva podrían deberse a variaciones en la expresión de los genes que codifican las enzimas de síntesis en el testículo.
- b. Al igual que ocurre con la melatonina pineal, la edad también podría afectar a la expresión de las enzimas de síntesis de melatonina en este órgano.

Por ello, el **objetivo** de este trabajo es el determinar los efectos de la estación reproductiva y la edad en los niveles de expresión génica y la presencia de las enzimas de síntesis de melatonina (AANAT y ASMT) en el testículo del macho ovino.

Para ello, se analizarán muestras de testículo de machos ovinos, jóvenes y viejos, tanto en estación reproductiva como en estación no reproductiva. El estudio de la expresión génica a nivel transcripcional de AANAT y ASMT se realizará mediante PCR a tiempo real (q-PCR). Para ello se extraerá el ARNm del tejido testicular de los diferentes machos, que se purificará y se retrotranscribirá, para obtener el ADNc que será usado para realizar la q-PCR utilizando cebadores específicos para cada una enzimas.

Además, para el estudio de la expresión proteica de ambas enzimas en este órgano se utilizará la técnica de Western Blot, por lo que se realizará la extracción de proteínas y la detección y cuantificación de AANAT y ASMT utilizando anticuerpos específicos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **EXPRESIÓN GÉNICA DE AANAT Y ASMT EN MACHOS OVINOS DE DIFERENTE EDAD Y ESTACIÓN REPRODUCTIVA**

#### **OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

El estudio de la expresión génica y cuantificación de proteínas se realizó en testículos procedentes de diferentes machos ovinos de distinta edad y de raza Rasa Aragonesa, sacrificados en el matadero de Mercazaragoza, y recogidos tanto en estación reproductiva (Noviembre-Diciembre) como en estación no reproductiva (Mayo-Junio). Los machos se clasificaron en jóvenes o viejos en función de su morfología dentaria. Los sujetos de estudio fueron 5 machos jóvenes y 8 viejos en estación reproductiva y 6 machos jóvenes y 8 viejos en estación no reproductiva. El tejido testicular se almacenó a -80 °C hasta su uso con el objetivo de evitar contaminaciones, actuación de RNAsas y degradación de proteínas.

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

El ARN se extrajo por homogenización de 250 mg de tejido testicular en TRI REAGENT (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) según el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). La concentración de ARN se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro NanoDrop ND-100 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Además, se comprobó que el ratio de absorbancia 260/280 fuera mayor de 1,9 para determinar su pureza. La calidad del RNA se confirmó también mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón Tris-borato-EDTA (TBE: 10,8 g/L TRIS base, 0,4% v/v de EDTA 0,5 M y 5,5 g/L de ácido bórico) con bromuro de etidio a una concentración final de 200 ng/mL. Los geles se corrieron en TBE a 80V durante 30 minutos (EPS 1000, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) y se visualizaron en luz ultravioleta (Gel Doc, Biorad Laboratories, Hercules, California) para comprobar la presencia de las bandas de ARN ribosómico 28S y 18S.

La limpieza de restos de ADN en las muestras de ARN se llevó a cabo por medio del kit TURBO DNA-free de Ambión (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). El volumen de reacción fue 50 µL y estaba compuesto por 5 µL de tampón 10X, 1 µL de DNasa, 10 µg de ARN (volumen variable en función de la concentración de las diferentes muestras) y agua DEPC (0,1 % dietilpirocarbonato) hasta 50 µL. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 30 minutos, tras lo cual se añadieron 5 µL de DNase Inactivation Reagent para inactivar la DNasa y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 10.000 x g y se recogió el sobrenadante. La concentración de ARN se determinó de nuevo mediante espectrofotometría y se almacenó a -80 °C o se utilizó inmediatamente para retrotranscripción.

## SÍNTESIS DE ADNc

El ADNc se obtuvo a partir del ARN obtenido de testículos de los distintos machos mediante retrotranscripción con el kit Super Script III First-Strand Syntesis System (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos). Para ello, 500 ng de ARN se sometieron a retrotranscripción usando como primer oligo(dT)<sub>20</sub> y la enzima Super Script III RT. El proceso consistió en una primera desnaturalización del ARN, junto con primer oligo(dT)<sub>20</sub> (5 µM) y 1 mM de una mezcla de dNTPs a 65 °C durante 5 minutos, tras lo cual se añadió la mezcla de reacción que contenía 2 µL de tampón de RT 10X, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µL de DTT 0,1 M, y 1 µL de cada una de las enzimas RNaseOUT y Super Script III RT. La síntesis del ADNc se llevó a cabo a 50 °C durante 50 minutos, terminando la reacción a 85 °C, 5 minutos. Para eliminar las trazas de ARN no retrotranscritas a ADNc, la mezcla se trató con RNasa H durante 20 minutos a 37 °C. Todas las etapas se realizaron en termociclador MyCycler (Biorad Laboratories, Hercules, California). El ADNc obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso o se utilizó para PCR inmediatamente.

Para comprobar el estado del ADNc obtenido se realizó una PCR del gen constitutivo GAPDH (gliceraldehído fosfato deshidrogenasa) mediante la enzima REDTaq Polymerase (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos, Sigma). Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 2 y el producto de PCR obtenido es de 90 bp.

El mix de reacción utilizado para la PCR se muestra en la Tabla 1. Cada muestra contiene 48 µL del mix de reacción y 2 µL de ADNc o 2 µL de agua DNase/RNase Free (Ambión, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) en el caso del control negativo.

**Tabla 1.** Mix de reacción para la PCR de GAPDH.

<b>1X</b>	
<b>H<sub>2</sub>O</b>	36,9 µL
<b>DNase/RNase</b>	
<b>Free</b>	
<b>Buffer 10X</b>	5 µL
<b>dNTPs (10 mM)</b>	0,4 µL
<b>FP</b>	1,6 µL
<b>RP</b>	1,6 µL
<b>REDTaq</b>	2,5 µL
<b>Polymerase</b>	
<b>Total</b>	48 µL

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

Una vez terminada la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE con bromuro de etidio (0,5 µl/mL) durante 45 minutos a 100 V y 2 µl de un marcador de 50 bp para comprobar el resultado.

### PCR a tiempo real (q-PCR)

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

Los genes endógenos de referencia utilizados fueron β-actina y GAPDH. La reacción se llevó a cabo utilizando la iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad Laboratories, Hercules, California), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los cebadores utilizados son los mismos se muestran en la Tabla 2, a una concentración final de 300 mM.

**Tabla 2.** Secuencias de los cebadores utilizados

Gen	Cebador directo (5'-secuencia- 3')	Cebador reverso (5'-secuencia- 3')
GAPDH	5'-CAAGGTACATCCATGACCACTTG-3'	5'-GGTCCACCACCCCTGTTGCTGTAG-3'
β-actina	5'-CTCTCCAGCCTCCTTCCT-3'	5'-GGGCAGTGATCTCTTCTGC-3'
AANAT	5'-GCTGGTGCCCTTTACCAAGA-3'	5'-CAGTGCATCTCCGTGAAGGT-3'
ASMT	5'-CTCTCCAGCCTCCTTCCT-3'	5'-GAGTACAGCAGCGTGGTCAG-3'

La reacción de q-PCR se realizó en ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Se realizaron 40 ciclos de 15 segundos at 95 °C y 1 min a 60 °C, precedidos por un paso de desnaturización inicial de 2 min a 95 °C. Finalmente se realizó una curva de *melting* consistente en 15 segundos a 95 °C, 1 min a 60 °C y 15 segundos a 95 °C.

Para la cuantificación de los resultados se utilizó el método  $\Delta\Delta Ct$ , y se expresaron como *fold change* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

## **DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS POR WESTERN-BLOT**

### **EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DEL TESTÍCULO**

La extracción de proteínas se realizó siguiendo el mismo procedimiento para las muestras de todos los machos: se partió de una porción de tejido testicular de 250 mg, mantenido a -80 °C y a continuación se añadieron 2,5 mL de tampón de extracción (125 mM de Tris-HCl pH 6,8, 4% (v/v) SDS, 10% (v/v) de inhibidor de proteasas 10X (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos)) y se homogeneizaron con el homogeneizador de tejidos Ultra Turrax (IKA T25 Digital Ultra-Turrax® Homogenizer, Staufen, Alemania).

El homogeneizado se centrifugó a 13000 x g durante 5 minutos, a 4 °C y se retiró el sobrenadante. La concentración de proteínas de cada muestra se evaluó mediante el método Bradford y se congelaron a -20 °C hasta su evaluación.

### **SDS-PAGE Y WESTERN-BLOT**

Se utilizó el mismo protocolo para todas las proteínas estudiadas. Cada muestra se diluyó hasta una concentración de 15 µg totales de proteína en tampón de carga (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 2,5 % (v/v), azul de bromofenol 0,002 % (v/v), 5% de β-mercaptopetanol y 10 % de glicerol). Las muestras se cargaron en geles de 15 pocillos del 12% de acrilamida para AANAT y de 10% para ASMT y 1,5 mm de grosor. Las proteínas se separaron en una dimensión siguiendo el método Laemmli (1970) utilizando patrones de comparación de pesos moleculares, de 10 a 250 kDa (Biorad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos). Las condiciones de electroforesis fueron 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 (Biorad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos). 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0,1% (p/v) de Tween 20) con 5% (p/v) BSA.

La detección de AANAT se realizó mediante la incubación durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario polyclonal Anti-Serotonin N-acetyltransferase antibody (Abcam, Reino Unido), y ASMT mediante el anticuerpo polyclonal anti-ASMT (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Estados Unidos), ambos generados en conejo y a una dilución 1:1000 en Tween-PBS con BSA al 1% (p/v). Como control de carga, y para el cálculo final de resultados, se incubó de forma simultánea con un anticuerpo polyclonal anti-tubulina generado en ratón y a una dilución 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Estados Unidos).

Al día siguiente se llevaron a cabo tres lavados de las membranas de 15 minutos con Tween-PBS, tras lo cual se incubaron con los anticuerpos secundarios *donkey anti-rabbit 700 CW* y *donkey anti-mouse 800 CW* (LI-COR biosciences, Lincoln, NE,

Estados Unidos) ambos a una dilución 1/30.000 (v/v) en Tween-PBS con BSA al 1% (p/v) durante una hora y cuarto a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, las membranas se lavaron de nuevo tres veces en Tween-PBS, se revelaron y la intensidad de las bandas obtenidas se cuantificó utilizando el sistema Odissey CLx Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, Estados Unidos).

### ANALISIS ESTADÍSTICO

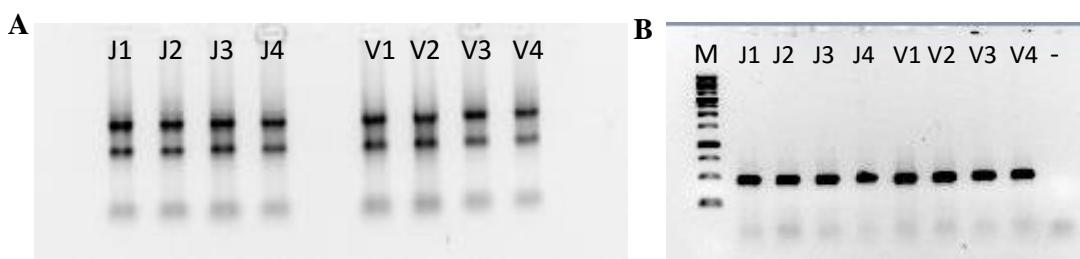
Los datos obtenidos tanto en el análisis de expresión génica como en cuantificación de proteínas se analizaron utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov para determinar su distribución normal. En función de este resultado, los niveles de expresión se analizaron mediante un ANOVA de dos vías para determinar el efecto de la estación reproductiva y la edad sobre los resultados. Posteriormente, los grupos experimentales se compararon dos a dos mediante un test de Bonferroni. El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prism versión 5.01.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### EXPRESIÓN GÉNICA DE AANAT Y ASMT EN MACHOS OVINOS DE DIFERENTE EDAD Y ESTACIÓN REPRODUCTIVA

#### Obtención de ARN y ADNc

Tras la extracción del ARN de los diferentes machos se determinó su concentración mediante espectrofotometría y su pureza mediante la observación de las bandas correspondientes al ARN ribosómico por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 4A). Tras la retrotranscripción también se comprobó la calidad del ADNc obtenido mediante la amplificación por PCR del gen constitutivo GAPDH (figura 4B).



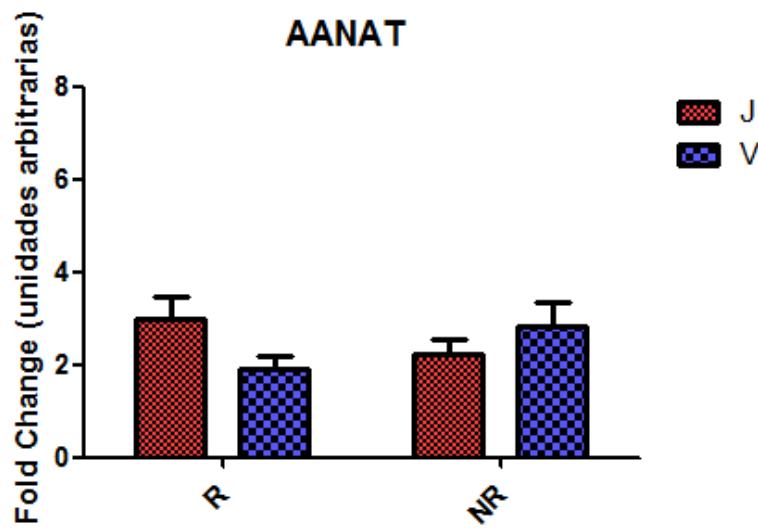
**Figura 4:** Imagen representativa de la electroforesis en agarosa 1% del RNA de 8 de los machos para determinar su calidad (A) y electroforesis en agarosa 1% del producto de PCR de GAPDH de 8 machos (B), marcador de peso molecular (M) y control negativo (-).

#### Cuantificación de la expresión génica de AANAT y ASMT mediante q-PCR

El ADNc de todos los machos, comprobado mediante la PCR de GAPDH se utilizó para realizar una cuantificación de la expresión génica de las enzimas de síntesis de melatonina AANAT y ASMT mediante q-PCR.

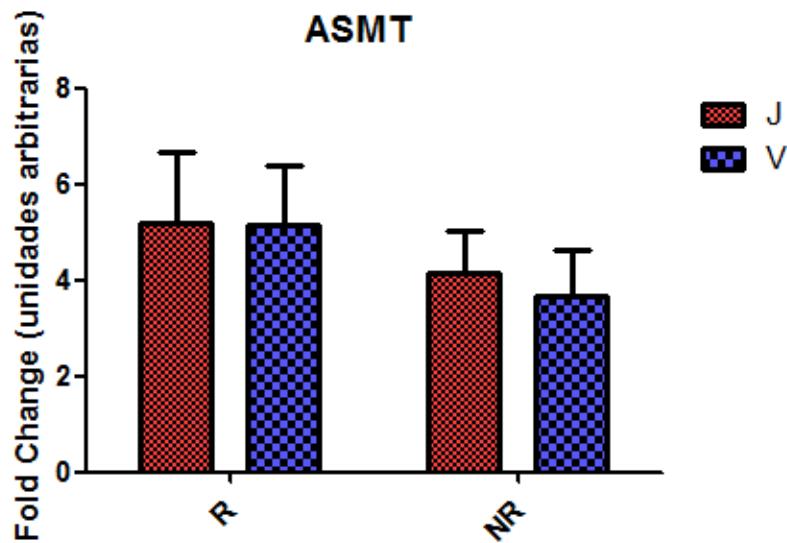
Esta técnica detectó los transcriptos de los genes de AANAT y ASMT en todos los machos estudiados. Además, se determinaron los niveles de expresión de AANAT y ASMT mediante normalización con dos genes endógenos GAPDH y  $\beta$ -actina, utilizando el método de  $\Delta\Delta Ct$ .

Los resultados muestran que no hay variaciones significativas de expresión de AANAT entre los 4 grupos de estudio, y tampoco se observó un efecto de la edad o de la estación reproductiva sobre esta enzima (Figura 5).



**Figura 5.** Análisis de la expresión génica de AANAT en testículos de machos ovinos de distinta edad (J: jóvenes, V: viejos) y en ambas estaciones reproductivas (R: reproductiva, NR: no reproductiva), realizado mediante q-PCR. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM del *fold change* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Número de animales: machos jóvenes en época reproductiva (n=5) y no reproductiva (n=6), viejos en época reproductiva (n=8), viejos en época no reproductiva (n= 8).

En el caso de ASMT (Figura 6) tampoco hay diferencias estadísticamente significativas. Se observa que esta enzima se expresa en mayor medida que AANAT y aunque el análisis estadístico no ha determinado que haya diferencias estadísticas entre estaciones, se observó una mayor expresión en la época reproductiva.



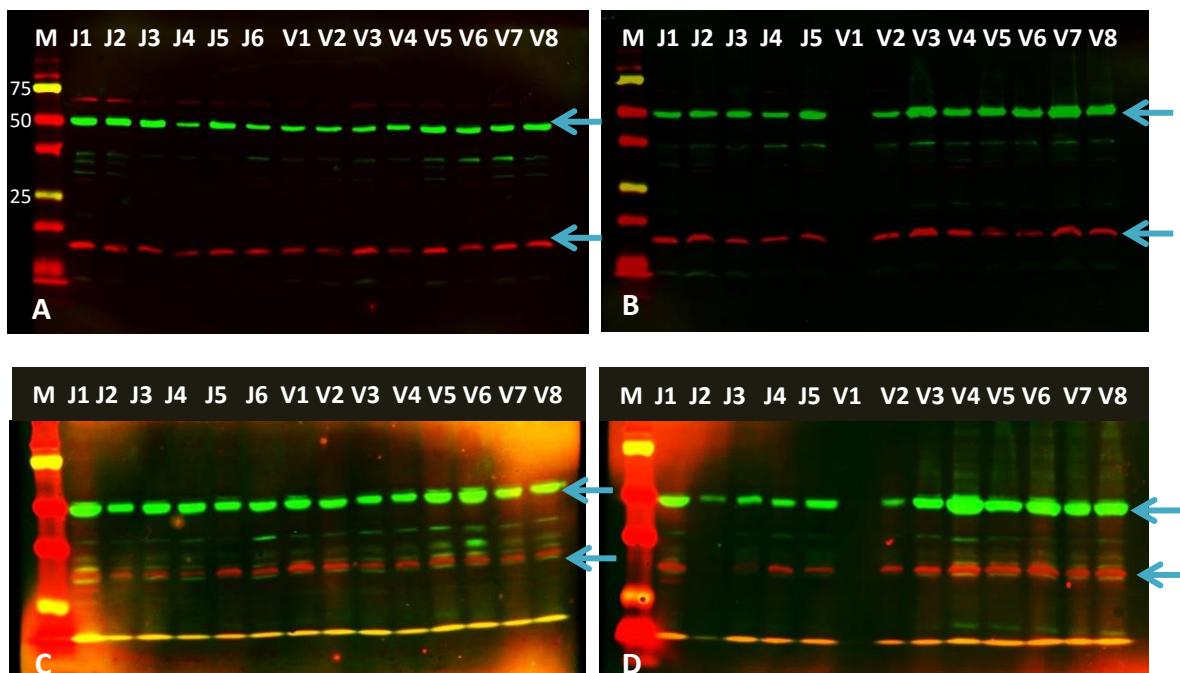
**Figura 6.** Análisis de la expresión génica de ASMT en testículos de machos ovinos de distinta edad (J: jóvenes, V: viejos) y en ambas estaciones reproductivas (R: reproductiva, NR: no reproductiva), realizada mediante q-PCR. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM del *fold change* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Número de animales: machos jóvenes en época reproductiva (n=5) y no reproductiva (n=6), viejos en época reproductiva (n=8), viejos en época no reproductiva (n= 8).

Dado que no se observan variaciones en la expresión génica en ambas enzimas en ninguno de los grupos de estudio, nos podría indicar que la síntesis de melatonina en el testículo no está influida por el fotoperiodo ni por la edad. Por lo tanto, las variaciones de la concentración de melatonina en plasma seminal ovino en función de la estación reproductiva determinadas previamente (Casao et al. 2010) se pueden atribuir únicamente a variaciones en los niveles de melatonina secretada por la glándula pineal. Esto sería razonable, ya que hasta el momento no se han encontrado evidencias de que la información del fotoperiodo que llega a través de la retina alcance tejidos extrapineales, como el testículo. De hecho, no se han detectado variaciones estacionales de melatonina extrapineal en ninguno de los tejidos con capacidad de sintetizar esta hormona (ver revisión de Acuna-Castroviejo et al. (2014)).

Tampoco hemos observado variaciones en la expresión génica de las enzimas de síntesis de melatonina en función de la edad. Hay pocos estudios sobre el efecto del envejecimiento en la expresión génica de estas enzimas en otros tejidos extrapineales, y ofrecen resultados contradictorios: en rata, la expresión de AANAT se ve aumentada en riñón y corazón, disminuye en bazo e hígado y se mantiene invariable en timo; sin embargo, en el caso de ASMT disminuye en hígado, aumenta en bazo y corazón y se mantiene constante en timo y riñón (Sanchez-Hidalgo et al. 2009). En nuestro caso, la edad no parece ser un factor que afecte la expresión génica de estas enzimas.

## ANÁLISIS MEDIANTE WESTERN-BLOTT DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE AANAT Y ASMT

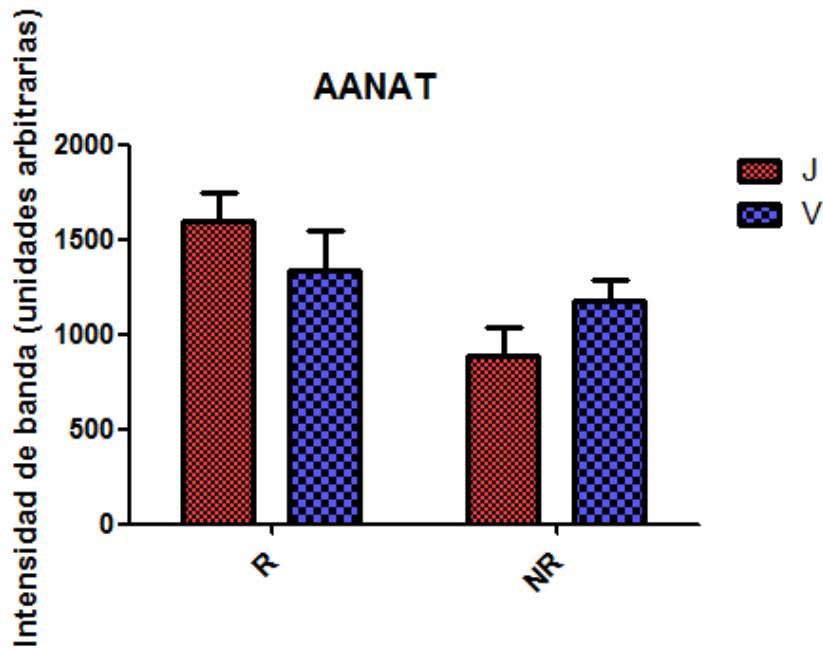
El análisis densitométrico realizado mediante Western-Blot de las proteínas extraídas del testículo de los animales de nuestro estudio revela una banda de 23 kDa (Figura 7), que se correspondería con la enzima AANAT y otra banda de 38 kDa, correspondiente a la enzima ASMT, además de otra banda de 55 kDa correspondiente a tubulina, y que es nuestro control de carga.



**Figura 7.** Western Blot representativo del análisis densitométrico de las enzimas de síntesis de melatonina AANAT (paneles A y B) y ASMT (paneles C y D) en el testículo de moruecos jóvenes (J) y viejos (V) en estación no reproductiva (paneles A y C) y estación reproductiva (paneles B y D).

La cuantificación de niveles de AANAT en el tejido testicular (Figura 8) muestra que los machos jóvenes en estación reproductiva presentan mayores niveles de esta enzima que los machos del mismo grupo de edad en estación no reproductiva, mostrando una tendencia a la significación ( $p<0.1$ ). En el caso de los machos viejos no se observan diferencias significativas en función del fotoperiodo y tampoco se observan diferencias entre grupos de edad.

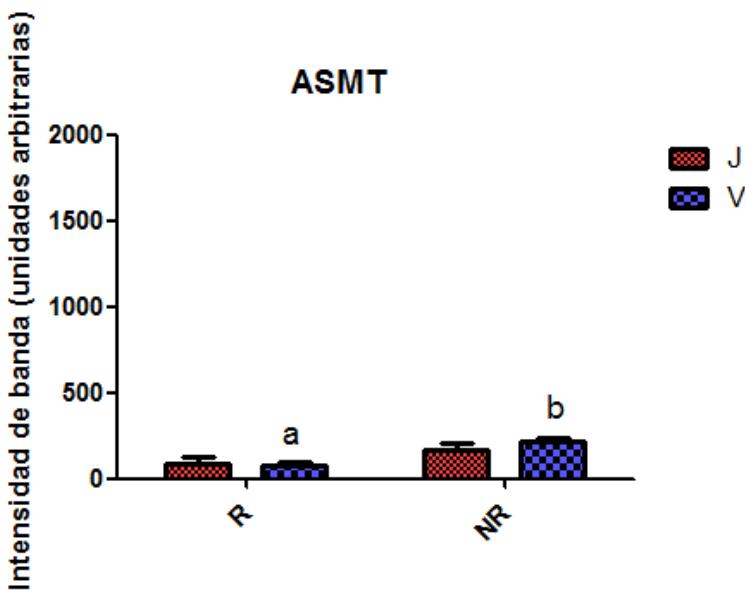
Estos resultados sugieren que, a pesar de no existan diferencias en la expresión génica de AANAT en machos jóvenes entre las distintas estaciones reproductivas, en el caso de los jóvenes en estación reproductiva parece que se traduce más proteína que en estación no reproductiva.



**Figura 8.** Cuantificación de los niveles de AANAT en testículos de machos ovinos de distinta edad (J: jóvenes, V: viejos) y en ambas estaciones reproductivas (R: reproductiva, NR: no reproductiva), analizada mediante Western Blot. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM de la intensidad de las bandas (unidades arbitrarias). Número de animales: machos jóvenes en época reproductiva (n=5) y no reproductiva (n=6), viejos en época reproductiva (n=8), y en no reproductiva (n= 8).

Por el contrario, el análisis densitométrico de los niveles de ASMT por Western-Blot (Figura 9) determinó que los niveles de esta enzima son mayores, con tendencia a la significación ( $p<0.1$ ), en el testículo de machos viejos obtenidos en estación no reproductiva en comparación con los jóvenes de esa misma estación. También se observaron diferencias significativas al comparar estos animales con los machos viejos en estación reproductiva ( $p<0.05$ ). Es decir, que en contra de lo esperado, los niveles de esta enzima son mayores en machos viejos en estación no reproductiva.

Sin embargo, hay que destacar que al compararlos con los niveles de AANAT (Figura 8), la cantidad relativa de ASMT (Figura 9) es muy inferior, por lo que, al ser esta última enzima la limitante en la síntesis de melatonina, estas diferencias observadas en el grupo de los machos viejos no repercutiría en gran medida en los niveles de melatonina en plasma seminal.



**Figura 9.** Cuantificación de los niveles de ASMT en testículos de machos ovinos de distinta edad (J: jóvenes, V: viejos) y en ambas estaciones reproductivas (R: reproductiva, NR: no reproductiva), analizada mediante Western Blot. Los resultados se muestran como media ± SEM de la intensidad de las bandas (unidades arbitrarias). Número de animales: machos jóvenes en época reproductiva (n=5) y no reproductiva (n=6), viejos en época reproductiva (n=8), viejos en época no reproductiva (n= 8). a,b: representan P<0,05.

En nuestro estudio, los niveles de las enzimas de síntesis de melatonina cuantificados por Western-Blot no se corresponden con los niveles de expresión génica analizados por q-PCR, aunque este hecho ya se había observado en trabajos previos (Bernard et al. 1993). En el caso de AANAT, los jóvenes expresan más proteína ( $p<0,1$ ) en estación reproductiva que en no reproductiva, sin que se hayan observado variaciones en los niveles de ARNm.

En el caso de ASMT se ha visto que aumentan los niveles de esta enzima en el tejido testicular en machos viejos en estación no reproductiva, dato que no se correlaciona ni con los niveles de ARNm analizados ni con el hecho de que la concentración de melatonina en el plasma seminal sea menor en esta época. Aunque no es la primera vez que se observa aumento de la expresión con la edad de esta enzima en tejidos extrapineales (Sanchez-Hidalgo et al. 2009), estos lo asocian con un mecanismo de compensación en respuesta al descenso de la síntesis de melatonina pineal, dada su función moduladora en el sistema inmune (Tan et al. 2010). Teniendo en cuenta esto, el aumento en los machos viejos en estación no reproductiva de los niveles ASMT, así como la no disminución en el caso de AANAT, podría relacionarse con algún tipo de mecanismo de compensación similar, debido al descenso de la secreción de melatonina pineal por la edad y el fotoperiodo, que aseguraría unos niveles adecuados de melatonina en el testículo para la protección frente al daño oxidativo durante la espermatogénesis (Agarwal et al. 2008).

De esta manera, no se observa una diferencia marcada en las expresiones génica o los niveles de las enzimas de síntesis de melatonina entre los grupos de estudio salvo las dos excepciones comentadas anteriormente. Esto sugiere que la síntesis de melatonina en el testículo no responde al estímulo del fotoperiodo o está influida por la edad. Teniendo en cuenta la función que desempeña la melatonina en el tracto reproductor masculino, que es proteger del daño oxidativo (Guneli et al. 2008; Ozen et al. 2008) y que la espermatogénesis en los machos es continua a lo largo del año (Rosa and Bryant 2003), resulta lógico que las enzimas encargadas de su síntesis no varíen su presencia.

De este modo, la variación de la concentración de melatonina en el plasma seminal ovino (Casao et al. 2010) se atribuiría entonces a la melatonina secretada por la glándula pineal, que se acumularía en este fluido, y no a la sintetizada en el testículo. De igual manera, la edad tampoco parece influir de forma clara en las enzimas de síntesis de melatonina ya que no disminuye su expresión génica y sólo se ha observado un incremento significativo en uno de los grupos de estudio.

Finalmente, futuros estudios sobre los niveles de melatonina y ensayos de la actividad enzimática de AANAT y ASMT en el testículo podrían complementar este trabajo con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos en respuesta al fotoperiodo y al envejecimiento.

## **CONCLUSIONES**

- La expresión génica de las enzimas de síntesis de melatonina en el testículo del macho ovino no se ve influenciada ni por la estación reproductiva ni por el proceso de envejecimiento.
- Sin embargo, los niveles de enzima AANAT, cuantificados por Western-Blot son mayores en machos jóvenes en estación reproductiva en comparación con los de la misma edad la estación no reproductiva, a pesar de no haber variaciones en el ARNm.
- Inesperadamente, los niveles de enzima ASMT son mayores en machos viejos en estación no reproductiva. Sin embargo la cantidad relativa de esta enzima en comparación con AANAT es muy inferior en todos los grupos de estudio.
- La no variación en la expresión de las enzimas de síntesis de melatonina en el testículo sugiere que sería la melatonina de origen pineal la responsable de la variación de los niveles de melatonina en plasma seminal entre las estaciones reproductiva y no reproductiva en la especie ovina.

## **CONCLUSIONS**

- Gene expression in melatonin-synthesizing enzymes in ram testis is not influenced by neither photoperiod nor aging process.
- However, AANAT enzyme levels, quantified by Western-Blot, are higher in young males in breeding season compared to the ones in the same age in non-breeding season, despite the fact mRNA levels remain unchanged.
- Unexpectedly, ASMT enzyme levels are higher in older males in non-breeding season. Nevertheless the relative amount of this enzyme compared to AANAT levels is much lower in all study groups.
- The non-variation in the expression of melatonin-synthesizing enzymes in testis suggests that melatonin from pineal gland is responsible of the variation in melatonin levels in seminal plasma between reproductive and non-reproductive season in sheep.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acuna-Castroviejo, D., G. Escames, et al. (2014). "Extrpineal melatonin: sources, regulation, and potential functions." Cellular and Molecular Life Sciences **71**(16): 2997-3025.
- Adam, C. L., C. E. Moir, et al. (1986). "INDUCTION OF EARLY BREEDING IN RED DEER (CERVUS-ELAPHUS) BY MELATONIN." Journal of Reproduction and Fertility **76**(2): 569-573.
- Agarwal, A., K. Makker, et al. (2008). "REVIEW ARTICLE: Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update." American Journal of Reproductive Immunology **59**(1): 2-11.
- Alonso-Vale, M. I. C., S. Andreotti, et al. (2008). "Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes." Journal of Pineal Research **45**(4): 422-429.
- Argo, C. M., J. E. Cox, et al. (1991). "EFFECT OF ORAL MELATONIN TREATMENT ON THE SEASONAL PHYSIOLOGY OF PONY STALLIONS." Journal of Reproduction and Fertility: 115-125.
- Avdi, M., G. Banos, et al. (2004). "Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams." Theriogenology **62**(1-2): 275-282.
- Bernard, M., J. Guerlotte, et al. (1993). "Transcriptional regulation of hydroxyindole O-methyltransferase in the chicken pineal gland: day/night changes and long-term effects of light and darkness." Biochemical Journal **290**(3): 661-664.
- Boutin, J. A., V. Audinot, et al. (2005). "Molecular tools to study melatonin pathways and actions." Trends in Pharmacological Sciences **26**(8): 412-419.
- Brzezinski, A., M. M. Seibel, et al. (1987). "MELATONIN IN HUMAN PREOVULATORY FOLLICULAR-FLUID." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **64**(4): 865-867.
- Casao, A., I. Cebrian, et al. (2010). "Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes." Reproductive Biology and Endocrinology **8**.
- Casao, A., N. Mendoza, et al. (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., R. Perez-Pe, et al. (2013). "The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defence system of Rasa Aragonesa rams." Animal Reproduction Science **138**(3-4): 168-174.

- Casao, A., S. Vega, et al. (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.
- Castanho, A., B. Bothorel, et al. (2014). "Like melatonin, agomelatine (S20098) increases the amplitude of oscillations of two clock outputs: melatonin and temperature rhythms." Chronobiology International **31**(3): 371-381.
- Cebrian-Perez, J. A., A. Casao, et al. (2014). "Melatonin in Sperm Biology: Breaking Paradigms." Reproduction in Domestic Animals **49**: 11-21.
- Claustre, B., J. Brun, et al. (2005). "The basic physiology and pathophysiology of melatonin." Sleep Medicine Reviews **9**(1): 11-24.
- Chemineau, P., B. Malpaux, et al. (1992). "CONTROL OF SHEEP AND GOAT REPRODUCTION - USE OF LIGHT AND MELATONIN." Animal Reproduction Science **30**(1-3): 157-184.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Analytical Biochemistry **162**(1): 156-159.
- D'Alessandro, A. G. and G. Martemucci (2003). "Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram." Animal Reproduction Science **79**(1-2): 93-102.
- Du Plessis, S., K. Hagenaar, et al. (2010). "The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS." Andrologia **42**(2): 112-116.
- Espino, J., Á. Ortiz, et al. (2011). "Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor-and extracellular signal-regulated kinase-mediated pathways." Fertility and Sterility **95**(7): 2290-2296.
- Gadella, B. M., P.-S. Tsai, et al. (2008). "Sperm head membrane reorganisation during capacitation." International Journal of Developmental Biology **52**(5): 473.
- Gonzalez-Arto, M., T. R. d. S. Hamilton, et al. (2016). "Evidence of melatonin synthesis in the ram reproductive tract." Andrology **4**(1): 163-171.
- Guneli, E., K. Tugyan, et al. (2008). "Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats." European Surgical Research **40**(4): 354-360.
- Hardeland, R. (2008). "Melatonin, hormone of darkness and more - occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites." Cellular and Molecular Life Sciences **65**(13): 2001-2018.
- Hardeland, R. (2010). "Melatonin Metabolism in the Central Nervous System." Current Neuropharmacology **8**(3): 168-181.
- Jang, H., Y. Kim, et al. (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.

Jena, G. and P. P. Trivedi (2014). "A Review of the Use of Melatonin in Ulcerative Colitis: Experimental Evidence and New Approaches." Inflammatory Bowel Diseases **20**(3): 553-563.

Karagiannidis, A., S. Varsakeli, et al. (2000). "Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece." Small Ruminant Research **37**(1-2): 125-130.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." nature **227**: 680-685.

Luboshitzky, R., Z. Shen-Orr, et al. (2002). "Seminal plasma melatonin and gonadal steroids concentrations in normal men." Archives of andrology **48**(3): 225-232.

Malpaux, B., C. Viguie, et al. (1997). "Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe." Brain Research Bulletin **44**(4): 431-438.

McIntyre, I. M., T. R. Norman, et al. (1987). "MELATONIN RHYTHM IN HUMAN-PLASMA AND SALIVA." Journal of Pineal Research **4**(2): 177-183.

Misztal, T., K. Romanowicz, et al. (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

Odo, M., K. Koh, et al. (2014). "Changes in Circadian Rhythm for mRNA Expression of Melatonin 1A and 1B Receptors in the Hypothalamus Under a Neuropathic Pain-Like State." Synapse **68**(4): 153-158.

Ozen, O. A., M. A. Kus, et al. (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.

Pang, S., C. Tsang, et al. (1990). "Fluctuation of blood melatonin concentrations with age: result of changes in pineal melatonin secretion, body growth, and aging." Journal of Pineal Research **8**(2): 179-192.

Pena, C., J. Rincon, et al. (2007). "Chemotactic effect of melatonin on leukocytes." Journal of Pineal Research **43**(3): 263-269.

Poeggeler, B., R. J. Reiter, et al. (1993). "MELATONIN, HYDROXYL RADICAL-MEDIATED OXIDATIVE DAMAGE, AND AGING - A HYPOTHESIS." Journal of Pineal Research **14**(4): 151-168.

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.

Reiter, R. J. (1995). "THE PINEAL-GLAND AND MELATONIN IN RELATION TO AGING - A SUMMARY OF THE THEORIES AND OF THE DATA." Experimental Gerontology **30**(3-4): 199-212.

- Reiter, R. J., D. X. Tan, et al. (2013). "The Universal Nature, Unequal Distribution and Antioxidant Functions of Melatonin and Its Derivatives." Mini-Reviews in Medicinal Chemistry **13**(3): 373-384.
- Rosa, H. and M. Bryant (2003). "Seasonality of reproduction in sheep." Small Ruminant Research **48**(3): 155-171.
- Sanchez-Hidalgo, M., C. A. De La Lastra, et al. (2009). "Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues." Experimental Gerontology **44**(5): 328-334.
- Sarabia, L., I. Maurer, et al. (2009). "Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA." Ecotoxicology and environmental safety **72**(2): 663-668.
- Tamura, H., A. Takasaki, et al. (2008). "Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate." Journal of Pineal Research **44**(3): 280-287.
- Tamura, H., A. Takasaki, et al. (2013). "Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle [Review]." Endocrine journal **60**(1): 1-13.
- Tan, D.-X., X. Zheng, et al. (2014). "Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions." International journal of molecular sciences **15**(9): 15858-15890.
- Tan, D. X., R. Hardeland, et al. (2010). "The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness." Biological Reviews **85**(3): 607-623.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, et al. (2013). "Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes." Journal of Pineal Research **54**(2): 127-138.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, et al. (2007). "One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?" Journal of Pineal Research **42**(1): 28-42.
- Turek, F. W., C. Desjardins, et al. (1976). "MELATONIN-INDUCED INHIBITION OF TESTICULAR FUNCTION IN ADULT GOLDEN-HAMSTERS." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **151**(3): 502-506.
- Verburg-van Kemenade, B. M. L., L. M. Van der Aa, et al. (2013). "Neuroendocrine-immune interaction: Regulation of inflammation via G-protein coupled receptors." General and Comparative Endocrinology **188**: 94-101.
- Zhernakova, N. I. and S. N. Rybnikova (2008). "The role of melatonin in pathogenesis of diseases of digestive system." Klinicheskai meditsina **86**(4): 14-18.