



**Universidad**  
Zaragoza

# Trabajo Fin de Grado

**Estudio de la expresión génica**

**de las enzimas de síntesis de melatonina  
en el cerdo doméstico y el jabalí**

Autor

Sara Lumbreras Roche

Director/es

Adriana Casao Gascón

José Álvaro Cebrián Pérez

Facultad de Veterinaria

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Grupo de Biología y Biotecnología de la Reproducción

Junio 2017



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. Sara Lumbreras Roche, ha realizado bajo nuestra dirección, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Trabajo Fin de Grado titulado "Estudio de la expresión génica de las enzimas de síntesis de melatonina en el cerdo doméstico y en el jabalí". 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 23 de Julio de 2017.



Adriana Casao Gascón



José Álvaro Cebrián Pérez

# ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Antecedentes.....	3
Objetivos y planteamiento del trabajo.....	8
Materiales y métodos.....	9
Expresión génica de AANAT y ASMT en órganos del tracto reproductor del cerdo doméstico y el jabalí.....	9
Obtención de muestras.....	9
Aislamiento y limpieza de ARN total.....	9
Síntesis de ADNc.....	10
Expresión génica de AANAT y ASMT mediante PCR de punto final.....	11
Cuantificación de la expresión génica de AANAT mediante PCR a tiempo real.....	12
Detección de las proteínas de órganos por Western Blotting.....	13
Extracción de proteínas.....	13
SDS-PAGE y Western-Blot.....	13
Análisis estadístico.....	14
Resultados y discusión.....	15
Identificación de las enzimas de síntesis de melatonina en el tracto reproductor masculino del cerdo doméstico y el jabalí.....	15
Identificación de la expresión génica de AANAT en el aparato reproductor del cerdo y el jabalí mediante PCR de punto final.....	15
Identificación de la presencia de AANAT en el aparato reproductor del cerdo y el jabalí mediante Western-Blot.....	16
Identificación de la expresión génica de ASMT en el aparato reproductor del cerdo y el jabalí mediante PCR de punto final.....	17
Identificación de la presencia de ASMT en el aparato reproductor del cerdo y el jabalí mediante Western-Blot.....	18

Diferencias en la expresión génica de AANAT en los órganos del apartao reproductor masculino del cerdo doméstico y el jabalí.....	19
Conclusiones.....	21
Conclussions.....	21
Bibliografía.....	22
Anexo I.....	26

## RESUMEN

La melatonina es una hormona ubicua que se sintetiza mayoritariamente en la glándula pineal gracias a las enzimas arilalquilamina-N-acetiltransferasa (AANAT) y N-acetilserotonin-O-metiltransferasa (ASMT). Entre otras funciones, está implicada en la regulación del ritmo circadiano y la estacionalidad reproductiva en muchos mamíferos.

El jabalí, considerado el ancestro del cerdo doméstico, presenta una reproducción estacional, mientras que el cerdo doméstico se reproduce a lo largo del año. Ambos se consideran subespecies dentro de la misma especie. Además, se ha detectado la presencia de melatonina en el plasma seminal del verraco, lo que sugeriría un posible origen extrapineal de la misma.

Por tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de las enzimas AANAT y ASMT, implicadas en la síntesis de melatonina, en el tracto reproductor masculino del cerdo doméstico y el jabalí Mediante Western-Blot y PCR de punto final, y analizar las diferencias de los niveles de expresión génica de estas enzimas entre ambos mediante PCR cuantitativa.

Los resultados obtenidos confirman tanto la expresión génica como la presencia de AANAT en todos los órganos del tracto reproductor del cerdo doméstico y el jabalí, a excepción de las glándulas bulbouretrales del cerdo doméstico, donde no se pudo confirmar la presencia de esta enzima mediante Western-blot. La enzima ASMT, fue detectada en la mayoría de órganos de ambas subespecies a nivel proteico pero no fue posible su estudio a nivel génico.

El análisis por qPCR reveló que los niveles de expresión génica de AANAT eran mayores en el cerdo que en el jabalí ( $p<0,05$ ) y que la próstata es el órgano que más expresa AANAT en ambas subespecies.

En conclusión, los órganos del tracto reproductor masculino del cerdo y jabalí, y principalmente la próstata, podrían tener la capacidad de sintetizar melatonina, pero sería necesario confirmar la expresión génica de ASMT en ellos.

## **ABSTRACT**

Melatonin is an ubiquitous hormone that is synthesized mainly in the pineal gland by arylalkylamine-N-acetyltransferase (AANAT) and N-acetylserotonin-O-methyltransferase (ASMT) enzymes. Among other functions, it is involved in the regulation of circadian rhythm and the reproductive seasonality in many mammals.

Wild boar, which is considered the ancestor of the domestic pig, presents a seasonal reproduction, while the domestic pig breeds throughout the year. Both are considered subspecies within the same species. In addition, the presence of melatonin has been detected in the domestic boar's seminal plasma, which suggests a possible extrapineal origin.

Therefore, the objective of this work was to determine the presence of AANAT and ASMT enzymes involved in the melatonin synthesis in the male reproductive tract of the domestic pig and the wild boar, by Western Blot and end-point PCR, and to analyze the differences in the gene expression levels between both subspecies by quantitative PCR.

Our results confirmed both the gene expression and the presence of AANAT in all organs of the reproductive tract of the domestic pig and the boar, except for the bulbourethral glands of the domestic pig, where the presence of this enzyme could not be confirmed by Western-Blot. ASMT enzyme was detected in most organs of both subspecies at the protein level, but it was not possible to study its gene expression.

Analysis by qPCR revealed that AANAT levels were higher in the domestic pig than in the wild boar ( $p < 0.05$ ) and that the prostate is the organ which most express AANAT in both of them.

In conclusion, the male reproductive organs of the domestic pig and the wild boar, and mainly the prostate, could synthesize melatonin, but it would be necessary to confirm the gene expression of ASMT in them.

## ANTECEDENTES

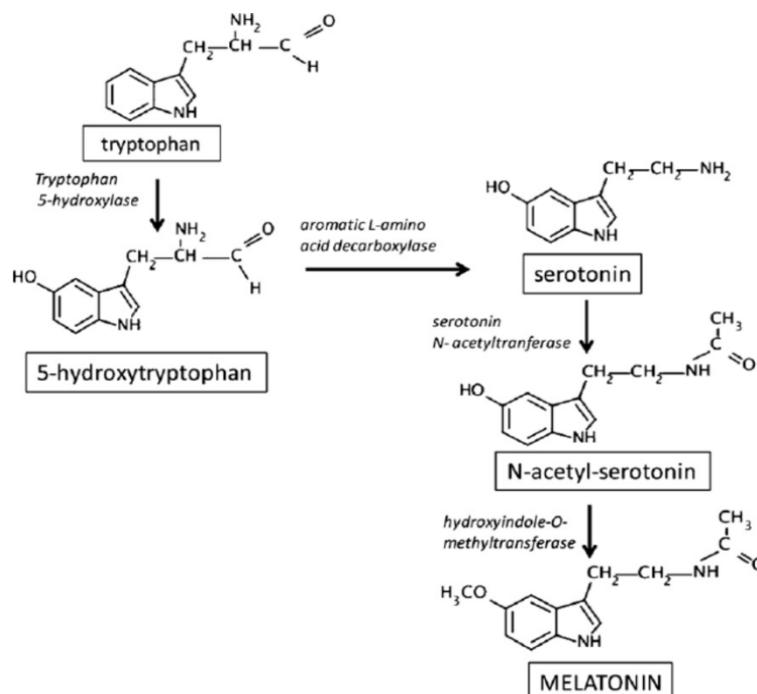
### *La melatonina y sus funciones*

La melatonina es una hormona ampliamente distribuida entre los seres vivos y que está presente en animales, bacterias, algunos protistas, hongos, algas y plantas (Tan et al. 2014). Entre los organismos unicelulares su acción principal es antioxidante (Tan et al. 2007), pero en organismos pluricelulares está implicada, además, en gran variedad de funciones. Entre ellas se encuentran la regulación de: el ritmo circadiano y la reproducción estacional (Chemineau et al. 2008), el metabolismo de glucosa y lípidos (Yoshikazu Yonei 2010), la presión sanguínea y la respuesta inmune (Pandi-Perumal et al. 2008); además, induce la diferenciación de los osteoblastos (Witt-Enderby et al. 2003) y posee un efecto antiproliferativo en células tumorales (Das et al. 2010), entre otras muchas acciones.

La melatonina puede ejercer alguna de estas funciones gracias a sus propiedades antioxidantes (Reiter et al. 2000), actuando directamente sobre posibles radicales libres ya formados o bien estimulando la acción de otras enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa o la glutation peroxidasa (Jang et al. 2010). Asimismo, también puede interactuar con moléculas citosólicas como la calmodulina (Benitez-King et al. 1993) o la tubulina (Benitez-King 2006) o actuar a través de su unión con los receptores de membrana MT1 y MT2 (Dubocovich y Markowska 2005) y MT3/QR2 (Jockers et al. 2008).

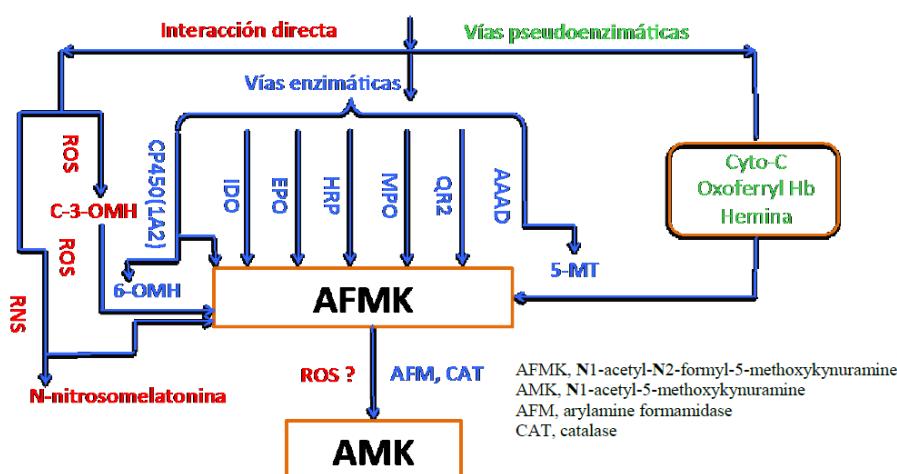
### *Metabolismo de la melatonina*

La melatonina se sintetiza en un proceso que consta de 4 pasos y cuyo precursor es el aminoácido L-triptófano (Fig. 1). En primer lugar, dicho aminoácido es hidroxilado mediante la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) formando 5-hidroxitriptófano. A continuación, se produce una descarboxilación que da lugar a la serotonina por acción de la aminoácido aromático descarboxilasa (AAD); seguidamente la serotonina es acetilada por acción de la arilalquilamina-N-acetyltransferasa (AANAT) formándose N-acetilserotonin. El último paso es catalizado por la N-acetilserotonin-O-metiltransferasa (ASMT) que forma la melatonina o N-acetyl-5-metoxitriptamina (Slominski et al. 2012). Para su degradación existen diferentes rutas alternativas (Fig. 2).



**Figura 1:** Representación de la ruta de síntesis de la melatonina (Carpentieri et al. 2012).

### MELATONINA



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

En mamíferos, la principal ruta de degradación es la 6-hidroxilación mediada por ciertas isoformas del citocromo P450, principalmente la CYP1A2, en la que el metabolito resultante, 6-hidroximelatonina, es sulfatado y excretado por orina (Tan et al. 2010). Otras isoformas del citocromo P450 son capaces de catalizar la O-demetilación de la melatonina formando su precursor, N-acetil-serotonina, que posteriormente puede también ser sulfatado o glucuronizado y excretado por la orina (Ma et al. 2005). Otras enzimas implicadas en la degradación de la melatonina, como la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), mieloperoxidasa

(MPO), peroxidasa de rábano (HRP) y eosinofil peroxidasa (EPPO), la convierten en N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinuramina (AFMK), que a su vez puede ser metabolizada por la catalasa o la arilamina formamidasa para formar N1-acetil-5-metoxikinuramina (AMK) (Tan et al. 2007).

Existe también una vía de degradación pseudoenzimática, que converge con la ruta anterior en el metabolito AFMK (Tan et al. 2010). Además, la melatonina puede ser metabolizada por aril acilamidasas en mamíferos y por melatonina deacetilasa en otras especies dando lugar a 5-metoxitriptamina (Slominski et al. 2016). También se puede transformar en 3-hidroximelatonina cíclica o nitromelatonina por una vía independiente de enzimas, a partir de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y de oxígeno (ROS) (Tan et al. 2014).

### ***Melatonina pineal y extrapineal***

La melatonina se sintetiza principalmente en la glándula pineal, desde donde es directamente secretada a la circulación sanguínea (Pandi-Perumal et al. 2008). La melatonina pineal experimenta un máximo de secreción en horas nocturnas, mientras que durante el día es secretada a niveles basales (Andersson 2001). De este modo este patrón de secreción regula los ritmos circadianos como los de la temperatura corporal y el ciclo del sueño (Turek 2007), y la reproducción estacional (Chemineau et al. 2008).

Sin embargo, la glándula pineal no es el único órgano con capacidad de sintetizar melatonina descrito hasta la fecha; así, se ha demostrado que la retina, el tracto gastrointestinal, los linfocitos, la médula ósea, el cerebro y la piel también sintetizan melatonina extrapineal (Pandi-Perumal et al. 2008). Además, se ha detectado su presencia en el fluido cerebral, la saliva, la orina, el plasma seminal, el líquido amniótico, la leche materna y el fluido folicular (Acuna-Castroviejo et al. 2014).

En relación a su presencia en el tracto reproductor masculino, la melatonina no solo ha sido identificada en el plasma seminal de seres humanos (Luboshitzky et al. 2002) y otros mamíferos como el morueco (Casao et al. 2010a), el caballo, el burro, el toro, el perro y el cerdo (Gonzalez-Arto et al. 2016b) sino que también lo han sido sus receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub> en la membrana de los espermatozoides eyaculados de estas especies (van Vuuren et al. 1992; Casao et al. 2012) (Gonzalez-Arto et al. 2016b).

En el morueco, la melatonina presenta concentraciones mayores en el plasma seminal que las que hay en la sangre circulante durante el día. Dado que su vida media no es muy elevada, esto sugiere que la melatonina presente en plasma seminal podría tener un origen tanto pineal como extrapineal. De hecho, en la especie ovina, los testículos podrían ser los órganos de síntesis de la melatonina del plasma seminal, puesto que en ellos se encontraron los mayores niveles de expresión génica de las enzimas responsables de su síntesis (Gonzalez-Arto et al. 2016a).

En ovino, esta melatonina sintetizada en el testículo podría actuar como un protector del eyaculado frente al daño oxidativo (Casao et al. 2010b). Además, la melatonina en plasma seminal ovino presenta variaciones de concentración a lo largo del año, con mayores concentraciones en época reproductiva respecto a la época no reproductiva (Casao et al. 2010a). Estas variaciones en la concentración de melatonina en plasma seminal a lo largo del año también ha sido observada en otras especies como la porcina (Barranco et al. 2017).

### ***La melatonina y la estacionalidad reproductiva***

En mamíferos, la melatonina es secretada por la glándula pineal durante la noche actuando como una hormona mediadora de información del ritmo circadiano (Dun-Xian Tan 2010). De esta forma, la secreción nocturna de melatonina pineal proporciona información de la duración de la noche y del día, y regula la estacionalidad (Trivedi y Kumar 2014).

En este proceso, la información de la luz es percibida por la retina y transmitida directamente al núcleo supraquiasmico (NSQ) y de allí la información se transmite a la glándula pineal, que sintetiza melatonina. Así, en la mayoría de mamíferos la duración del pico nocturno de melatonina correlaciona positivamente con la duración del período de oscuridad y por tanto la melatonina es la molécula implicada en la transmisión de la información del fotoperiodo (Malpaux et al. 2001).

La mayoría de las especies muestran variaciones estacionales en su fisiología y comportamiento reproductivo y, aunque los mecanismos exactos por los cuales los animales regulan esta estacionalidad no son enteramente conocidos, el NSQ y la glándula pineal vía secreción de melatonina son las principales estructuras implicadas (Cardinali y Pevet 1998). El cambio en la duración de la secreción nocturna de melatonina es una señal pasiva que sincroniza la actividad reproductiva estacional con los cambios estacionales ambientales y ajusta la actividad gonadal en consecuencia, ejerciendo su actividad de sincronización a través del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Malpaux et al. 1999). La melatonina regula la secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) por el hipotálamo y por tanto de los cambios en la secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), responsables de la actividad ovárica en la hembra y la producción de espermatozoides en el macho (Malpaux et al. 1997). Todo ello hace que la melatonina sea el principal regulador de la reproducción en los animales estacionales.

El principal objetivo de esta reproducción estacional es que la descendencia nazca durante la primavera y el verano, cuando los alimentos estén más disponibles. En animales con ciclo reproductivo de día largo como el hámster sirio y el caballo, esta hormona tiene efecto reproductivo inhibitorio mientras que en los animales de día corto tiene un efecto estimulador, como es el caso de las ovejas, cabras y ciervos (Gerlach y Aurich 2000).

Además, la melatonina aumenta la actividad sexual en ovino, los niveles de testosterona, estradiol y enzimas antioxidantes en el plasma seminal de esta especie y mejora la concentración, motilidad y criopreservación de su esperma (Cebrian-Perez et al. 2014). En

conejos, el tratamiento con melatonina mejora la cantidad y calidad del eyaculado, así como la actividad sexual en general, y en la coneja también disminuye el intervalo entre partos y la mortalidad antes del destete (Mousa-Balabel y Mohamed 2011).

En el caso de la especie porcina, la melatonina a baja concentración mejora la calidad seminal del verraco durante la refrigeración (Martin-Hidalgo et al. 2011), probablemente gracias a su papel antioxidante (Jang et al. 2010). Esta acción podría estar mediada por su unión a sus receptores MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>, que como se ha comentado anteriormente, han sido detectados en la membrana de los espermatozoides eyaculados de porcino (Gonzalez-Arto et al. 2016b).

### ***La estacionalidad en el cerdo doméstico y el jabalí***

El jabalí (*Sus scrofa*) es un antepasado del cerdo doméstico occidental (*Sus scrofa domesticus*) y pertenecen a la misma especie. La estación reproductiva del jabalí tiene lugar a finales del otoño o principios del invierno, de forma que los partos tienen lugar a principios de la primavera (Tast et al. 2001). En cambio, los cerdos domésticos se reproducen continuamente a lo largo del año, aunque existen variaciones estacionales en su reproducción, con una fertilidad reducida durante finales del verano y el otoño (Auvigne et al. 2010). Este periodo de baja fertilidad coincide con el período anoestro del jabalí europeo, que en su hábitat natural no cría en absoluto en el período estival-otoñal, por lo que se ha sugerido que estos problemas de fertilidad se deban a la estacionalidad reproductiva regulada por el fotoperiodo.

El hecho de que en el jabalí la reproducción sea estacional refleja una adaptación a las fluctuaciones anuales en la disponibilidad de recursos y asegura el nacimiento de las crías cuando las condiciones ambientales sean favorables. En cambio, el cerdo doméstico vive a menudo en un ambiente artificial que le protege de las condiciones adversas (Chemineau et al. 2008) y por tanto no tiene que adaptar su ciclo reproductivo a las condiciones ambientales. Por ello, estas diferencias entre el patrón reproductivo entre jabalíes y cerdos se han atribuido a los cambios asociados a la domesticación que han sufrido estos últimos (Tast et al. 2001).

Sin embargo, tanto en el jabalí como en el cerdo doméstico se ha demostrado que la secreción nocturna de melatonina pineal se ve incrementada en comparación a la basal diurna, y que también está sujeta a variaciones estacionales (Tast et al. 2001), aunque esta secreción nocturna de melatonina parece ser menor que en la mayoría de las especies de mamíferos estudiadas (Andersson 2001).

Del mismo modo, se ha detectado melatonina en el plasma seminal del verraco (Gonzalez-Arto et al. 2016b) con variaciones estacionales (Barranco et al. 2017), lo que podría deberse a su síntesis en el tracto reproductor del verraco como ocurre en la especie ovina (Gonzalez-Arto et al. 2016a).

## **OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO**

La melatonina, principalmente sintetizada gracias a la glándula pineal, está presente en una amplia variedad de órganos y cumple numerosas funciones (Tan et al. 2015), entre ellas la de regular la estacionalidad reproductiva (Acuna-Castroviejo et al. 2014).

En la especie ovina, que presenta reproducción estacional, se han detectado variaciones en la concentración de melatonina en plasma seminal del morueco entre las estaciones reproductiva y no reproductiva (Casao et al. 2010a). Además, en esta especie se han detectado las enzimas responsables de la síntesis de melatonina AANAT y ASMT en los diferentes órganos del tracto reproductor masculino, principalmente en el testículo (Gonzalez-Arto et al. 2016a) apoyando el origen extrapineal de esta hormona presente en el plasma seminal.

De igual manera, se ha detectado melatonina en el plasma seminal del verraco (Gonzalez-Arto et al. 2016b). Esta melatonina también presenta variaciones estacionales (Barranco et al. 2017), a pesar de que el cerdo doméstico no presenta estacionalidad reproductiva, a diferencia de su ancestro salvaje, el jabalí.

Por tanto, los objetivos de este trabajo son:

- 1. *Identificar la posible presencia de las enzimas implicadas en la síntesis de melatonina (AANAT y ASMT) en el tracto genital masculino del cerdo doméstico y el jabalí.***
  
- 2. *Analizar las posibles variaciones de expresión génica de estas enzimas entre el jabalí, cuya reproducción es estacional, y en cerdo doméstico cuya estacionalidad reproductiva se ha perdido por la domesticación.***

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Expresión génica de AANAT y ASMT en órganos del tracto reproductor del cerdo doméstico y el jabalí

#### ***Obtención de muestras***

El estudio de la expresión génica y cuantificación de proteínas se realizó en los diferentes órganos del tracto genital masculino (testículo (T), cabeza (Ca), cuerpo (Cu) y cola (Co) de epidídimo, próstata (P), glándulas bulbouretrales (GB) y vesícula seminal (VS)) que se obtuvieron a partir de muestras de aparato reproductor de 3 jabalíes y 3 verracos, sacrificados en otoño y obtenidos por la Universidad Autónoma de Barcelona, y que se enviaron a la Universidad de Zaragoza en hielo seco. Los órganos se almacenaron a -80 °C hasta su uso, con el objetivo de evitar activación de las RNAsas, y degradación de las proteínas.

#### ***Aislamiento y limpieza de ARN total***

El ARN total de los diferentes órganos del tracto reproductor se obtuvo por homogeneización de aproximadamente 100 mg de cada órgano en TRI REAGENT (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) según el método descrito por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi 1987).

Una vez obtenido, se midió la concentración del ARN total por espectrofotometría (NanoDrop ND-100 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Para determinar su pureza se comprobó que el ratio de absorbancias 260/280 nm fuera alrededor de 2 y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TBE (10,8 g/L TRIS base, 0,4% 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. La electroforesis se realizó en tampón TBE a 80 V durante 30 min y se visualizó en luz ultravioleta (Gel Doc, Biorad Laboratorios, Hercules, California) para comprobar la presencia de las bandas de ARN ribosómico 28S y 18S. A continuación, se realizó la limpieza del ARN total obtenido para eliminar las trazas de ADN por medio del kit *TURBO DNA-free* de Ambion (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen de reacción fue de 50 µL y estaba compuesto por 5 µL de tampón 10X, 1 µL de DNase, 10 µg de ARN (volumen variable en función de la concentración de las muestras) y agua DEPC hasta completar 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 DNase y se incubó 2 minutos más a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla se centrifugó durante un minuto y medio a 10.000 x g y se recogió el sobrenadante. La concentración de ARN se determinó de nuevo mediante espectrofotometría y se comprobó su pureza de la misma forma descrita

anteriormente, por medio de una electroforesis. La muestra final se almacenó a -80 °C, o se utilizó inmediatamente para la retrotranscripción.

### Síntesis de ADNc

A partir del ARN limpio de todas las muestras se llevó a cabo una retrotranscripción con el kit *Super Script III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos) para obtener el ADNc. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se partió de 500 ng de ARN total de cada tejido. El proceso consistió en una primera desnaturización del ARN, junto con el primer Oligo-(dT)20 (5 µM) y 10 mM de una mezcla de dNTPs a 65 °C durante 5 min, tras lo cual se añadió una mezcla de reacción que contenía 2 µL de tampón RT 10X, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> mM, 2 µL de DTT 0,1 M, y 1 µL de cada una de las enzimas *RNaseOUT* (40U/ µL) y *Super Script III RT* (200 U/ µL). La síntesis del ADNc se llevó a cabo a 50 °C durante 50 min, y se terminó la reacción a 85 °C durante 5 min. Para eliminar las trazas de ARN no retrotranscritas a ADNc, la mezcla se trató con RNasa H durante 20 min a 37 °C. Todos los pasos se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler (Biorad Laboratories, Hercules, California). Los ADNc obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Para comprobar el estado del ADNc obtenido se realizó una PCR del gen endógeno GAPDH (gliceraldehído fosfato deshidrogenasa), con cebadores de secuencias específicas para su amplificación (tabla 1) y utilizando el kit *REDTaq DNA Polymerase* (Sigma-)Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos).

**Tabla 1:** Secuencias de cebadores directo y reverso del gen GAPDH para las amplificaciones por PCR realizadas en el proyecto.

Gen	Especie	Primer directo	Primer reverso	PM
<b>GAPDH</b>	Porcino	5'-GGT CGG AGT GAA CGG ATTT -3'	5'-ATG TAG TGG AGG TCAA TGA AGG-3'	114

En cada PCR se utilizaron 48 µL de mezcla de reacción y 2 µL de ADNc o agua libre de DNAsas y RNAsas (Ambión, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) para el control negativo. La mezcla de reacción utilizada para la amplificación de GAPDH se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2:** Mezcla de reacción utilizada para la amplificación de GAPDH mediante PCR.

	Volumen 1x
<b>H<sub>2</sub>O nuclease-free</b>	36.9 µL
<b>10X REDTaq-PCR Reaction Buffer</b>	5 µL
<b>dNTP Mix 10 mM</b>	0.4 µL
<b>Cebador directo (10 µM)</b>	1.6 µL
<b>Cebador reverso (10 µM)</b>	1.6 µL
<b>REDTaq Polymerase</b>	2.5 µL
<b>Total</b>	48 µL

Las condiciones de la reacción de PCR en el termociclador fueron las siguientes: una desnaturalización inicial 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.

Tras finalizar la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3% en TBE con bromuro de etidio durante 50 minutos a 80 V y 2 µL de marcador de peso molecular 50 pb para comprobar la integridad del ADNc.

#### ***Expresión génica de AANAT y ASMT mediante PCR de punto final***

Todos los cebadores específicos para GAPDH, β-Actina y AANAT utilizados en este trabajo (tabla 3) se diseñaron sobre la secuencia génica de cada uno de los genes de interés para la especie porcina, publicada en GeneBank, y utilizando los programas Primer3© y Beacon Designer© Free Edition. En el caso de ASMT, como su secuencia para la especie porcina no está publicada en las bases de datos, se probaron cebadores diseñados sobre las secuencias de ASMT para el vacuno y el ovino, y también cebadores para la especie porcina utilizados por otros investigadores (Romerowicz-Misielak et al. 2015) (tabla 3).

**Tabla 3:** Secuencias de cebadores directo y reverso para las amplificaciones por PCR realizadas en el proyecto.

Gen	Especie	Primer directo	Primer reverso	PM
<b>AANAT</b>	Porcino	5'-GGT CGG AGT GAA CGG ATT T-3'	5'-ATG TAG TGG AGG TCA ATG AAG G-3'	127
<b>ASMT</b>	Ovino	5'-CTG CAG AGA CTG TAT CGG GC-3'	5'-GAG TAC AGC AGC GTG GTC AG-3'	104
<b>ASMT</b>	Vacuno	5'-TCA CAC GCA AGG AAA TGG ATA G -3'	5'- ACA GAC CTC TTG GAC TCT ATG G-3'	110
<b>ASMT</b>	Porcino	5'- CAT GGT GTC CCA GGT TCT CT-3'	5'- CAG CTT CAG GGA CAC ACA GA -3'	(Romerowicz-Misielak et al. 2015)
<b>GAPDH</b>	Porcino	5'-GGT CGG AGT GAA CGG ATTT -3'	5'-ATG TAG TGG AGG TCAA TGA AGG-3'	114
<b>β-actina</b>	Porcino	5'- TCT GGC ACC ACA CCT TCT A-3'	5'-TCT TCT CAC GGT TGG CTT TG-3'	102

Las condiciones de amplificación de los genes AANAT y ASMT utilizadas en el termociclador quedan reflejadas en la tabla 1 del Anexo I.

Tras finalizar la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3% en TBE con bromuro de etidio durante 50 minutos a 80 V y 2 µL de marcador de peso molecular 50 pb.

## **Cuantificación de la expresión génica de AANAT mediante PCR a tiempo real (qPCR)**

La PCR a tiempo real (qPCR) nos permite la cuantificación de los niveles de expresión génica mediante la determinación de la proporción (ratio) entre la cantidad de un gen diana y uno o varios genes endógenos de referencia con una expresión constitutiva e invariable en las diferentes condiciones experimentales. La expresión se comparará calculando el valor normalizado de muestras con la misma cantidad de ADNc para cada órgano.

Los genes endógenos utilizados en nuestro trabajo fueron  $\beta$ -actina y GAPDH. La reacción se llevó a cabo utilizando la enzima iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad Laboratories, Hercules, California), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los cebadores utilizados son los mismos que los utilizados en PCR de punto final (tabla 1, Anexo I) con una concentración óptima de 200 mM para todos los genes de estudio. El ADNc de cada tejido y especie se analizó por duplicado para cada uno de los genes y para minimizar errores de pipeteo se hizo una mezcla de reacción con los compuestos necesarios para la qPCR. Cada muestra se compuso por 18  $\mu$ L de mezcla de reacción y 2  $\mu$ L de ADNc o agua libre de DNasas y RNasas en el caso del control negativo. La composición de la mezcla de reacción utilizada para la q-PCR de los distintos genes se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2:** Mezcla de reacción para la cuantificación de la expresión génica mediante q-PCR de los genes GAPDH,  $\beta$ -actina y AANAT.

200:200	Volumen 1x
<b>H<sub>2</sub>O</b>	7.2 $\mu$ L
<b>iTaq Universal SYBR Green Supermix</b>	10 $\mu$ L
<b>Cebador directo (10 <math>\mu</math>M)</b>	0.4 $\mu$ L
<b>Cebador reverso (10 <math>\mu</math>M)</b>	0.4 $\mu$ L
<b>Total</b>	18 $\mu$ L

La reacción de qPCR se realizó en ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Se realizaron 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 min a 60 °C, precedidos por un paso de desnaturización inicial de 2 min a 95 °C. Finalmente se realizó una curva de disociación de los productos amplificados por PCR (*melting*) consistente en un aumento de temperatura progresiva de 65 °C a 95 °C con incrementos de 0,5 °C cada 5 segundos.

Para el cálculo de la expresión génica de cada una de las enzimas de interés se utilizó el método  $\Delta\Delta Ct$ , y los resultados se expresaron como  $-\Delta\Delta Ct$  (Livak y Schmittgen 2001).

## DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE ÓRGANOS POR WESTERN BLOTTING

### ***Extracción de proteínas***

La extracción de proteínas en los distintos órganos se realizó siguiendo el mismo procedimiento para todas las muestras: se partió de una porción de 300 mg de cada tejido mantenido a -80 °C, al que se añadió 3 mL de tampón de extracción (0,0626 mM de Tris-HCl pH 6,8, 4% (v/v) de SDS, 10% (v/v) de inhibidor de proteasas 10X (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos)), y se homogeneizó mediante un homogeneizador de tejidos Potter. A continuación, el homogenado se calentó a 95 °C durante 5 minutos y después se centrifugó a 13.000 x g durante 5 minutos a 4 °C. Por último, se recogió el sobrenadante y se alicuotó en volúmenes de 300 µL. La concentración de proteínas de cada muestra se evaluó mediante el método Bradford con el reactivo "Quick Start<sup>TM</sup> Bradford 1x Dye Reagent" (Biorad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos), y se congelaron a -20°C hasta su evaluación. Como control positivo se utilizaron proteínas extraídas de testículo de ovino, que se obtuvieron siguiendo el mismo protocolo.

### ***SDS-PAGE y Western-Blot***

Cada muestra se diluyó en tampón de carga (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 2,5% (v/v), azul de bromofenol 0,002% (v/v), 5% de β-mercaptoetanol y 10% de glicerol) y se cargarón 10 µg de proteínas de cada tejido en geles SDS PAGE al 12% de acrilamida, de 1 mm de grosor y 10 pocillos. Las proteínas se separaron en una dimensión siguiendo el método de Laemmli (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 130 V durante 90 min. a 4 °C.

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF utilizando el sistema 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 un mínimo de 2 horas en 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>) con BSA al 5% (p/v).

La detección de AANAT se realizó mediante la incubación durante una noche a 4 °C con el anticuerpo primario polyclonal Anti-Serotonin N-acetyltransferase antibody (Abcam, Reino Unido), y la de ASMT mediante el anticuerpo primario polyclonal anti-ASMT (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Estados Unidos), ambos generados en conejo y diluidos 1:1000 y 1:500 respectivamente en Tween-PBS (PBS con 0,1% (p/v) de Tween 20) con BSA al 1% (p/v).

Al día siguiente se llevaron a cabo tres lavados de las membranas, de 15 minutos cada uno, con Tween-PBS, tras lo cual se incubaron con el anticuerpo secundario *donkey anti-rabbit* (LI-COR biosciences, Lincoln, NE, Estados Unidos) a una dilución 1/25000 (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 y se revelaron utilizando el sistema Odissey CLx Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, Estados Unidos).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

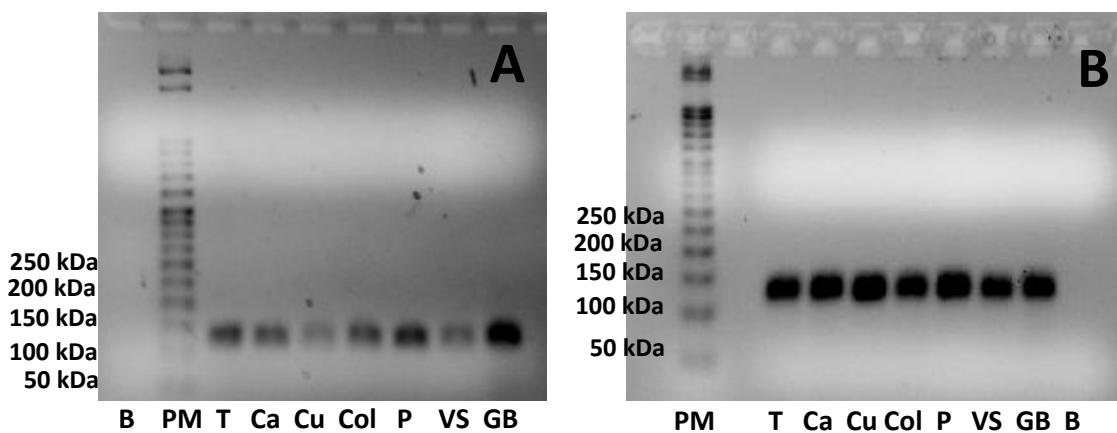
El análisis estadístico de la expresión génica obtenida por qPCR se realizó mediante el programa GraphPad Prism versión 5.01. Primero se comprobó la distribución normal de los datos obtenidos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, para después utilizar un análisis ANOVA de dos vías. En él se examina tanto la influencia de las dos variables independientes de estudio (subespecie y órgano) sobre la variable dependiente (expresión del gen analizado, en este caso AANAT), además de la interacción entre ambas. Posteriormente, se realizó un análisis post-hoc mediante un test de Bonferroni.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IDENTIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS DE SÍNTESIS DE MELATONINA EN EL TRACTO REPRODUCTOR MASCULINO DEL CERDO DOMÉSTICO Y EL JABALÍ

#### *Identificación de la expresión génica de AANAT en el aparato reproductor del cerdo y el jabalí mediante PCR de punto final*

El resultado obtenido en la PCR con los primers específicos para la amplificación del gen de AANAT (tabla 1, anexo I) a partir de los ADNc del tracto reproductor del cerdo doméstico y el jabalí se muestran en la figura 3.



**Figura 3.** Expresión génica de AANAT en los órganos del tracto reproductor del jabalí (A) y el cerdo doméstico (B). B: blanco; T: Testículo; Ca: cabeza; Cu: cuerpo; Co: cola; P: próstata; VS: vesícula seminal; GB: glándulas bulbouretrales.

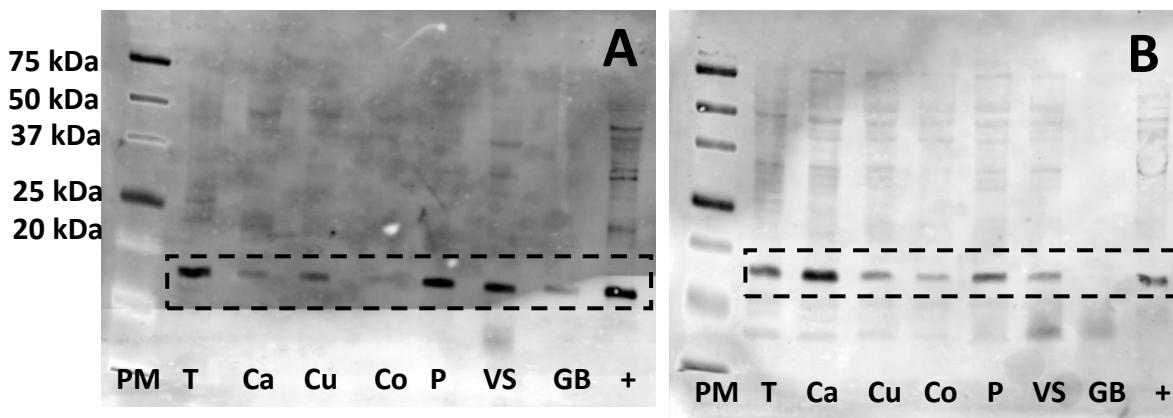
En ambas subespecies estudiadas hubo amplificación del gen de la enzima de síntesis AANAT para cada uno de los órganos del tracto reproductor.

Mientras que en el cerdo doméstico no parece haber ninguna diferencia significativa de expresión entre los distintos órganos estudiados, en el jabalí la distinta intensidad de las bandas sugiere que órganos como el cuerpo del epidídimo y las vesículas seminales expresen la enzima en niveles considerablemente inferiores a los que lo hacen el resto, por lo que se hace necesario un análisis de expresión génica mediante qPCR. Las bandas con mayor intensidad se aprecian en las glándulas bulbouretrales, seguido de la próstata y el testículo.

Además, la mayor intensidad de las bandas obtenidas en el cerdo doméstico que en el jabalí también sugieren una mayor expresión de AANAT en esta subespecie. Solamente las glándulas bulbouretrales del jabalí parecen expresar esta enzima al mismo nivel que los órganos del cerdo.

## *Identificación de la presencia de AANAT en el aparato reproductor del cerdo y el jabalí mediante Western-Blot*

Tanto para el cerdo doméstico como para el jabalí (Fig. 4) la detección de AANAT en los diferentes órganos del tracto reproductor se realizó mediante un Western-Blot con anticuerpos anti-serotonin N-acetyltransferasa.



**Figura 4.** Identificación mediante Western-Blot de la presencia de la enzima de síntesis de melatonina AANAT en los órganos del aparato reproductor masculino del jabalí (A) y el cerdo doméstico (B). PM: marcador de peso molecular; T: testículo; Ca: cabeza; Cu: cuerpo; Co: cola; P: próstata; VS: vesícula seminal; GB: glándulas bulbouretrales; +: control positivo.

En el análisis de las proteínas extraídas del aparato reproductor masculino de ambas subespecies puede apreciarse una banda definida a la altura de 20 kDa , coincidente con la del control positivo (+) de ovino (Gonzalez-Arto et al. 2016a), lo que indicaría que la enzima AANAT está presente en casi todos los órganos del cerdo doméstico y en los del jabalí.

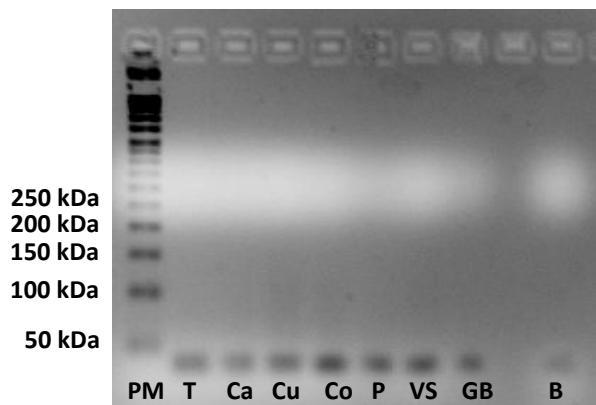
En el caso del cerdo, la enzima se detectó en todos los órganos analizados a excepción de las glándulas bulbouretrales (GB). Sin embargo, la PCR a tiempo final reveló la expresión génica de esta enzima en las glándulas bulbouretrales. Una posible explicación de esta discrepancia podría ser que este órgano cumple una importante función secretora, ya que secreta una gran cantidad de sustancias que formarán el plasma seminal (Senger 2003), sobre todo proteínas. Por tanto, es posible que AANAT esté presente en una baja concentración en este órgano y su presencia quede enmascarada por el resto de proteínas extraídas.

En el caso del cerdo, las bandas proteicas de mayor intensidad corresponden con el testículo, la cabeza del epidídimo y la próstata, lo que parece indicar que estos son los órganos donde la enzima es mayormente traducida, a pesar que en la PCR de punto final no se apreciaron diferencias en la expresión de la enzima para cada uno de los órganos.

En el jabalí, en cambio, el Western-Blot reveló la presencia de la enzima AANAT en todos los órganos estudiados, principalmente en el testículo, la próstata y la vesícula seminal lo que coincide con el resultado obtenido mediante la PCR de punto final.

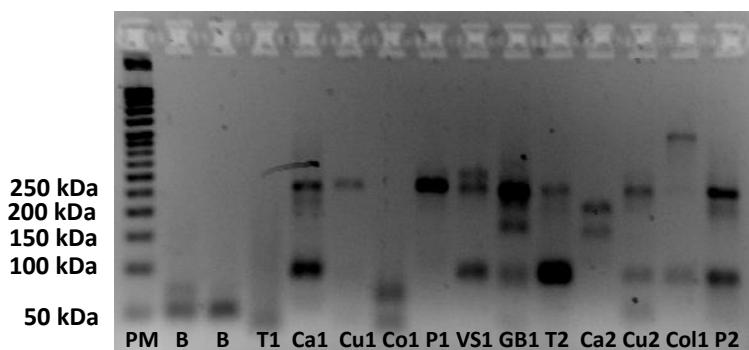
#### ***Identificación de la expresión génica de ASMT en el aparato reproductor del cerdo y el jabalí mediante PCR de punto final***

Los primers de la especie porcina utilizados por otros investigadores (Romerowicz-Misielak et al. 2015) para la expresión de ASMT no permitieron la amplificación de este gen para ninguna subespecie ni órgano (Fig. 5). Las bandas que aparecen al final en todos los carriles son consecuencia de la alta dimerización de los primers utilizados.



**Figura 5.** Expresión génica de ASMT en el cerdo doméstico por PCR de punto final con los cebadores utilizados por Romerowicz-Misielak et al. (2015). PM: marcador de peso molecular; T: testículo; Ca: cabeza; Cu: cuerpo; Co: cola; P: próstata; VS: vesícula seminal; GB: glándulas bulbouretrales; B: blanco.

Con los primers generados sobre la secuencia de ASMT de vacuno tampoco se obtuvo amplificación del gen, aunque los primers diseñados sobre la secuencia de ovino sí mostraron una amplificación (Fig 6.). Sin embargo, la gran cantidad de bandas amplificadas, pesos moleculares muy diversos entre los distintos órganos, parece indicar que las regiones amplificadas no corresponden con la enzima ASMT.

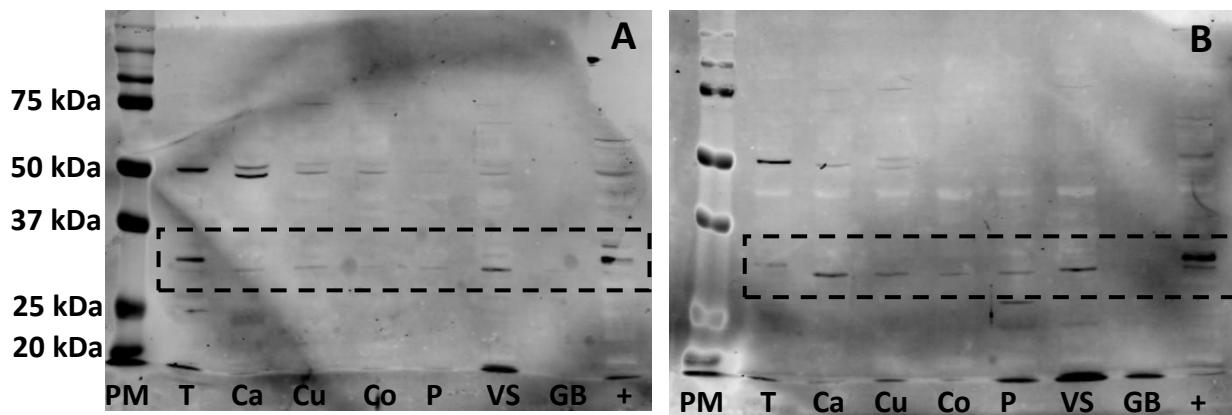


**Figura 6.** Expresión génica de ASMT por PCR de punto final utilizando cebadores diseñados sobre la secuencia de ovino. PM: marcador de peso molecular; B: blanco; T: testículo; Ca: cabeza; Cu: cuerpo; Co: cola; P: próstata; VS: vesícula seminal; GB: glándulas bulbouretrales. 1: Cerdo; 2: Jabalí

En definitiva, con los cebadores utilizados no ha sido posible comprobar la expresión génica de ASMT en los tejidos del aparato reproductor masculino del cerdo o el jabalí.

### ***Identificación de la presencia de ASMT en el aparato reproductor del cerdo y el jabalí mediante Western-Blot***

La presencia de ASMT en los órganos del tracto reproductor de ambas especies se realizó mediante un Western-Blot con anticuerpos anti-ASMT. Los resultados se muestran en la figura 7.



**Figura 7.** Identificación mediante Western-Blot de la enzima de síntesis de melatonina ASMT en los órganos del aparato reproductor masculino del jabalí (A) y el cerdo doméstico (B). PM: marcador de peso molecular; T: testículo; Ca: cabeza; Cu: cuerpo; Co: cola; P: próstata; VS: vesícula seminal; GB: glándulas bulbouretrales; +: control

El control positivo de ASMT (proteínas de testículo ovino) muestra una banda a la altura un poco por debajo de 37 kDa, junto con otra menos marcada de 50 kDa, que correspondería a esta enzima (Gonzalez-Arto et al. 2016a). En el cerdo, se observan bandas a una altura similar al control positivo en todos los carriles a excepción del de las glándulas bulbouretrales, lo que confirma también la presencia de la enzima en esta especie. La banda que se aprecia en la mayor parte de los órganos del cerdo y el jabalí tiene un tamaño ligeramente menor que el del control positivo de ovino. Sin embargo, esto podría explicarse por posibles modificaciones post-traduccionales de ASMT entre ambas especies.

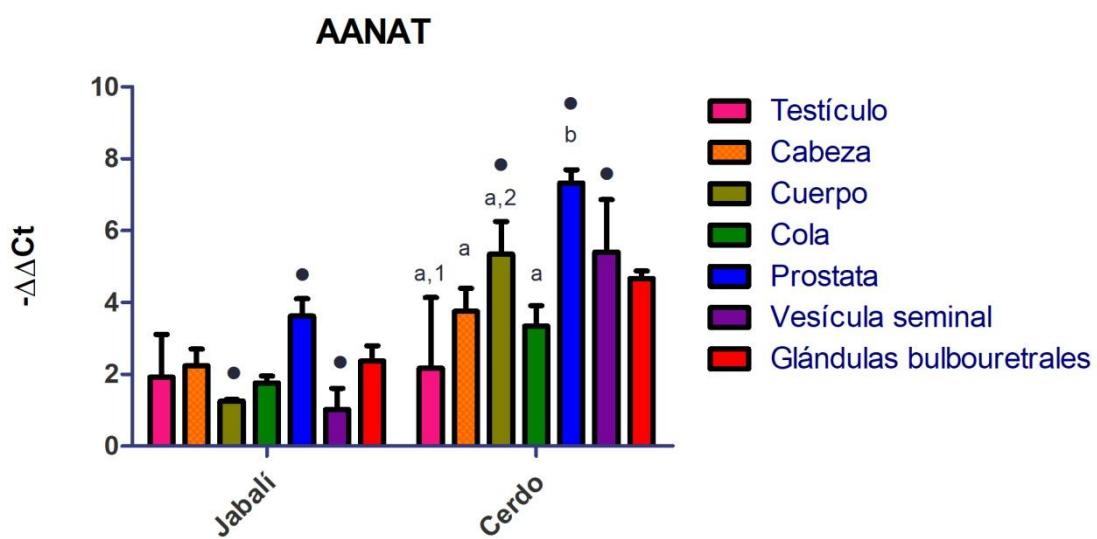
En el cerdo no puede confirmarse si la enzima ASMT está presente en las glándulas bulbouretrales, ya que no se pudo realizar la PCR de punto final para esta enzima y además, de la misma forma que antes ocurría con AANAT, esta proteína podría quedar enmascarada en este órgano, impidiendo su detección mediante el Western Blot.

En el jabalí no se identificó esta enzima ni en la cola del epidídimo ni en las glándulas bulbouretrales. En el resto de órganos, se aprecia una banda muy poco marcada, a excepción del testículo, que parece ser el órgano predominante de la síntesis de esta enzima

en el jabalí. Sin embargo, la falta de estudios de expresión génica para ASMT no permite confirmar esta afirmación.

### DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE AANAT EN LOS ÓRGANOS DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO DEL CERDO DOMÉSTICO Y EL JABALÍ.

En la figura 8 se muestran los resultados del análisis de expresión génica de AANAT en los órganos del aparato reproductor del cerdo y el jabalí mediante qPCR.



**Figura 8.** Análisis de la expresión génica de AANAT en los diferentes órganos del aparato reproductor masculino del jabalí y el cerdo doméstico, estudiadas por qPCR. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM de n=3. Las diferencias significativas de expresión de la enzima entre órganos de la misma subespecie se determinan según las letras "a/b" y los números "1/2". Las diferencias significativas de expresión génica entre subespecies se indican con el símbolo "●".

Mientras que en el jabalí no se hallaron diferencias significativas en la expresión génica de AANAT entre los distintos órganos estudiados, en el cerdo doméstico la próstata es el órgano que presenta mayor expresión génica, con diferencias significativas con el testículo y la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo ( $P<0,05$ ). A su vez, el cuerpo del epidídimo muestra diferencias significativas con el testículo ( $P<0,05$ ).

De igual manera, en el jabalí la próstata parece ser también el órgano con mayor expresión génica de AANAT, aunque, como ya se ha comentado, sin diferencias significativas con los otros órganos estudiados. Esto señalaría a la próstata como el principal órgano responsable de la síntesis de la melatonina en el cerdo doméstico y el jabalí. Estos resultados difieren con los obtenidos previamente en la especie ovina (Gonzalez-Arto et al. 2016a), en la que la melatonina se sintetizaba principalmente en el testículo. Estas diferencias tal vez podrían explicarse debido a la anatomía del morueco, que presenta una próstata de pequeño tamaño y diseminada, a diferencia de la próstata del verraco (Senger 2003).

Además, los resultados de qPCR revelaron una mayor expresión génica de AANAT en el cerdo doméstico que en el jabalí ( $P<0,05$ ), principalmente en la próstata, el cuerpo del epidídimo y la vesícula seminal. En el resto de los órganos excepto el testículo, la expresión génica de AANAT también fue mayor en el cerdo doméstico que en el jabalí, aunque sin llegar a ser significativa.

Estas diferencias entre el jabalí y el cerdo doméstico podrían explicarse por la selección comercial que se ha hecho en la especie porcina. Los verracos se han seleccionado en función de sus resultados de fertilidad, y dado que por su capacidad antioxidante (Reiter et al. 2000), la melatonina protege a los espermatozoide del daño oxidativo (Casao et al. 2010b) y mejora su fertilidad (Mousa-Balabel y Mohamed 2011) (Cebrian-Perez et al. 2014), es posible que indirectamente, durante la domesticación y su explotación en granjas industriales, se hayan seleccionado a los verracos con mayor capacidad de síntesis de melatonina en su aparato reproductor.

## **CONCLUSIONES**

- Los resultados obtenidos no han permitido demostrar la existencia de la ruta de síntesis de la melatonina en el tracto reproductor del cerdo doméstico y el jabalí.
- La enzima AANAT fue identificada a nivel génico mediante PCR a punto final y qPCR en todos los órganos del cerdo y el jabalí. Sin embargo, no se ha podido demostrar la expresión génica de ASMT.
- Se han detectado las enzimas AANAT y ASMT mediante Western-Blot.
- En el cerdo doméstico, los niveles de expresión génica de la enzima AANAT son más elevados a los del jabalí.
- En el cerdo doméstico, existen diferencias significativas en la expresión génica de AANAT entre los diferentes órganos estudiados, siendo la próstata el órgano que presenta la mayor expresión de esta enzima.

## **CONCLUSIONS**

- The results obtained did not allow to demonstrate the existence of the melatonin synthesis pathway in the reproductive tract of the domestic and wild boar.
- The enzyme AANAT was identified at the gene level by end-point PCR and qPCR in all organs of the pig and the wild boar. However, the gene expression of ASMT could not be demonstrated.
- AANAT and ASMT enzymes have been detected by Western Blotting.
- AANAT gene expression levels in the domestic pig are higher than those of the wild boar.
- In domestic pig, there are significant differences in AANAT gene expression among the different organs studied, being the prostate the organ with the highest expression of this enzyme.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acuna-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Diaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., Lopez, L. C., Rosales-Corral, S., Tan, D. X. and Reiter, R. J. (2014). "Extrpineal melatonin: sources, regulation, and potential functions." *Cell Mol Life Sci* **71**(16): 2997-3025.
- Andersson, H. (2001). "Plasma melatonin levels in relation to the light-dark cycle and parental background in domestic pigs." *Acta Vet Scand* **42**(2): 287-294.
- Auvigne, V., Leneveu, P., Jehannin, C., Peltoniemi, O. and Salle, E. (2010). "Seasonal infertility in sows: a five year field study to analyze the relative roles of heat stress and photoperiod." *Theriogenology* **74**(1): 60-66.
- Barranco, I., Casao, A., Perez-Patino, C., Parrilla, I., Muino-Blanco, T., Martinez, E. A., Cebrian-Perez, J. A. and Roca, J. (2017). "Profile and reproductive roles of seminal plasma melatonin of boar ejaculates used in artificial insemination programs." *J Anim Sci* **95**(4): 1660-1668.
- Benitez-King, G. (2006). "Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease." *J Pineal Res* **40**(1): 1-9.
- Benitez-King, G., Huerto-Delgadillo, L. and Anton-Tay, F. (1993). "Binding of <sup>3</sup>H-melatonin to calmodulin." *Life Sci* **53**(3): 201-207.
- Cardinali, D. P. and Pevet, P. (1998). "Basic aspects of melatonin action." *Sleep Med Rev* **2**(3): 175-190.
- Carpentieri, A., Diaz de Barboza, G., Areco, V., Peralta Lopez, M. and Tolosa de Talamoni, N. (2012). "New perspectives in melatonin uses." *Pharmacol Res* **65**(4): 437-444.
- Casao, A., Cebrian, I., Asumpcão, M. E., Perez-Pe, R., Abecia, J. A., Forcada, F., Cebrian-Perez, J. A. and Muino-Blanco, T. (2010a). "Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes." *Reprod Biol Endocrinol* **8**: 59.
- Casao, A., Gallego, M., Abecia, J. A., Forcada, F., Perez-Pe, R., Muino-Blanco, T. and Cebrian-Perez, J. A. (2012). "Identification and immunolocalisation of melatonin MT(1) and MT(2) receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa." *Reprod Fertil Dev* **24**(7): 953-961.
- Casao, A., Mendoza, N., Perez-Pe, R., Grasa, P., Abecia, J. A., Forcada, F., Cebrian-Perez, J. A. and Muino-Blanco, T. (2010b). "Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate." *J Pineal Res* **48**(1): 39-46.
- Cebrian-Perez, J. A., Casao, A., Gonzalez-Arto, M., dos Santos Hamilton, T. R., Perez-Pe, R. and Muino-Blanco, T. (2014). "Melatonin in sperm biology: breaking paradigms." *Reprod Domest Anim* **49 Suppl 4**: 11-21.
- Chemineau, P., Guillaume, D., Migaud, M., Thiery, J. C., Pellicer-Rubio, M. T. and Malpaux, B. (2008). "Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications." *Reprod Domest Anim* **43 Suppl 2**: 40-47.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-159.

Das, A., McDowell, M., Pava, M. J., Smith, J. A., Reiter, R. J., Woodward, J. J., Varma, A. K., Ray, S. K. and Banik, N. L. (2010). "The inhibition of apoptosis by melatonin in VSC4.1 motoneurons exposed to oxidative stress, glutamate excitotoxicity, or TNF-alpha toxicity involves membrane melatonin receptors." *J Pineal Res* **48**(2): 157-169.

Dubocovich, M. L. and Markowska, M. (2005). "Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals." *Endocrine* **27**(2): 101-110.

Dun-Xian Tan, R. H., Lucien C. Manchester, Sergio D. Paredes, Ahmet Korkmaz, Rosa M. Sainz, Juan C. Mayo, Lorena Fuentes-Broto, Russel J. Reiter (2010). "The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness." *Biological Reviews* **85**: 607–623.

Gerlach, T. and Aurich, J. E. (2000). "Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster." *Anim Reprod Sci* **58**(3-4): 197-213.

Gonzalez-Arto, M., Hamilton, T. R., Gallego, M., Gaspar-Torrubia, E., Aguilar, D., Serrano-Blesa, E., Abecia, J. A., Perez-Pe, R., Muino-Blanco, T., Cebrian-Perez, J. A. and Casao, A. (2016a). "Evidence of melatonin synthesis in the ram reproductive tract." *Andrology* **4**(1): 163-171.

Gonzalez-Arto, M., Vicente-Carrillo, A., Martinez-Pastor, F., Fernandez-Alegre, E., Roca, J., Miro, J., Rigau, T., Rodriguez-Gil, J. E., Perez-Pe, R., Muino-Blanco, T., Cebrian-Perez, J. A. and Casao, A. (2016b). "Melatonin receptors MT1 and MT2 are expressed in spermatozoa from several seasonal and nonseasonal breeder species." *Theriogenology* **86**(8): 1958-1968.

Jang, H. Y., Kim, Y. H., Kim, B. W., Park, I. C., Cheong, H. T., Kim, J. T., Park, C. K., Kong, H. S., Lee, H. K. and Yang, B. K. (2010). "Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development." *Reprod Domest Anim* **45**(6): 943-950.

Jockers, R., Maurice, P., Boutin, J. A. and Delagrange, P. (2008). "Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new?" *Br J Pharmacol* **154**(6): 1182-1195.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.

Luboshitzky, R., Shen-Orr, Z. and Herer, P. (2002). "Seminal plasma melatonin and gonadal steroids concentrations in normal men." *Arch Androl* **48**(3): 225-232.

Ma, X., Idle, J. R., Krausz, K. W. and Gonzalez, F. J. (2005). "Metabolism of melatonin by human cytochromes p450." *Drug Metab Dispos* **33**(4): 489-494.

Malpaux, B., Migaud, M., Tricoire, H. and Chemineau, P. (2001). "Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin." *J Biol Rhythms* **16**(4): 336-347.

Malpaux, B., Thiery, J. C. and Chemineau, P. (1999). "Melatonin and the seasonal control of reproduction." *Reprod Nutr Dev* **39**(3): 355-366.

Malpaux, B., Viguie, C., Skinner, D. C., Thiery, J. C. and Chemineau, P. (1997). "Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe." *Brain Res Bull* **44**(4): 431-438.

Martin-Hidalgo, D., Baron, F. J., Bragado, M. J., Carmona, P., Robina, A., Garcia-Marin, L. J. and Gil, M. C. (2011). "The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 degrees C." *Theriogenology* **75**(8): 1550-1560.

Mousa-Balabel, T. M. and Mohamed, R. A. (2011). "Effect of different photoperiods and melatonin treatment on rabbit reproductive performance." *Vet Q* **31**(4): 165-171.

Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D. W., Maestroni, G. J., Zisapel, N. and Cardinali, D. P. (2008). "Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways." *Prog Neurobiol* **85**(3): 335-353.

Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C. and Gitto, E. (2000). "Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review." *J Biomed Sci* **7**(6): 444-458.

Romerowicz-Misielak, M., Oren, D. A., Sowa-Kucma, M., Tabacka-Lonczynska, A., Gilun, P., Stefanczyk-Krzymowska, S. and Koziorowski, M. (2015). "Changes in melatonin synthesis parameters after carbon monoxide concentration increase in the cavernous sinus." *J Physiol Pharmacol* **66**(4): 505-514.

Senger, P. L. (2003). Pathways to pregnancy and parturition.

Slominski, A. T., Semak, I., Fischer, T. W., Kim, T. K., Kleszczynski, K., Hardeland, R. and Reiter, R. J. (2016). "Metabolism of melatonin in the skin: Why is it important?" Exp Dermatol.

Slominski, R. M., Reiter, R. J., Schlabritz-Loutsevitch, N., Ostrom, R. S. and Slominski, A. T. (2012). "Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions." Mol Cell Endocrinol **351**(2): 152-166.

Tan, D. X., Hardeland, R., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Korkmaz, A., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Fuentes-Broto, L. and Reiter, R. J. (2010). "The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness." Biol Rev Camb Philos Soc **85**(3): 607-623.

Tan, D. X., Manchester, L. C., Esteban-Zubero, E., Zhou, Z. and Reiter, R. J. (2015). "Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism." *Molecules* **20**(10): 18886-18906.

Tan, D. X., Manchester, L. C., Terron, M. P., Flores, L. J. and Reiter, R. J. (2007). "One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?" *J Pineal Res* **42**(1): 28-42.

Tan, D. X., Zheng, X., Kong, J., Manchester, L. C., Hardeland, R., Kim, S. J., Xu, X. and Reiter, R. J. (2014). "Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions." *Int J Mol Sci* **15**(9): 15858-15890.

Tast, A., Halli, O., Ahlstrom, S., Andersson, H., Love, R. J. and Peltoniemi, O. A. (2001). "Seasonal alterations in circadian melatonin rhythms of the European wild boar and domestic gilt." *J Pineal Res* **30**(1): 43-49.

Trivedi, A. K. and Kumar, V. (2014). "Melatonin: an internal signal for daily and seasonal timing." *Indian J Exp Biol* **52**(5): 425-437.

Turek, F. W. (2007). "From circadian rhythms to clock genes in depression." *Int Clin Psychopharmacol* **22 Suppl 2**: S1-8.

van Vuuren, R. J., Pitout, M. J., van Aswegen, C. H. and Theron, J. J. (1992). "Putative melatonin receptor in human spermatozoa." Clin Biochem **25**(2): 125-127.

Witt-Enderby, P. A., Bennett, J., Jarzynka, M. J., Firestone, S. and Melan, M. A. (2003). "Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms." Life Sci **72**(20): 2183-2198.

Yoshikazu Yonei, A. H., Kazuyoshi Tsutsui, Masako Okawa, Bunpei Ishizuka (2010). "Effects of Melatonin: Basics Studies and Clinical Applications." Anti-aging medicine **7**: 85-91.