



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria

**Polimorfismo del gene MTNR1A e risposta riproduttiva
all'effetto maschio in differenti periodi dell'anno in
ovini di razza Sarda**

Relatore:

Prof. Vincenzo Carcangiu

Tesi di laurea di:

Francesca Aisoni

Correlatore:

Dott. Sebastiano Luridiana

INDICE

INTRODUZIONE	Pag.	1
Epifisi	Pag.	3
Innervazione dell'epifisi	Pag.	4
La melatonina	Pag.	6
Controllo della sintesi della melatonina	Pag.	8
Controllo a livello post-trascrizionale	Pag.	10
Regolazione del ritmo stagionale	Pag.	12
I recettori della melatonina	Pag.	14
SCOPO	Pag.	18
MATERIALE E METODI	Pag.	21
RISULTATI	Pag.	27
DISCUSSIONE	Pag.	34
CONCLUSIONI	Pag.	40
BIBLIOGRAFIA	Pag.	42

INTRODUZIONE

Epifisi

L'epifisi o ghiandola pineale è localizzata posteriormente al corpo calloso, è una formazione impari e mediana di forma conica e presenta una intensa vascolarizzazione. Questa ghiandola prende origine da una evaginazione neuroepiteliale dal tetto del diencefalo ed è composta da i pinealociti e da cellule gliali.

Negli anfibi e in alcuni pesci le cellule epifisarie sono situate a ridosso della cute e hanno la capacità di percepire direttamente l'intensità luminosa e per tale motivo viene anche denominata "terzo occhio". Pertanto queste cellule non sono in stretto contatto con l'occhio e registrano autonomamente il ritmo luce/buio e costituiscono l'orologio biologico dell'organismo.

Nei vertebrati superiori, invece l'epifisi per poter svolgere la sua funzione ha una intima connessione con gli occhi e con il Sistema Nervoso Centrale e hanno perso la funzione di fotorecettori ed hanno solo la funzioni secretoria (Goldman, 1991).

Per diversi anni si è studiato come l'impulso luminoso venisse convogliato all'epifisi al fine di spiegare le funzioni di questa ghiandola.

Ormai è stato chiarito che il segnale luminoso percepito dalla retina viene convertito in segnale nervoso, successivamente passa nei Nuclei Sopra Chiasmatici e mediante l'ipotalamo posteriore e le vie ipotalamo spinali simpatiche, giunge al Ganglio Cervicale Superiore. Da quest'ultima formazione nervosa partono fibre noradrenergiche

postgangliari che giungono alla ghiandola pineale regolandone l'attività secretoria (Fig. 1).

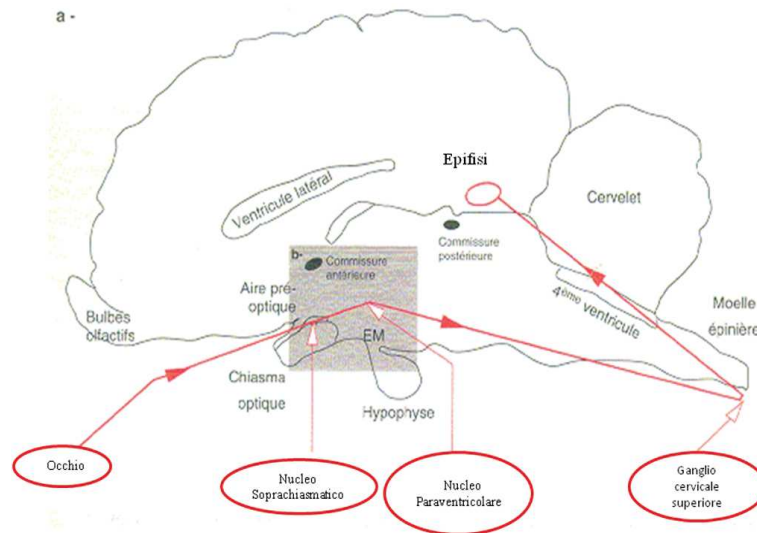


Fig. 1 – Sezione sagittale del cervello di ovino. L'informazione luminosa percepita dalla retina arriva alla ghiandola pineale, attraverso il Nucleo Sopra Chiasmatico (NSC), i Nuclei Ipotalamici Paraventricolari e il Ganglio Cervicale Superiore.

Il ruolo dell'epifisi è più complesso di un semplice sensore della luce giornaliera ma la sua funzione probabilmente è quella di “trait d'union” tra ambiente esterno e organismo. In poche parole la sua attività è quella di tradurre il messaggio luminoso in messaggio chimico e quindi informare e sincronizzare l'organismo alle condizioni dell'habitat in cui vive.

Innervazione dell'epifisi

La ghiandola pineale riceve una comunicazione nervosa

proveniente da diverse aree centrali e periferiche dell'organismo. Lo stimolo nervoso periferico più importante è quello che origina dai fotorecettori retinici dove è presente il pigmento fotorecettore, la melanopsina (Hatter et al., 2002; Hirata e Fukada 2004).

Dal talamo e dal rafe altri stimoli nervosi arrivano al Nucleo Sopra Chiasmatico dove è situato l'orologio biologico che manifesta un'attività oscillatoria che viene sincronizzata all'interno delle 24 ore dalla melatonina (Lincoln et al. 2005) (Fig. 2).

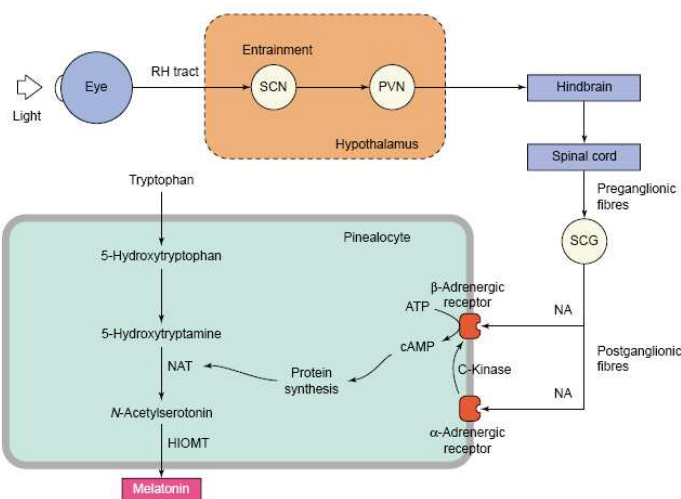


Fig. 2 – *Trasmissione del segnale luminoso e sintesi della melatonina*

L'orologio biologico, che funziona come un pacemaker, è controllato da una serie di geni "orologio", dei quali tre sono definiti come *geni periodici* (Per1, Per2 e Per3), che funzionano attivando o inibendo l'attività del Nucleo Sopra Chiasmatico (Reppert e Weaner, 2002). Questi geni scandiscono i processi periodici dell'organismo in accordo con l'attività della epifisi (Simonneaux et al., 2004).

Il Nucleo Sopra Chiasmatico e l'epifisi sono collegati tra loro mediante i nuclei Paraventricolari dell'ipotalamo, infatti lesioni a tale livello condizionano la secrezione di melatonina (Kalsbeek e Buijs, 2002). I nervi che originano dai nuclei suddetti attraversano il Ganglio Cervicale Superiore, prendendovi o meno rapporto, e quindi arrivano all'epifisi.

Le fibre che arrivano all'epifisi sono in prevalenza di tipo adrenergico le altre fibre presentano diversi mediatori che sono legati alla loro origine. Qualsiasi sia il mediatore chimico della fibra tutte sono coinvolte nella regolazione della secrezione della melatonina (Simonneaux e Ribelayga, 2003).

La melatonina

La melatonina è un ormone derivato dall'aminoacido triptofano.

Il triptofano viene captato dai pinealociti dal circolo ematico con meccanismo di trasporto attivo. All'interno delle cellule della pineale il triptofano viene trasformato in 5-idrossi-triptofano da un enzima mitocondriale, la triptofano-idrossilasi. La successiva decarbossilazione, determinata da un enzima citoplasmatico, che trasforma il 5-idrossi-triptofano in serotonina.

L'espressione del gene che codifica per la triptofano-idrossilasi aumenta durante la notte (Besançon et al., 1996), invece, l'espressione del gene che codifica per la decarbossilasi non mostra modificazioni nell'arco delle 24 ore.

Tuttavia il passaggio limitante nella produzione della melatonina e quello della acetilazione della serotonina in N-acetil-serotonina determinata dall'enzima ArilAlchilamin-N-acetiltransferasi (AANAT), con l'intervento di un cofattore l'Acetil-Coenzima A. La sequenza del gene AANAT non presenta delle differenze tra i diversi animali ed è situato nel cromosoma 11 (Klein et al., 2003).

Infine, l'N-acetil-serotonina viene trasformata in melatonina mediante l'enzima Idrossi-Indol-O-Metil-Transferasi (HIOMT). L'attività di quest'ultimo enzima sembra sia coinvolta nella regolazione dell'ampiezza del picco della melatonina che si registra durante la notte (Simonneaux e Ribelayga, 2003) (Fig. 4).

L'incremento notturno dell'attività di questo enzima è molto evidente nel ratto mentre è meno spiccato nell'ovino (Foulkes et al., 1997; Aleandri et al., 1996).

Questi ultimi due enzimi hanno una produzione maggiore durante la notte dovuta alla liberazione di noradrenalina dalle terminazioni nervose simpatiche che raggiungono i pinealociti. Pertanto, queste ultime due fasi del processo di produzione della melatonina possono essere considerate limitanti.

Controllo della sintesi della melatonina

Come suddetto la noradrenalina è il principale neurotrasmettitore implicato nel processo di sintesi della melatonina. Inoltre, anche i recettori per la noradrenalina localizzati sulla membrana del pinealocita assumono una importanza notevole nel regolare la sintesi dell'indolamina. Infatti, lo stimolo del recettore da parte della noradrenalina determina l'attivazione del processo di sintesi della melatonina.

In particolare il legame tra noradrenalina e recettore β -adrenergico attiva l'adenilato ciclasi, con un incremento del cAMP (AdenosinMonoFosfato ciclico) a livelli necessari all'attivazione della N-Acetiltransferasi (Drijfhout et al., 1996).

L'enzima N-Acetiltransferasi viene controllato sia a livello trascrizionale, sia a livello post-trascrizionale.

Il controllo a livello trascrizione, in molte specie segue un ritmo circadiano, e questo è molto manifesto nei roditori. In questi mammiferi l'espressione dell'mRNA che codifica per la AANAT è 100 volte maggiore di notte rispetto al giorno nei pinealociti (Coon et al., 2000). Nell'ovino e in altri ungulati, invece, l'espressione dell'mRNA per la AANAT è costantemente elevata, senza differenze tra le ore di luce e quelle di buio (Coon et al., 1995; Schomerus et al., 2000). Al processo di

trascrizione partecipano alcuni fattori di trascrizione, che devono essere fosforilati per essere attivati dalla Proteinkinasi A al residuo di Serina 133. I più studiati tra i fattori di trascrizione sono i CREB (cAMP Response Element Binding Proteins), che mostrano un'attività in sinergia con altri elementi, come le proteine CREM (cAMP Responsive Element Modulator), e l'antagonista dei CREB, chiamato ICER (Inducibile cAMP Early Repressor).

Dopo la fosforilazione il fattore CREB determina l'incremento dell'espressione del gene che codifica per l'enzima AANAT.

Una volta attivato questo fattore di trascrizione causa l'attivazione di altri promotori, incluso P2, il promotore di ICER (Molina et al., 1993). Passate 2-6 ore dall'attivazione i livelli di ICER competono con CREB e bloccano anche la trascrizione di ICER stesso.

ICER è un antagonista molto potente, infatti, può determinare una down-regulation sui promotori di diversi geni, e l'espressione di questi geni è determinata dagli aumentati dei livelli di cAMP, incluso P2.

L'aumento dell'mRNA che codifica per ICER aumenta gradatamente nella pineale, durante la notte, e raggiunge il picco circa a mezza notte, per poi riportarsi ai livelli basali con l'arrivo dell'alba. Invece, l'incremento di mRNA che codifica per CREB è molto più veloce, poiché è sotto il controllo diretto della noradrenalina che viene liberata con l'arrivo del buio.

La principale funzione di ICER è quella di contrastare la forma fosforilata e, quindi attiva, di CREB che viene prodotta e si accumula nel pinealocita durante le ore di buio e decrementa all'aumentare di ICER.

Quindi, la sintesi dell'enzima limitante AANAT potrebbe dipendere dal rapporto tra questi due fattori (Stehle et al., 1993; Pfeffer et al., 1999).

La regolazione suddetta sembra sia valida solo per i roditori e non per gli ovini in quanto in questi ultimi non si evidenziano oscillazioni nell'espressione dell'mRNA che codifica per l'enzima limitante (Privat et al., 1999). Il trattamento delle colture cellulari ovine con cAMP ha mostrato che i livelli di AANAT non subiscono variazioni (Fleming et al., 1999). Tale fatto ha fatto ipotizzare che il controllo della secrezione della melatonina avvenga in fase post-trascrizionale (Coon et al., 2000). Inoltre, questa ipotesi giustificherebbe anche il rapido inizio di attività dell'enzima AANAT negli ungulati con una secrezione della melatonina subito dopo l'arrivo del buio.

Controllo a livello post-trascrizionale

Invece, la regolazione post-trascrizionale controlla la produzione dell'enzima AANAT mediante l'inibizione della proteolisi proteosomica esercitata dal cAMP (Gastel et al., 1998). Questo fatto spiega perché subito dopo la stimolazione noradrenergica si ha un incremento

velocissimo dei livelli della melatonina e la cessazione della sua produzione dell'indolamina con l'arrivo della luce (Zatz et al., 1999; Schomerus et al., 2000).

L'inibizione della proteolisi sull' AANAT richiede una continua sintesi proteica, indicando che l'enzima sia sempre presente nei pinealociti. Tuttavia, questo enzima può svolgere la sua funzione solo in presenza di un'adeguata stimolazione adrenergica che determini l'inibizione della proteolisi.

La comprensione di questo meccanismo di controllo del messaggio neuroendocrino e nervoso evidenzia che il neurotrasmettitore, la noradrenalina, può stimolare la cellula bersaglio ad inibire la proteolisi proteosomica e assumere così un importantissimo ruolo di neuro-regolatore (Schomerus et al., 2000). Sintetizzando, gli alti livelli di mRNA per l' AANAT riscontrato nelle cellule epifisarie ci fanno ipotizzare che questa proteina venga sintetizzata continuamente e che durante le ore di luce appena sintetizzate la proteina venga immediatamente distrutta dalla proteolisi proteosomica. Quindi, la stimolazione adrenergica protegge la AANAT dalla proteolisi consentendo così all'enzima di svolgere la sua azione.

Comunque, risulta ancora poco chiara come venga svolta l'azione di protezione sull'AANAT e alcune ipotesi sono state fatte per spiegare il meccanismo. La noradrenalina potrebbe agire in due modi distinti: proteggendo l'enzima tramite la fosforilazione cAMP-dipendente di due siti di legame per la Protein Chinasi A oppure proteggendo la proteina

attraverso la fosforilazione cAMP-dipendente di altre proteine coinvolte nel processo di degradazione dell' AANAT. Ancora dobbiamo tenere presente che possono sussistere insieme anche entrambe le soluzioni.

Quindi, i due meccanismi di controllo, quello trascrizionale e quello post-trascrizionale, concorrono al mantenimento dei livelli di AANAT e la conseguente produzione di melatonina (Johnston et al., 2004).

Regolazione del ritmo stagionale

Nonostante sia stato chiarito da diverso tempo il controllo stagionale da parte della melatonina di diverse attività dell'organismo, rimane ancora da spiegare il preciso meccanismo d'azione di questo ormone. Infatti, per alcuni processi non sono ancora chiariti i precisi siti di azione della melatonina e come questo ormone espliciti la sua azione.

Tuttavia è certo che l'ormone pineale è l'informatore organico dell'andamento del fotoperiodo e quindi è un regolatore di tutte quelle attività ad andamento stagionale come la riproduzione.

Il Nucleo Soprachiasmatico dell'ipotalamo, sede dove è situato l'orologio biologico, è il sito di integrazione del segnale luminoso (Lincoln et al., 2005). Questo nucleo ipotalamico mostra una propria oscillazione che viene sincronizzata ad un ritmo circadiano dall'andamento della secrezione della melatonina.

Inoltre, la melatonina ha diversi siti d'azione ed ognuno è legato a precise funzioni fisiologiche. Infatti questo ormone a livello della Pars Tuberalis dell'ipofisi influenza la secrezione di prolattina, invece la sua azione a livello del nucleo Premammillare e Soprachiasmatico dell'ipotalamo influenzano la regolazione dell'attività riproduttiva (Barrett et al., 2002; Malpoux et al., 1998).

Per spiegare la modalità d'azione della melatonina sono state formulate diverse ipotesi per individuare quale aspetto del suo modello secretorio sia più importante nel regolarne le sue attività. È noto che il picco notturno di secrezione di melatonina ha una durata inversamente proporzionale alla lunghezza delle ore di buio, comunque è la durata nel tempo del picco il segnale che viene percepito dai centri regolatori dell'attività riproduttiva (Foulkes et al., 1997; Bittman e Karsch, 1984).

Questa ipotesi prende il nome di *teoria della durata*, la quale ha trovato conferma sia in studi effettuati sugli ovini che su altri animali (Simonneaux e Ribelayga, 2003). Infatti, la somministrazione di melatonina durante i giorni lunghi, allunga il picco endogeno dell'indolamina e questo determina un anticipo dell'attività riproduttiva, simulando un ritmo secretorio tipico dei giorni corti (Klein et al., 2002).

Un'altra teoria tiene conto, invece, dell'esistenza di un ritmo di sensibilità alla melatonina da parte degli organi bersaglio (*teoria delle coincidenze interne*). Questa ipotesi tiene conto che gli effetti degli alti livelli di melatonina si hanno soltanto quando è presente una sensibilità da parte degli organi bersaglio (Simonneaux e Ribelayga, 2003).

L'ultima ipotesi formulata è la *teoria dell'ampiezza*, la quale ipotizza che sia l'ampiezza del picco notturno il segnale che determina l'azione della melatonina. Delle tre ipotesi la teoria dell'ampiezza e quella meno attendibile in quanto molti fattori può influenzare la secrezione della melatonina (Goridou-Boof et al., 2005) (Fig. 3).

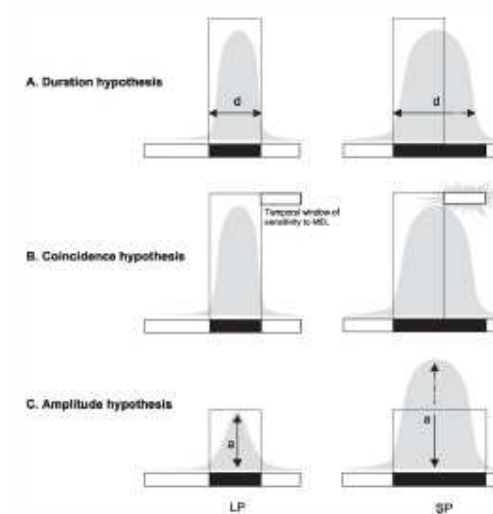


Fig. 3 – *Teorie d'azione della melatonina. A: teoria della durata; B: teorie delle coincidenze interne; C: teoria dell'ampiezza del picco di melatonina.*

I recettori della melatonina

La melatonina agisce attraverso specifici recettori che sono situati sia a livello del sistema nervoso centrale che in diversi organi periferici dell'organismo (Cardinali et al., 1979). La tipizzazione dei diversi recettori ha condotto a chiarire diversi meccanismi d'azione della melatonina (Dubocovich, 1988a).

Sono stati indentificati due tipi di recettori chiamati originariamente ML_1 e ML_2 rispettivamente ad alta e a bassa affinità per ormone pineale (Dubocovich 1988b, 1995). Del recettore ML_1 sono stati identificati tre sottotipi, Mnl_{1a} , Mnl_{1b} e Mnl_{1c} (Reppert et al., 1994, 1996). Successivamente la nomenclatura è stata cambiata e i recettori Mnl_{1a} , Mnl_{1b} hanno preso il nome di $MT1$ e $MT2$ rispettivamente mentre quello Mnl_{1c} ha mantenuto lo stesso nome. Quest'ultimo recettore fino ad oggi non è stato identificato nei mammiferi ma solamente negli anfibi. (Ebisawa et al., 1994; Dubocovich et al., 1999). Il recettore ML_2 in seguito è stato denominato MT_3 .

La struttura del recettore $MT1$ è composta da 350 aminoacidi mentre quella di quello $MT2$ da 362 aminoacidi, entrambi hanno un peso molecolare di 40kDa. Queste catena amminoacidiche dei due recettori è uguale per il 60% e il gene che codifica per questi recettori risiede in due cromosoni differenti (Reppert et al., 1996).

I recettori $MT1$ e $MT2$ hanno come messaggero di traduzione delle G-proteina e sono sensibili alla tossina della pertosse (Masana e Dubocovich, 2001) (Fig. 4).

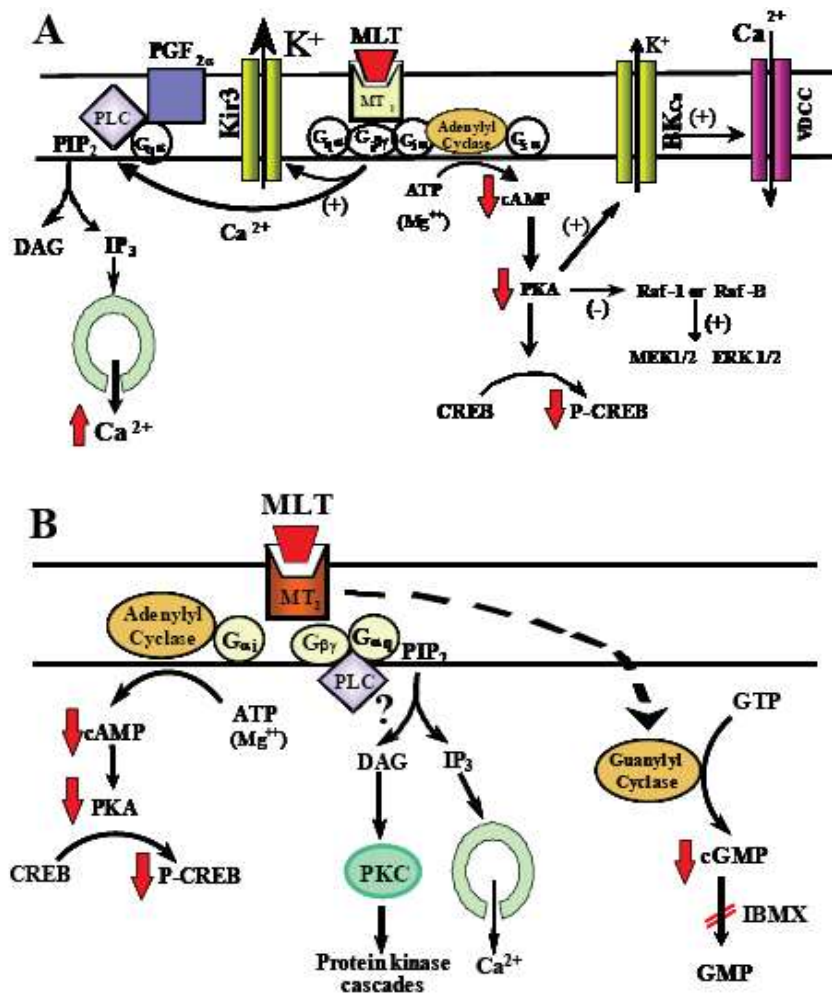


Fig. 4 – Traduzione del segnale nei due tipi di recettori ad alta affinità.
 A: recettore MT1; B: recettore MT2.

I recettori MT1 e MT2 sono presenti nel sistema nervoso centrale e in diverse strutture dell'organismo in diversi mammiferi compreso l'ovino. L'MT2 sembra sia implicato nel meccanismo della regolazione della pressione e della risposta all'infiammazione. (Reppert et al., 1996; Witt-Enderby et al., 2003).

Il recettore MT1, invece è implicato nella regolazione della stagionalità riproduttiva in diverse razze di ovini come riscontrato da

diversi AA (Messer et al., 1997; Pelletier 2000; Notter e Cockett, 2005). Anche negli ovini di pecora di razza Sarda il polimorfismo di questo recettore influenza la stagionalità riproduttiva (Carcangiu et al., 2009). Tuttavia in alcune razze di ovini francesi tale polimorfismo non determina alcuna influenza sull'attività riproduttiva. (Hernandez et al., 2010). Il mancato effetto del polimorfismo in questa razza potrebbe essere dovuto ad altri fattori come il BCS (peso corporeo), l'età o altri fattori ambientali. Tuttavia negli ovini di razza Sarda il BCS e l'età non hanno modificato l'effetto del polimorfismo sulla stagionalità riproduttiva (Mura et a., 2014). Tuttavia, altre condizioni del management degli animali possono aver influenzato la risposta riproduttiva come l'effetto maschio o la stagione di osservazione dell'attività sessuale.

SCOPO

Diversi mammiferi mostrano un andamento stagionale della loro attività riproduttiva. Alcune specie presentano uno stimolo a riprodursi quando le ore di luce aumentano, mentre, altri si riproducono con l'incrementare delle ore di buio. Gli ovini appartengono alla seconda categoria di animali e presentano naturalmente l'attività sessuale in autunno con il parto in primavera. Tale comportamento riproduttivo garantisce la sopravvivenza della prole, in quanto la primavera è la stagione migliore, come clima, per la crescita dei piccoli. Inoltre, in primavera la madre ha a disposizione una quantità di risorse alimentari che garantiscono una buona produzione di latte e perciò una buona crescita della prole. Tuttavia, questa stagionalità riproduttiva determina una lattazione di breve durata a causa dell'arrivo della stagione calda, che alle latitudini mediterranee, provoca uno scadimento del pascolo e un innalzamento della temperatura ambientale, entrambi poco idonei alla produzione del latte.

Pertanto al fine di migliorare le produzioni degli ovini sono state utilizzate diverse tecniche per anticipare la stagione dei parti. Tra queste, il *flushing* abbinato all'effetto maschio, la sincronizzazione degli estri e la somministrazione di diversi ormoni, hanno dato la possibilità di attenuare la stagionalità riproduttiva negli ovini.

Negli ultimi anni la caratterizzazione di uno dei recettori della melatonina e l'identificazione di alcuni polimorfismi nel suo gene hanno mostrato influenzare la stagionalità riproduttiva in diverse razze di ovini.

Anche negli ovini di razza Sarda il polimorfismo del gene del recettore della melatonina influenza la stagionalità riproduttiva determinando, appunto, un anticipo della ripresa riproduttiva in primavera.

Tuttavia, in alcune razze di ovini questo polimorfismo non determina alcuna influenza sulla stagionalità riproduttiva e si è ipotizzato che l'effetto del polimorfismo sia legato alla razza o ad altri fattori ambientali. A tale fine abbiamo voluto indagare se la risposta riproduttiva all'effetto maschio a fine inverno e inizio primavera possa essere influenzata dal polimorfismo del gene del recettore della melatonina (MTNR1A) negli ovini di razza Sarda.

MATERIALI E METODI

Animali e management

Per la ricerca sono state identificate 4 aziende, che avevano lo stesso *management*, localizzate nel Nord Sardegna (in agro di Sassari). Ciascuna azienda allevava approssimativamente 800 pecore di razza Sarda che venivano tenute a fotoperiodo naturale dalla nascita.



Fig. 5 - *Una delle aziende comprese nella ricerca.*

Durante il giorno gli animali pascolavano su erbai di leguminose e graminacee. Inoltre, ricevevano 300 g. a capo di mangime concentrato al giorno (proteina grezza 20.4% e 12.5 MJ ME/kg DM) al momento della mungitura. Tre giorni prima dell'introduzione dei maschi, in ciascuna azienda, sono state identificate 200 pecore in lattazione, dell'età di 3-5 anni, che avevano partorito tra il 20 di Ottobre e il 1° Dicembre,

per un totale di 800 pecore. Le pecore selezionate erano al terzo, quarto e quinto parto quindi avevano almeno tre anni.



Fig. 6 – *Alcuni degli animali utilizzati per la presente tesi.*

Tale scelta è dovuta dal fatto che le pecore al primo e al secondo parto presentano l'attività riproduttiva troppo tardi e quindi non possono essere inserite nella ricerca. Infatti, le pecore al primo parto generalmente partoriscono tra gennaio e aprile con il picco tra febbraio e marzo; questo condiziona anche l'attività riproduttiva della successiva stagione. Infatti nei due mesi dopo il parto gli animali presentano il picco di lattazione che condiziona negativamente l'attività riproduttiva, portando ad un ritardo dei parti anche nel secondo anno (Carcangiu et al., 2012).

Per questo motivo sono state scelte pecore al terzo parto che quindi avevano partorito tra ottobre e novembre.

Ogni animale veniva identificato dalla lettura, mediante apposito apparecchio, del microchip contenuto nel bolo ruminale e del collare numerato per evitare errori e per rendere più facile l'identificazione del soggetto. In ciascuna azienda sono stati inseriti i maschi (con un rapporto maschi femmine 1/20) nelle seguenti date: il 1° Marzo nella prima azienda (T1), il 1° Aprile nella seconda azienda (T2), il 1° Maggio nella terza azienda (T3) e il 1° Giugno nella quarta azienda (T4).

Le pecore erano isolate dai maschi da più di 90 giorni (la distanza del gregge dai maschi era di circa 1500 m per evitare che l'odore e i suoni emessi dai maschi potessero influenzare l'attività riproduttiva delle femmine). Inoltre, i maschi erano forniti di tamponi marcatori per il rilevamento degli accoppiamenti. Ciascuna pecora che mostrava i segni del tampone sulla groppa è stata registrata ogni giorno. Il colore dei tamponi marcatori veniva cambiato ogni 10 giorni per evidenziare possibili ritorno in estro degli animali. I maschi erano allontanati dal gregge dopo 70 giorni dalla loro introduzione. La diagnosi di gravidanza è stata eseguita attraverso ecografia transaddominale (Esaote Europe B.V., Maastricht, The Netherlands) con una sonda da 5.0 – 7.5 MHz. Le date dei parti e degli agnelli nati sono stati registrati fino al 220° giorno dall'introduzione dei maschi.

Prelievo dei campioni e analisi del DNA

Da ciascuna pecora è stato prelevato un campione di sangue (10 ml), dalla vena giugulare, usando provette sotto vuoto che contenevano come anticoagulante EDTA (BD Vacutainer Systems, Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK). Il DNA è stato estratto dal sangue intero usando un kit del commercio (NucleoSpin® Blood, Macherey-Nagel, Germany). 150 ng di DNA genomico è stato usato per l'amplificazione del gene usando specifici primers (Sigma Genosys Ltd., Pampisford, Cambs, UK) in accordo con quanto riportato da Messer et al. (1997).

I primers corrispondono alla posizione 285-304 (sense primer 5' – TGT GTT TGT GGT GAG CCT GG – 3') e 1108-1089 (antisense primer: 5' – ATG GAG AGG GTT TGC GTT TA – 3') della sequenza riportata da Reppert et al. (1994) (GenBank U14109). La reazione di PCR è stata eseguita, per tutti gli 800 campioni, in accordo con il metodo riportato da Carcangiu et al. (2009b). Tutti i prodotti sono stati sottoposti all'enzima di restrizione MnlI (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), che riconosce la sostituzione di una A in una G alla posizione 612 della sequenza dell'esone II del gene *MTNR1A*.

Analisi statistica

La frequenza allelica e genotipica è stata determinata dal conteggio diretto dei genotipi osservati. Il test del χ^2 è stato usato per determinare l'equilibrio di Hardy-Weinberg della mutazione analizzata (Genepop 4.2). R statistical software (Version 3.2.5) è stato usato per eseguire le analisi statistiche. Per analizzare l'effetto del periodo del trattamento e del genotipo sulla fertilità e sulla distanza in giorni dall'introduzione dei maschi al parto è stato usato un modello lineare (GLM) secondo il seguente modello:

$$Y_{ilmno} = \mu + F_i + S_l + G_m + P_n + (G_m P_n) + e_{ilmno}$$

dove Y_{ilmno} è la variabile dipendente (tasso di fertilità o distanza media in giorni tra l'introduzione dei maschi e il parto), μ è la media generale, F_i è l'effetto fisso dell'allevamento, S_l è l'effetto random dei maschi, G_m è l'effetto fisso del genotipo, P_n è l'effetto del periodo, $(G_m P_n)$ è l'interazione tra G_m e P_n ed infine e_{ilmno} è l'effetto errore. Valori di $P < 0.05$ erano considerati statisticamente significativi.

RISULTATI

Dalla PCR è stata ottenuta una singola banda di 824 bp di lunghezza che corrisponde al II esone del gene MTNR1A.

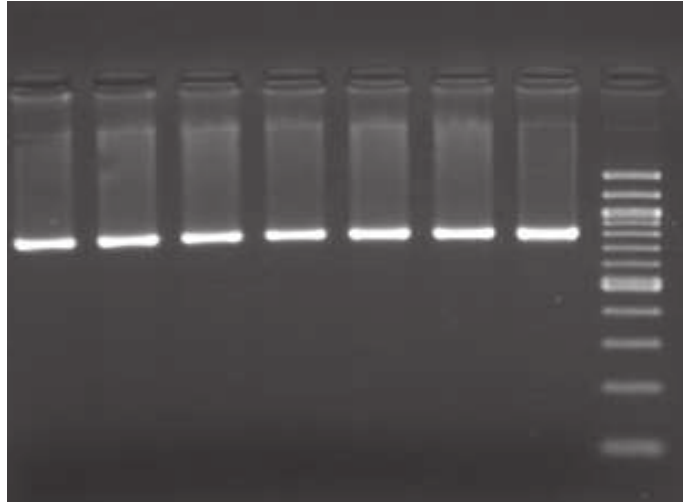


Fig. 7 – *Migrazione elettroforetica, dell'amplificato ottenuto, su gel di agarosio al 2% e colorato con bromuro di etidio. Da sinistra verso destra le prime 7 bande mostrano il gene amplificato l'8 banda il marker da 100 bp.*

La digestione con la endonucleasi MnlI conferma la presenza del polimorfismo in posizione 612 con una sostituzione di una A con una G.

La digestione con l'enzima di restrizione MnlI ha permesso di individuare 5 bande corrispondenti ai frammenti di 236 bp, 216 bp, 137 bp, 82 bp e 67 bp (Fig. 8).

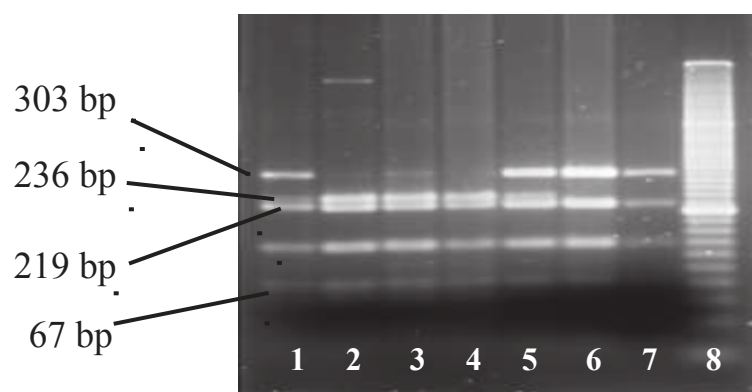


Fig. 8 - Elettroferogramma su gel di agarosio al 2% della digestione con *MlnI*. Banda 1 e 5 eterozigoti AG; linea 2,3,4 omozigoti AA; Linea 6 e 7 omozigote GG.

La media della frequenza allelica e genotipica nelle 4 aziende è mostrata nella tabella .

Tabella 1 - Media della Frequenza allelica e genotipica del polimorfismo in posizione 612 del gene *MTNR1A* nei 4 allevamenti osservati ($n=800$ capi)

Posizione polimorfismo	A612G		
	A/A	A/G	G/G
Genotipo			
Frequenza Genotipica	0.14	0.33	0.53
Allele	A	G	
Frequenza Allelica	0.32	0.68	

L'allele più frequente è risultato il G (0.68) e di conseguenza anche il genotipo G/G è risultato il più frequente. La frequenza allelica e genotipica tra gli allevamenti non hanno mostrato differenze statisticamente significative.

La popolazione non risulta in equilibrio Hardy-Weinberg, dovuto al basso numero di eterozigoti ($P < 0.005$).

La registrazione degli accoppiamenti e delle gravidanze riflettono l'andamento dei parti, con piccole differenze tra loro non superiore al 3%.

Il tasso di fertilità delle pecore che presentano il genotipo G/G e G/A risulta significativamente più alto ($P < 0.05$) rispetto a quelle che hanno il genotipo A/A, in tutti e 4 i periodi esaminati (Tabella 2). Inoltre, gli animali che hanno il genotipo G/G e G/A hanno un tasso di fertilità più alto quando vengono introdotti i maschi a marzo e ad aprile rispetto a quando vengono introdotti a maggio e a giugno. Invece, gli animali che presentano il genotipo A/A non mostrano differenze significative per il tasso di fertilità nei quattro periodi in osservazione.

La distanza media in giorni dall'introduzione dei maschi al parto risulta più corta negli animali che hanno il G/G e G/A rispetto a quelli che possiedono il genotipo A/A ($P < 0.05$).

Tutti e tre i genotipi mostrano la più corta distanza in giorni dall'introduzione dei maschi al parto ($P < 0.05$) quando i maschi sono introdotti in marzo e aprile rispetto a quando vengono introdotti in maggio e giugno.

Tabella 2 – Tasso di fertilità e distanza in giorni dall'introduzione dei maschi al parto nei quattro periodi osservati a seconda dei genotipi

Genotipi	Tasso Fertilità				Distanza in giorni tra introduzione maschi e parto			
	G/G	A/G	A/A	P	G/G	G/A	A/A	P
T1	88% ^b	88% ^b	72%	<0.05	188.4±14.6 ^a	185.8±12.1 ^a	194.2±12.1 ^a	<0.05
T2	88% ^b	89% ^b	72%	<0.05	188.1±12.1 ^a	184.1±12.8 ^a	195.1±14.3 ^a	<0.05
T3	84% ^a	83% ^a	74%	<0.05	193.1±14.7 ^b	192.1±12.2 ^b	196.1±12.5 ^a	<0.05
T4	85% ^a	84% ^a	74%	<0.05	195.9±12.5 ^b	193.6±13.4 ^b	197.6±13.9 ^a	<0.05

T1: Introduzione maschi il 1° Marzo; T2: introduzione maschi il 1° Aprile; T3: introduzione dei maschi il 1° Maggio; T4: introduzione dei maschi il 1° Giugno. Differenti lettere minuscole nelle colonne differiscono significativamente per $P < 0.05$.

L'andamento dei parti nei diversi genotipi e nei diversi periodi è mostrato nelle figure 1, 2, 3 e 4. In tutti i periodi di osservazione gli animali che mostrano il genotipo G/G o A/G hanno una percentuale di pecore partorite più alto ($P < 0.01$) tra il 160° giorno e il 200° dall'introduzione dei maschio più alto rispetto alle pecore che hanno il genotipo A/A.

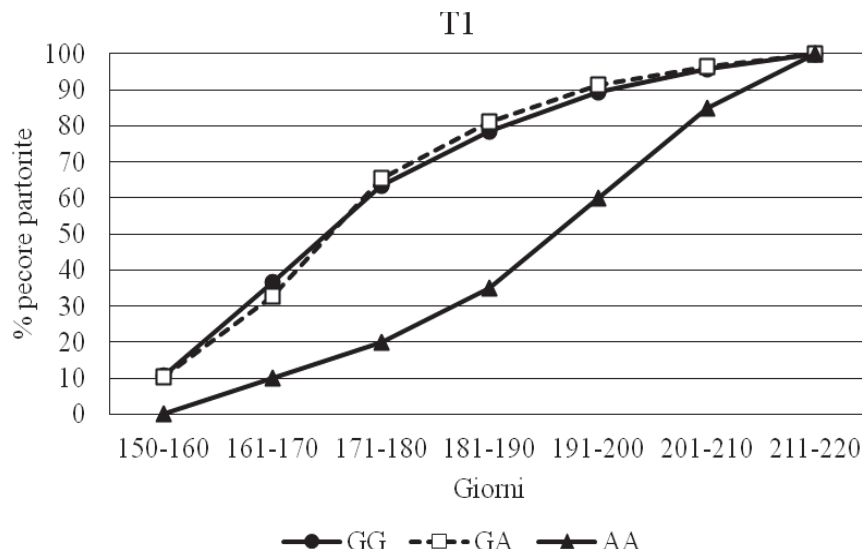


Fig. 9 - Andamento dei parti nelle pecore con inserimento del maschio il 1° Marzo.

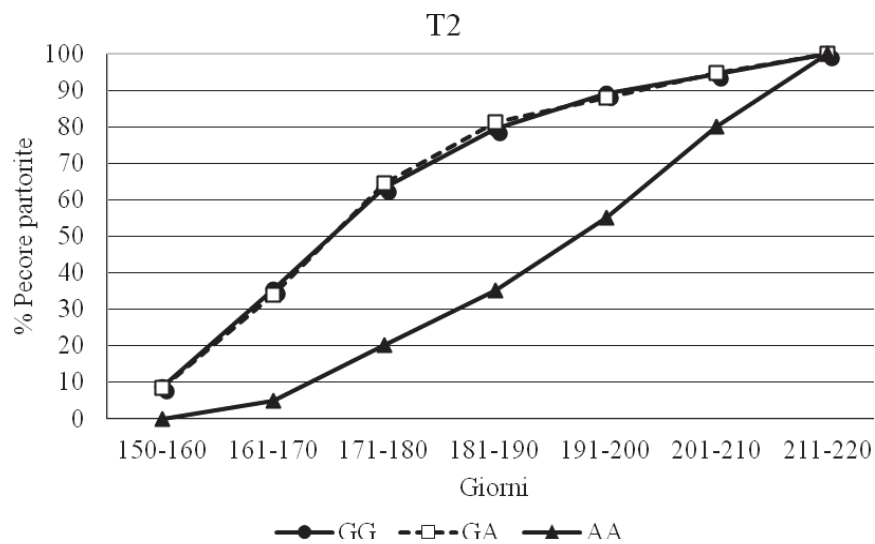


Fig. 10 - Andamento dei parti nelle pecore con inserimento del maschio il 1° Aprile.

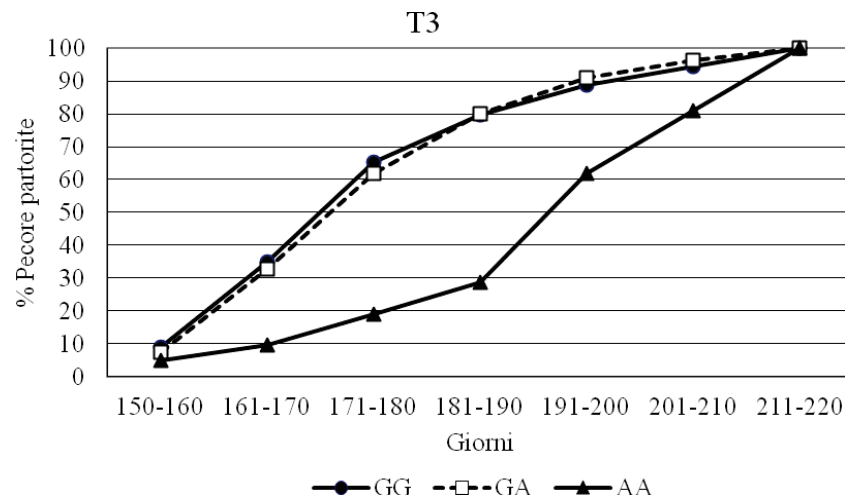


Fig. 11 - *Andamento dei parti nelle pecore con inserimento del maschio il 1° Maggio.*

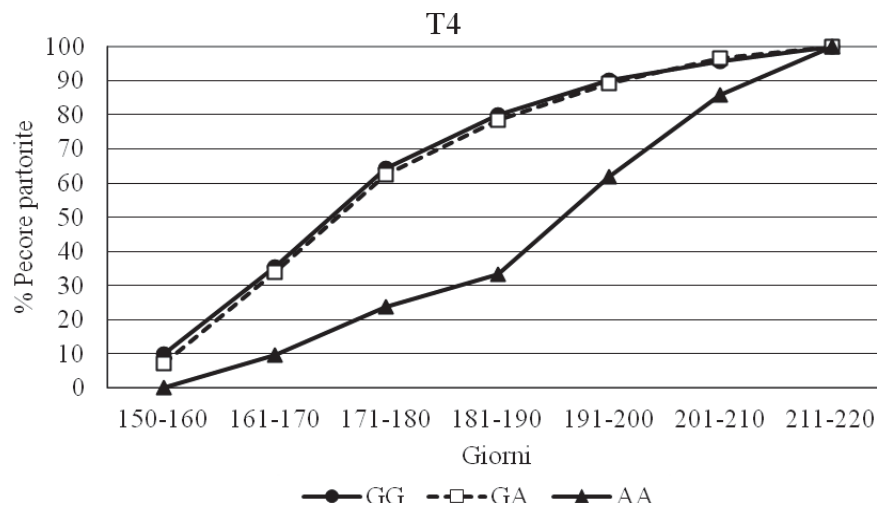


Fig. 11 - *Andamento dei parti nelle pecore con inserimento del maschio il 1° Giugno.*

La prolificità è risultata uguale e non è risultata essere influenzata ne dal genotipo e tantomeno dal periodo di osservazione.

DISCUSSIONE

La frequenza allelica e genotipica del polimorfismo analizzato è simile a quanto trovato in precedenti studi (Carcangiu et al., 2009b; Luridiana et al., 2014). Negli ovini di razza Sarda il polimorfismo in posizione 612 mostra una alta frequenza dell'allele mutante G ed è simile a quanto trovato in altre razze Europee (Mateescu et al., 2009; Messer et al., 1997; Pelletier et al., 2000). Invece, la frequenza dell'allele G trovato nel presente studio risulta più basso di quanto osservato nella razza Aragonesa, Magra e Marwari (Matinez-Royo et al., 2012; Saxena et al., 2015).

I risultati ottenuti evidenziano che il polimorfismo del gene MTNR1A influenza la ripresa dell'attività riproduttiva nella pecora di razza Sarda. Infatti gli animali che possiedono il genotipo G/G e G/A mostrano una migliore fertilità e una distanza più corta in giorni tra l'introduzione dei maschi e il parto. Questo risultato si accorda con altri studi precedenti condotti su diverse razze di pecore (Chu et al., 2006; Carcangiu et al., 2009b; Mateescu et al., 2009). Nella pecora di razza Sarda questo polimorfismo migliora la ripresa riproduttiva in primavera dopo il trattamento con melatonina (Mura et al. 2010) e anche la ripresa riproduttiva dopo la sincronizzazione degli estri e l'inseminazione artificiale (Carcangiu et al., 2011). Quindi, nella razza ovina Sarda questo polimorfismo mostra migliorare l'efficienza riproduttiva anche dopo trattamento con ormoni utilizzati per influenzare la stagionalità riproduttiva.

In altre razze di ovini allevati in Europa lo stesso polimorfismo non ha influenzato l'attività riproduttiva (Hernandez et al., 2005; Martinez-Royo et al., 2012). Pertanto, l'effetto di questo polimorfismo sull'attività riproduttiva secondo questo ultimo studio è proprio della razza oppure è influenzato da fattori ambientali come la nutrizione. Tuttavia, nella pecora di razza Sarda il diverso BCS tra gli animali non ha modificato l'effetto del polimorfismo del gene *MTNR1A* sull'attività riproduttiva (Mura et al., 2014).

Pertanto la migliore fertilità osservata in questa ricerca negli animali possessori del genotipo G/G o G/A potrebbe essere spiegata formulando alcune ipotesi.

La prima ipotesi è che questi animali presentino una minore sensibilità al fotoperiodo e quindi si trovino in uno stato di anaestro molto meno profondo rispetto a quelli che presentano il genotipo A/A.

Infatti, gli animali che si trovano in anaestro più profondo solitamente presentano uno sviluppo di follicoli di scarsa qualità che non assicurano lo sviluppo di un corpo luteo idoneo a stimolare adeguatamente l'asse ipotalamo-ipofisi alla secrezione di gonadotropine (Hunter et al., 1986; Chemineau et al., 2006).

Altre ipotesi che si possono formulare sono legate alla modificata funzionalità del recettore a causa della mutazione riscontrata. Tuttavia in precedenti studi si è osservato che la capacità di legare la melatonina dei diversi genotipi è uguale (Pelletier et al., 2000; Trecherel et al., 2010). Quindi, per spiegare l'effetto di questo polimorfismo sulla riproduzione

si può ipotizzare che questa mutazione sia associata con altre presenti nella sequenza del gene MTNR1A. Questa ipotesi trova conferma con quanto riscontrato da Pelletier et al. (2000), i quali trovarono che il polimorfismo in posizione 612 è associata ad una mutazione in posizione A702G. Questa ultima mutazione determina anche un cambio aminoacidico di una valina con una isoleucina in posizione 220 della catena amminoacidica (Pelletier et al., 2000). Inoltre, la mutazione in posizione 612, nonostante non determini una diversità legate degli alleli, causa una alterazione della trasmissione del segnale (Trecherel et al., 2010). Questo fatto potrebbe essere spiegato in quanto il cambio aminoacidico prima citato si trova in vicinanza dell'istidina 211 che è coinvolta nella trasmissione del segnale della melatonina (Conway et al., 1997; Kokkola et al., 1998). Pertanto, è ragionevole pensare che il cambio aminoacidico in posizione 220 possa determinare una modificazione sterica della catena amminoacidica che altera la trasduzione del segnale (Trecherel et al., 2010).

Inoltre, la mutazione amminoacidica in posizione 220 ha mostrato inibire l'adenilato ciclasi e questo potrebbe suggerire una potenziale modificazione da parte del polimorfismo in posizione 612 di questo gene nella trasmissione del segnale melatoninico come anche prospettato da Trecherel et al., (2010). Questi ultimi effetti potrebbero spiegare l'effetto osservato sull'attività riproduttiva da parte dei genotipi G/G and G/A.

Inoltre è stato osservato che le mutazioni silenti nei geni sono associate con il miglioramento di tratti produttivi, senza che si conosca

l'effettivo meccanismo che lo determina. Inoltre, i cambi di una base in un codone senza determinare cambi amminoacidici sono stati associati con differenti livelli di espressione dei geni (Lavner and Kotlar, 2005). Molti aminoacidi sono codificati da diversi codoni e il cambio di un solo codone solamente determina una cambiamento nella espressione di quel gene (Lavner and Kotlar, 2005).

Comunque studi sul secondo messaggero associato all'attivazione del recettore della melatonina o alla espressione del gene MTNR1A sono necessari per chiarire queste ipotesi sugli effetti del polimorfismo di questo gene (Conway et al., 1997; Brydon et al., 1999).

Inoltre, i recettori della melatonina sono stati identificati anche nell'ovaio (Woo et al., 2001; Zhang et al., 2009), e quindi non si può escludere che l'effetto del polimorfismo possa essere stato esplicito anche a questo livello. Infatti, per le ipotesi fatte sopra, potrebbe essere che negli animali portatori dei genotipi G/G e G/A lo sviluppo dei follicoli sia stato migliore portando quindi ad un miglioramento dell'efficienza riproduttiva.

Inoltre, bisogna prendere atto che la melatonina nell'ovaio promuove lo sviluppo follicolare e protegge il corpo luteo (Tamura et al., 2009; 2012). Ancora, i recettori per la melatonina sono presenti anche nelle cellule della granulosa e anche questo può avere influenzato la risposta riproduttiva negli animali portatori dei genotipi G/G e G/A.

I nostri dati, inoltre, mostrano che lo stimolo dell'effetto maschio sull'attività riproduttiva è molto più efficiente negli animali con i

genotipi G/G e G/A rispetto a quelli con il genotipo A/A. Infatti, nella presente ricerca gli animali con i genotipi G/G e G/A hanno mostrato un tasso di fertilità più alto e una distanza dall'introduzione dei maschi al parto inferiore rispetto agli animali con il genotipo A/A.

Inoltre, l'effetto maschio è risultato più efficiente negli animali con i genotipi G/G e G/A quando gli arieti sono stati inseriti a Marzo e Aprile rispetto a Maggio e Giugno. Sembrerebbe quasi che gli animali che hanno questi genotipi risentano meno dell'effetto del fotoperiodo.

CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati confermano che il polimorfismo del gene *MTNR1A* influenza la ripresa riproduttiva stagionale nella pecora di razza Sarda e questo effetto è più evidente quando i maschi vengono introdotti nel gregge a Marzo e Aprile rispetto a Maggio e Giugno.

In particolare gli animali con i genotipi G/G e G/A mostrano una fertilità migliore e una distanza tra l'introduzione dei maschi e il parto più corta.

Pertanto, questa mutazione può essere inserita in piani di selezione genetica per migliorare l'attività riproduttiva stagionale negli ovini di razza Sarda.

Comunque per spiegare meglio il meccanismo d'azione del polimorfismo in posizione 612 del gene *MTNR1A* e dei suoi rapporti con la mutazione in posizione 706 bisogna effettuare ulteriori studi. Inoltre studiare l'espressione dei genotipi del gene suddetto a livello della granulosa e delle cellule luteali possono fornire informazioni utili per spiegare le sue azioni sull'attività riproduttiva.

BIBLIOGRAFIA

- Aleandri V., Spina V., Morini A. (1996). The pineal gland and reproduction. *Human Reproduction Update* 1996, Vol. 2, No. 3: 225-235.
- Barrett P., Messenger S., Shuster C., Moar K.M., Mercer J.G., Morgan P.J. (2002). Pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide acts as a paracrine regulator of melatonin-responsive cell of the ovine pars tuberalis. *Endocrinology* 143, 2366-2375
- Besancon R., Simonneaux V., Jouvet A., Belin M. F., Fevre-Montange M. (1996). Nycthemeral expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat pineal gland. *Brain Res.* 40: 136-138.
- Bittman E. L., Karsch F. J. (1984). Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory daylengths in the ewe. *Biol. Reprod.* 30, 585-593
- Brydon, L., Roka, F., Petit, L., de Coppet, P., Tissot, M., Barrett, P., Morgan, P.J., Nanoff, C., Strosberg, A.D., Jockers, R. (1999). Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol. Endocrinol.* 13, 2025–2038.
- Carcangiu, V., Luridiana, S., Vacca, G.M., Daga, C., Mura, M.C. (2011). A polymorphism at the melatonin receptor 1A (MTNR1Aa) gene in Sarda ewes affects fertility after AI in the spring. *Reprod. Fert. Dev.* 23, 376–380.
- Carcangiu V, Mura M.C., Vacca G.M., Pazzola M., Dettori M.L., Luridiana S., et al. (2009). Polymorphism of the melatonin receptor MT1 gene and its relationship with seasonal reproductive activity in the Sarda sheep breed. *Anim. Reprod. Sci.* 116, 65–72.

- Cardinali D. P., Vacas M. I., Boyer E. E. (1979). Specific binding of melatonin in bovine brain. *Endocrinology* 105, 437-441
- Chemineau, P., Pellicer-Rubio, M.T., Lassoued, N., Khaldi, G., Monniaux, D. (2006). Male induced short estrous ovarian cycles in sheep and goats: a working hypothesis. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 417-429.
- Chu MX, Cheng DX, Liu WZ, Fang L, Ye SC. (2006). Association between melatonin receptor 1A gene and expression of reproductive seasonality in sheep. *Asian-Austr J Anim Sci* 19, 1079-84.
- Coon S.L., Roseboom P.H., Baler R., Weller J.L., Namboodiri M.A.A., Koonin E.V., Klein D.C. (1995). Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science* 270, 1681-1683.
- Coon S.L., Weller J.L., Korf H.W., Namboodiri M.A.A., Rollag M., Klein D.C. (2000). cAMP regulation of Arylalkylamine N-Acetyltransferase (AANAT, EC 2.3.1.87): a new cell line (1E7) provides evidence of intracellular AANAT activation. *J. Biol. Chem.* 275, 24097-24107.
- Conway S, Canning SJ, Barrett P, Guardiola-Lemaitre B, Delagrangé P, Morgan PJ. (1997). The roles of valine 208 and histidine 211 in ligand binding and receptor function of the ovine Mel1a beta melatonin receptor. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 239, 418–23.
- Drijfhout W.J., van der Linde A.G., Kooi S.E., Grol C.J., Westerink B.H.C. (1996). Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *J. Neurochem.* 66, 748-755

- Dubocovich M. (1988a). Pharmacology and function of melatonin receptors.
FASEB J 2, 2765-2773
- Dubocovich M. L. (1988b). Role of melatonin in retina. *Progress in Retinal Research* 8, 129-151
- Dubocovich M. L. (1995). Melatonin receptors: are there multiple subtypes?
Trends Pharmacol Sci 16, 50-56
- Dubocovich ML, Masana MI, Benloucif S. (1999). Molecular pharmacology and function of melatonin receptor subtypes. *Adv Exp Med Biol.* 460, 181-90.
- Ebisawa T., Karne S., Lerner M. R., Reppert S. M. (1994). Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores.
Proc Natl Acad Sci USA 91, 6133-6137
- Fleming J.V., Barrett P., Coon S.L., Klein D.C., Morgan P.J. (1999). Ovine Arylalkylamine N-acetyltransferase in the pineal and pituitary gland: differences in function and regulation. *Endocrinology* 140, 972-978
- Foulkes N.S., Whitmore D., Sassone-Corsi P. (1997). Rhythmic transcription : The molecular basis of circadian melatonin synthesis. *Biol. Cell.* 89, 487-494
- Gastel J.A., Roseboon P.H., Rinaldi P.A., Weller J.L., Klein D.C. (1998). Melatonin production: proteosomal proteolysis in serotonin N-Acetyltransferase regulation. *Science* 279, 1358-1360
- Goldman B.D. (2001). Photoperiodic time measurement mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms* 16, 283-301

- Garidou-Boof M. L., Sicard B., Bothorel B., Pitrosky B., Ribelayga C., Simonneaux V., Pevet P., Vivien-Roels B. (2005). Environmental control and adrenergic regulation of pineal activity in the diurnal tropical rodent, *Arvicanthis ansorgei*. *J. Pineal. Res.* 38: 189-197.
- Hatter S., Liao H.W., Takao M., Berson D.M., Yau K.W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cell: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065-1069-1070
- Hernandez X., Bodin L., Chesneau D., Guillaume D., Chemineau P., Malpoux B., Migaud M. (2005). Relationship between MT1 melatonin receptor gene polymorphism and seasonal physiological responses in Île-de-France ewes *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 151–162.
- Hirota T., Fukada Y. (2004). Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zoological Sci.* 21, 359-368
- Hunter, M.G., Southee, J.A., McLeod, B.J., Haresign, W. (1986). Progesterone pretreatment has a direct effect on GnRH-induced preovulatory follicles to determine their ability to develop into normal corpora lutea in anoestrous ewes. *J. Reprod. Fertil.* 76, 349-363.
- Johnston J.D., Bashforth R., Diack A., Andersson H., Lincoln G.A., Hazlerigg D.G. (2004). Rhythmic melatonin secretion does not correlate with the expression of arylalkylamine N-acetyltransferase, inducible cyclic AMP early repressor, period1 or cryptochrome1 mRNA in the sheep. *Neurosci.* 124, 789-795

- Kalsbeek A., Buijs R. M. (2002). Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res.* 309: 109-118.
- Klein D.C., Ganguly S.L., Coon S.L., Shi Q., Gaildrat P., Morin F., Weller J.L., Obsil T., Hickman A., Dyda F. (2003). 14-3-3 proteins in pineal photoneuroendocrine transduction: how many roles? *J. Neuroendocr.* 15, 370-377
- Klein D.C., Ganguly S., Coon S., Weller J.L., Obsil T., Hickman A., Dyda F. (2002). 14-3-3 Protein and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 365-373
- Kokkola T, Watson MA, White J, Dowell S, Foord, SM, Laitinen, JT. (1988). Mutagenesis of human Mel1a melatonin receptor expressed in yeast reveals domains important for receptor function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 531–536.
- Lavner, Y., Kotlarm D. (2005). Codon bias as a factor in regulating expression via translation rate in the human genome. *Gene* 345, 127-138.
- Lincoln G.A., Johnston J.D., Andersson H., Wagner H., Hazlerigg D.G. (2005). Photorefractoriness in mammals: dissociating a seasonal timer from the circadian-based photoperiod response. *Endocrinology*, in press
- Luridiana, S., Mura, M.C., Daga, C., Diaz, M.L., Bini, P.P., Cosso, G., Carcangiu, V. (2014). The relationship between melatonin receptor 1A gene (MTNR1A) polymorphism and reproductive performance in Sarda breed sheep. *Livest. Sci.* 171, 78-83.

- Malpoux B., Daveau A., Maurice-Mandon F., Duarte G., Chemineau P. (1998). Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* 139, 1508-1516
- Martínez-Royo A, Lahoza B, Alabarta JL, Folcha J, Calvoa JH. (2012). Characterisation of the Melatonin Receptor 1A (MTNR1A) gene in the Rasa Aragonesa sheep breed: Association with reproductive seasonality *Anim Reprod Sci* 133, 169–175.
- Messer L.A., Wang L., Tuggle C.K., Yerle M., Chardon P., Pomp D., Womack J.E., Barendse W., Crawford A.M., Notter D.R., Rothschild M.F. (1997). Mapping of the melatonin receptor 1a (MTNR1A) gene in pigs, sheep, and cattle. *Mamm. Genome* 8, 368-370
- Mateescu, R.G., Lunsford, A.K., Thonney, M.L. (2009). Association between melatonin receptor 1A gene polymorphism and reproductive performance in Dorset ewes. *J. Anim. Sci.* 87, 2485-2488.
- Molina C.A., Foulkes N.S., Lalli E., Sassone-Corsi P. (1993). Inducible and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75: 875-886.
- Mura, M.C., Luridiana, S., Bodano, S., Daga, C., Cosso, G., Diaz, M.L., Bini, P.P., Carcangiu, V. (2014). Influence of melatonin receptor 1A gene polymorphisms on seasonal reproduction in Sarda ewes with different body condition scores and ages. *Anim. Reprod. Sci.* 149, 173-177.

- Mura MC, Luridiana S, Vacca GM, Bini PP, Carcangiu V. (2010). Effect of genotype at the MTNR1A locus and melatonin treatment on first conception in Sarda ewe lambs. *Theriogenology* 74, 1579–1586.
- Notter D.R., Cockett N.E. (2005). Opportunities for detection and use of QTL influencing seasonal reproduction in sheep: a review. *Genet. Sel. Evol.* 37 (Suppl. 1) S39-S53
- Pellettier J., Bodn L., Hanocq E., Malpoux B., Teyssier J., Timonier J., Chemineau P. (2000). Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene Mel_{1a} receptor in the ewe. *Biol. Reprod.* 62, 1096-1101
- Pfeffer M., Moronde E., Molina C.A., Korf H-W., Stehle J.H. (1999). Inducible cyclic AMP early repressor Protein in rat pinealocytes: a highly sensitive natural reporter for regulated gene trascription. *Mol. Pharmacol.* 56, 279-289
- Privat K., Ravault J.P., Chesneau D., Fever-Montagne M. (1999). Day/Night variation of tryptophan hydroxylase and serotonin N-acetyl-trasferase mRNA levels in the ovine pineal gland and retina. *J. Pineal. Res.* 26: 193-203.
- Reppert S.M., Weaner D.R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418, 935-941
- Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron.* 13(5):1177-85.

- Reppert S.M., Weaver D.R., Godson C. (1996). Melatonin receptors step into the light cloning and classification subtypes. *Trend Pharmacol Sci.* 17, 100-102
- Russel AJF, Dowey JM, Gunn RG. (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agr. Sci.* 72, 451–454.
- Saxena, V.K., Jha, B.K., Meena, A.S., Narula, H.K., Kumar, D., Naqvi, S.M.K., (2015). Assessment of genetic variability in the coding sequence of melatonin receptor gene (*mtnr1a*) in tropical arid sheep breeds of India. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 517–521.
- Schomerus C., Korf H.W., Laedtke E., Weller J.L., Klein D.C. (2000). Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. *J. Neurochem.* 75, 2123-2132
- Simonneaux V., Poirel V-J, Garidou M.L., Nguyen D., Diaz-Rodriguez E., Pevét P. (2004). Daily rhythms and regulation of clock gene expression in the rat pineal gland. *Mol. Brain Res.* 120, 164-172
- Simonneaux V., Ribelayga C. (2003). Generation of the melatonin message in Mammals: a review of complex regulation of melatonin synthesis by noradrenergic, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol. Rev.* 55,
- Stehle J.H., von Gall C., Korf H-W. (2001). Analysis of cell signalling in the rodent pineal gland deciphers regulators of dynamic transcriptional in neural/endocrine cells. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1-9

- Tamura, H., Nakamura, Y., Korkmaz, A., Manchester, L.C., Tan, D., Sugino, N., Reiter R.J. (2009). Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertil. Steril.* 92, 328–343.
- Tamura, H., Takasaki, A., Taketani, T., Tanabe, M., Kizuka, F., Lee, L., Tamura, I., Maekawa, R., Aasada, H., Yamagata, Y., Sugino, N. (2012). The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. *J. Ovarian Res.* 5, 5.
- Trecherel E, Batailler M, Chesneua D, Delagrangef P, Malpauxa B, Chemineau P, et al. (2010). Functional characterization of polymorphic variants for ovine MT1 melatonin receptors: Possible implication for seasonal reproduction in sheep *Anim Reprod Sci* 122, 328–334.
- Witt-Enderby P.A., Bennett J., Jarzynka J.J., Firestina S., Melan M.A. (2003). Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci.* 72, 2183-2198
- Zatz M., Gastel J.A., Heath III J.R. Klein D.C. (2000). Click pineal melatonin synthesis: light and cyclic AMP control abundance of serotonin N-Acetyltransferase protein. *J. Neurochem.* 74, 2315-2321
- Woo, M.M.M., Tai, C.J., Kang, S.K., Nathwani, P.S., Pang, S.F., Leung, P.C.K., (2001). Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4789–4797.
- Zhang, Y., Zhu, J., Li, F., Ma, Y., Zhao, X. (2009). Cloning of melatonin receptor subtype MT1 in ovary of ewe. *Chin. J. Vet. Sci.* 29, 1495–1499.