



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en Salud Global

Efecto de dietas ricas en fitomelatonina sobre el daño oxidativo en espermatozoides ovinos.

Effect of phytomelatonin-rich diets on oxidative damage in ram sperm

Autor/es

Victoria Peña Delgado

Director/es

Melissa Carvajal Serna
Adriana Casao Gascón

Facultad de
Veterinaria

2021

Parte de los resultados derivados del presente Trabajo Fin de Máster fueron presentados en forma de comunicación oral en las XIX Jornadas AIDA (Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario) sobre Producción Animal, que se celebraron de forma online los días 1 y 2 de junio de 2021 (Ver Anexos).

Título: “Efectos del consumo de dietas ricas en fitomelatonina en la reproducción de moruecos”

Autores: Peña-Delgado, V., Carvajal-Serna, M., Miguel-Jiménez, S., Abecia, J.A., Fondevila, M., Pérez-Pe, R y Casao, A.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1 SITUACIÓN E IMPORTANCIA DEL SECTOR OVINO EN ESPAÑA	4
2.2 PAPEL DE LA MELATONINA EN LA REPRODUCCIÓN OVINA	5
2.2.1 Administración <i>in vivo</i> de la melatonina	8
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS	11
4. ANIMALES UTILIZADOS Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS	11
4.1.1 Obtención de muestras seminales y extracción de plasma seminal.....	11
4.1.2 Obtención de muestras de sangre y extracción de plasma sanguíneo ...	11
4.2 EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS	12
4.2.1 Análisis de la motilidad espermática	12
4.2.2 Estudio de la viabilidad celular (integridad de la membrana plasmática).12	12
4.2.3 Determinación de la inversión de fosfatidilserina.....	14
4.2.4 Estudio de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	15
4.3 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MELATONINA EN PLASMA SEMINAL	16
4.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	17
4.4.1 Glutatión reductasa (GRD, EC.1.6.4.2).....	17
4.4.2 Glutatión peroxidasa (GPX, EC.1.11.1.9)	17
4.4.3 Catalasa (CAT, EC.1.11.1.6)	18
4.4.4 Superóxido Dismutasa (SOD, EC.1.15.1.1)	18
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	19
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
5.1 EFECTOS DE LA DIETA RICA EN FITOMELATONINA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE MELATONINA EN PLASMA SEMINAL	20
5.2 EFECTO DE UNA DIETA RICA EN FITOMELATONINA SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA	21
5.2.1 Efecto sobre la motilidad	21
5.2.2 Efecto sobre la viabilidad	22
5.2.3 Efecto sobre la inversión de la fosfatidilserina de la membrana plasmática	23
5.2.4 Efecto sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	24
5.3 EFECTO DE UNA DIETA RICA EN FITOMELATONINA SOBRE LAS ENZIMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	26
6. CONCLUSIONES	31

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
8. ANEXOS	40

1. RESUMEN

La ganadería ovina, sobre todo los sistemas extensivos, puede considerarse como un agroecosistema que actualmente se ve amenazado por factores económicos, ambientales y sociales. Además, un factor limitante de la producción en estos sistemas es la estacionalidad reproductiva, que está regulada por la secreción nocturna de melatonina. Esta hormona se ha utilizado en forma de implantes subcutáneos para modular esa estacionalidad. Sin embargo, con el fin de adaptar la producción a las nuevas demandas del consumidor sería interesante sustituir la melatonina sintética de los implantes por otras fuentes naturales de melatonina, como por ejemplo la fitomelatonina, presente en las plantas, y que se puede administrar con la dieta. De este modo, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto del consumo de dietas ricas en fitomelatonina sobre la calidad seminal y la composición del plasma seminal del morueco.

Para ello, durante cinco meses, 9 moruecos de raza Rasa Aragonesa fueron alimentados con una dieta comercial y otros 9 con una dieta rica en fitomelatonina. Se obtuvieron muestras seminales por vagina artificial cada 15 días, y se evaluó la motilidad, la viabilidad, los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) y marcadores apoptóticos (inversión de la fosfatidilserina, PS), así como la concentración de melatonina y la actividad de las enzimas antioxidantes (glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa) en el plasma seminal. Además, una vez al mes se obtuvieron muestras de sangre para evaluar la actividad de estas enzimas en plasma sanguíneo.

La dieta rica en fitomelatonina aumentó la concentración de melatonina en plasma seminal, aunque este aumento no fue estadísticamente significativo. A partir del segundo mes de alimentación se observó un aumento en el porcentaje de espermatozoides viables y espermatozoides viables con bajos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en comparación con el grupo control ($P<0,05$), que se mantuvo a lo largo de todo el experimento. Además, el análisis de la actividad de las enzimas de defensa antioxidante del plasma sanguíneo o plasma seminal sugiere que la dieta rica en fitomelatonina no

actuaría por esta vía, ya que no se observaron cambios al comparar con el grupo control.

En conclusión, este trabajo sugiere que una dieta rica en fitomelatonina aumenta la viabilidad espermática y disminuye los niveles intracelulares de ROS, y es capaz de ejercer este efecto de forma directa sobre los espermatozoides, y no a través de la modulación de la actividad de enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

Sheep husbandry, especially extensive systems, can be considered an agroecosystem that is currently threatened by economic, environmental and social factors. Furthermore, one of the limiting factors in this system is reproductive seasonality, which is regulated by nocturnal melatonin secretion. Subcutaneous implants of this hormone have been used to modulate this seasonality. However, in order to adapt sheep production to the new consumer demands, it would be interesting to replace the synthetic melatonin present in implants with other natural sources of melatonin, such as phytomelatonin, which is present in plants, and which can be administered with the diet. Thus, the main objective of this work was to evaluate the effect of phytomelatonin-rich diets on ram sperm quality and seminal plasma composition.

For this purpose, 9 Rasa Aragonesa rams were fed with a commercial diet and another 9 with a phytomelatonin-rich diet for five months. Semen samples were obtained by artificial vagina every 15 days, and motility, viability, intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) and apoptotic markers (phosphatidylserine inversion, PS) were evaluated, as well as the melatonin concentration and the activity of antioxidant enzymes (glutathione reductase, glutathione peroxidase, catalase, and superoxide dismutase) in seminal plasma. In addition, blood samples were obtained once a month to evaluate the activity of these enzymes in blood plasma.

The diet rich in phytomelatonin increased melatonin concentration in seminal plasma, although this increase was not statistically significant. From the second month of feeding, an increase in the percentage of viable sperm and viable sperm with low levels of reactive oxygen species (ROS) was observed

compared to the control group ($P < 0.05$). This increment was maintained until the end of the experiment. In addition, the analysis of the activity of the antioxidant enzymes in blood and seminal plasma suggests that the phytomelatonin would not act modulating these enzymes since no changes were observed when compared with the control group.

In conclusion, this work suggests that a phytomelatonin-rich diet increases sperm viability, decreases intracellular ROS levels, and can exert this effect directly on sperm, not through the modulation of antioxidant enzyme activity.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 SITUACIÓN E IMPORTANCIA DEL SECTOR OVINO EN ESPAÑA

La ganadería ovina es una parte básica de la ganadería mundial, pues se encuentra distribuida por todo el planeta para el aprovechamiento de carne, leche, y también lana, cuero y estiércol. En España, este sector, junto con el caprino, supone un 3,8% de la Producción Final Agraria (PFA) del país, ocupando el quinto lugar en importancia económica en España en términos de renta agraria, por detrás del sector porcino, el de vacuno de carne, la avicultura de carne y del sector vacuno de leche (1).

Los factores que determinan la importancia de la ganadería ovina en nuestro país son múltiples, pues se trata de una producción muy localizada en zonas desfavorecidas que, al emplear sistemas productivos tradicionales, condiciona el paisaje y hace que sus producciones adquieran un alto valor (2).

La ganadería ovina puede considerarse como un agroecosistema, pues éste se define como cualquier tipo de ecosistema modificado y gestionado por los seres humanos con el objetivo de obtener alimentos, fibras y otros materiales de origen biótico (3). De este modo, como todo ecosistema, el sector ovino puede proporcionar distintos servicios ecosistémicos. Estos servicios, definidos en la Evaluación de los Ecosistemas del Milenio, son todos los beneficios, tanto directos como indirectos, que los seres humanos obtienen de los ecosistemas (4).

Los servicios ecosistémicos se clasifican en cuatro grupos (5):

- **Servicios ecosistémicos de aprovisionamiento:** todos aquellos productos o materias primas extraídas del medio ambiente para su consumo o utilización, como los alimentos, el agua, los recursos energéticos, los medicinales....
- **Servicios ecosistémicos de regulación:** son los procesos biofísicos que tienen lugar en los ecosistemas y que ayudan a mitigar algunos impactos globales o locales, como la regulación del ciclo del agua, del clima, el control natural de enfermedades y plagas, el mantenimiento del suelo...

- **Servicios ecosistémicos culturales:** son todos los beneficios recreativos, estéticos o espirituales que proporcionan los ecosistemas, por ejemplo, el valor de los paisajes, los sentimientos de arraigo y pertenencia, servicios recreativos y de ecoturismo...
- **Servicios ecosistémicos de soporte:** son todos aquellos procesos ecológicos necesarios para que existan los otros tres tipos de servicios ecosistémicos, como el ciclo del agua, la formación del suelo, los ciclos biogeoquímicos de nutrientes, la fotosíntesis...

Vemos, por tanto, que los servicios ecosistémicos tienen un valor intrínseco que no solo es medioambiental, sino también económico y socio-cultural.

Volviendo a la ganadería ovina, los sistemas extensivos, en concreto, proveen múltiples servicios ecosistémicos, pues además de la producción primaria de carne y leche, proporcionan una gestión sostenible de recursos renovables, la preservación y la mejora de la biodiversidad, la conservación del paisaje y de la viabilidad social y económica de muchas áreas rurales (6).

A pesar de esta multifuncionalidad, la continuidad de estos sistemas se ve actualmente amenazada por factores económicos, ambientales y sociales (7). En los últimos años, se ha producido un fuerte descenso tanto en el número de granjas como en el de animales, pasando de los 22,4 millones de cabezas censadas en el año 2006, a las 15.852.525 cabezas censadas en el año 2018 (1). Fenómenos como el despoblamiento y el abandono de las actividades agrarias en zonas rurales, junto con la falta de relevo generacional o deficiencias en el manejo técnico y económico, podrían estar detrás de este descenso (8).

2.2 PAPEL DE LA MELATONINA EN LA REPRODUCCIÓN OVINA

Uno de los factores limitantes en la producción ovina es la estacionalidad reproductiva de estos animales, que está regulada por la secreción de melatonina nocturna. La melatonina es una hormona sintetizada principalmente en la glándula pineal durante la noche a partir del aminoácido triptófano, aunque también se produce a lo largo del día en otros tejidos extra-pineales, como la piel (9), el ojo (10), el tracto gastrointestinal (11), el tracto

reproductor femenino (12) y, tal y como demostró nuestro grupo de investigación, también en el tracto reproductor masculino (13). Se trata de una molécula poco soluble en agua, pero soluble en solventes orgánicos, por lo que es capaz de atravesar las membranas celulares por difusión pasiva (14).

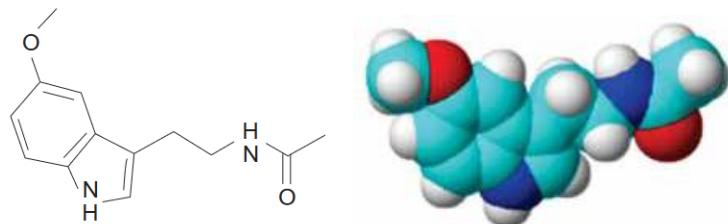


Figura 1. Estructura química y modelo espacial de la melatonina (Imagen de Martínez *et al.*, 2012 (15))

Esta hormona se encuentra implicada en la regulación de muchos procesos fisiológicos y su mecanismo de acción es muy complejo. Participa en la regulación de los ritmos circadianos y circanuales, y de la reproducción en mamíferos de reproducción estacional, como es la especie ovina. También destaca por su importante papel antioxidante, pues evita el daño oxidativo en macromoléculas, células y tejidos (16).

En lo que respecta a su participación en los procesos reproductivos, la melatonina regula la estacionalidad reproductiva a través del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (17). En el caso de la especie ovina, que presenta una estacionalidad muy marcada, con un período reproductivo entre el otoño y el invierno y otro período no reproductivo en la primavera y el verano, esta hormona actúa como estimuladora de la reproducción (18,19).

Ebling y Hastings (1992) fueron los primeros en identificar las bases del mecanismo de liberación de esta hormona (20). Cuando la luz incide sobre la retina, ésta envía la información, a través del núcleo supraquiasmático del hipotálamo, a la glándula pineal, y se suprime la liberación de melatonina. De este modo, la melatonina sólo se secreta en períodos de oscuridad, siendo su secreción proporcional a la duración de la noche. Así, la secreción de melatonina nocturna varía durante el año en función de la duración de las noches, siendo más elevada durante los días cortos de otoño e invierno que son, precisamente, las estaciones en las que la especie ovina presenta

actividad reproductiva. A su vez, la variación de la secreción de melatonina nocturna regula la liberación pulsátil de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el hipotálamo, lo que a su vez regula la secreción de hormona luteinizante (LH), responsable de la actividad ovárica en la hembra y de la producción de espermatozoides en el macho (21–23).

En los machos de algunos mamíferos, la melatonina también está presente en el plasma seminal, donde ejerce un efecto directo sobre los espermatozoides (24). Además, también se haya presente en el fluido folicular (12), desde donde puede pasar al fluido oviductal con la ovulación, regulando posiblemente la funcionalidad espermática. Diversos estudios han descrito cómo la incubación de espermatozoides con melatonina mejora la motilidad en muestras seminales humanas (25), y promueve la hiperactivación espermática (cambio en el patrón de motilidad que los espermatozoides sufren para poder llevar a cabo la fecundación) en hámster (26) y la capacitación (conjunto de cambios biofísicos y bioquímicos que deben sufrir los espermatozoides para adquirir capacidad fecundante) en búfalo (27).

En la especie ovina, nuestro grupo de investigación ha demostrado que esta hormona ejerce efectos beneficiosos en los espermatozoides, pues disminuye los marcadores apoptóticos, aumenta la tasa de fertilidad y regula el proceso de capacitación, teniendo un efecto capacitante o descapacitante en función de su concentración (28).

Por otro lado, como ya se ha comentado, la melatonina tiene un importante papel antioxidante. Esta acción antioxidante podría explicar la reducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) observada en muestras espermáticas humanas tras su incubación con melatonina (29). Dicha capacidad para disminuir los niveles de ROS podría ser la principal responsable de su acción antiapoptótica, ya que un exceso de ROS a nivel mitocondrial conduce a la muerte celular (30). No obstante, en los espermatozoides, para que se produzca el proceso de capacitación ya mencionado es necesario que haya un cierto nivel de estas especies reactivas (31). Cabe destacar que estos dos procesos, capacitación y apoptosis, comparten rutas moleculares de transducción de señal, tal y como ha descrito

nuestro grupo de investigación en la especie ovina (32). Esto resulta lógico, pues una vez que un espermatozoide se ha capacitado y ha sufrido la reacción acrosómica (proceso de fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosómica externa, para ayudar al espermatozoide a penetrar en la zona pelúcida del ovocito), solo tiene dos destinos posibles: o lograr la fecundación del ovocito o morir sin provocar una respuesta inflamatoria en el tracto reproductor femenino.

2.2.1 Administración *in vivo* de melatonina

Como hemos visto, todos los resultados obtenidos hasta ahora, tanto por nuestro grupo de investigación como por otros, apuntan a un efecto beneficioso de la melatonina sobre la funcionalidad de los espermatozoides cuando se añade *in vitro*. Pero, de cara a una mayor aplicación práctica en ganadería, interesan sus efectos tras la administración *in vivo* a los animales.

Ya en los años 80, se realizaron algunas experiencias en las que se administraba melatonina por vía oral a pequeños rumiantes, con el fin de elevar la concentración de esta hormona en sangre. La administración de melatonina diluida en solución salina o absorbida sobre los gránulos o pellets de alimento hizo que se incrementasen los niveles de melatonina en plasma sanguíneo 30 minutos después de la ingesta, y que permaneciesen elevados durante al menos siete horas en ovejas y cabras (33). Además, la aplicación diaria de forma oral de melatonina permite adelantar la temporada reproductiva en ovejas (34), aunque la eficacia del tratamiento disminuye si la administración se reduce a tres veces por semana (35). A pesar de estos estudios realizados con hembras, en moruecos no hay trabajos sobre la administración oral de melatonina en su actividad reproductiva o en la calidad seminal.

En la década siguiente, con el desarrollo de los implantes subcutáneos de melatonina, se abandonó el estudio de los efectos de la administración oral de melatonina, al ser una opción mucho menos práctica que la colocación de implantes. En este caso, tanto nuestro grupo como otros han descrito efectos beneficiosos de la melatonina administrada subcutáneamente en el comportamiento reproductivo, la calidad seminal, el tamaño testicular o los niveles de determinadas hormonas en sangre de los moruecos (36,37).

Sin embargo, debido a la necesidad de adaptar la producción animal a las nuevas demandas del consumidor, cada vez más concienciado con la producción ecológica, sería interesante sustituir la melatonina sintética por otras fuentes naturales de melatonina, como, por ejemplo, la procedente de las plantas, denominada fitomelatonina.

Los vegetales contienen fitomelatonina en concentración muy variable (38). Los niveles más elevados se han encontrado en:

- **Semillas:** mostaza (*Brassica nigra* y *Brassica hirta*), goji (*Lycium barbarum*), fenogreco (*Trigonella foenum-graecum*), almendro (*Prunus amygdalus*), girasol (*Helianthus annuus*), hinojo (*Foeniculum vulgare*) y alfalfa (*Medicago sativum*), con valores entre los 16 y 189 ng/g de materia seca (39).
- **Frutos:** tomate (*Solanum lycopersicum*, 2-114 ng/g, en función de la variedad, la parte analizada y el método de análisis), cereza (*Prunus avium*, 8-120 ng/g) y uvas (*Vitis vinifera*, 5-96 ng/g) (38).

De este modo, la posibilidad de modular los niveles de melatonina en sangre en mamíferos a través de la ingesta de estos productos es de gran interés (40). De hecho, ya existen estudios en los que se ha visto que el consumo de determinados vegetales, semillas y productos vegetales ricos en melatonina aumentan los niveles de esta hormona en sangre (41,42).

Dada la capacidad de la melatonina de atravesar la barrera hematotesticular, podríamos hipotetizar que la alimentación de moruecos con productos ricos en fitomelatonina podría tener un efecto directo sobre los espermatozoides, y con ello, sobre la actividad reproductiva de estos animales. Sin embargo, a día de hoy, apenas se encuentran estudios sobre el efecto de una dieta rica en melatonina en la reproducción de especies ganaderas.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Uno de los factores limitantes de la producción ovina es la estacionalidad reproductiva, regulada por la secreción nocturna de melatonina pineal. Esta hormona ha demostrado tener un efecto beneficioso sobre la funcionalidad de los espermatozoides de morueco cuando se añade *in vitro* (28). Para contrarrestar los efectos de la estacionalidad reproductiva, se utilizan implantes subcutáneos de melatonina, que han demostrado que mejoran la fertilidad *in vivo* de los moruecos (43), y que aumenta los niveles de las hormonas sexuales y de algunas enzimas de defensa antioxidante (36,37).

Sin embargo, dada a la necesidad de adaptar la producción animal a las nuevas demandas del consumidor, sería interesante sustituir la melatonina sintética utilizada en los implantes por otras fuentes naturales de melatonina, como, por ejemplo, la procedente de las plantas, denominada fitomelatonina, que se podría administrar con la dieta.

Por tanto, y teniendo en cuenta la capacidad de la melatonina para atravesar la barrera hematotesticular, en el presente Trabajo Fin de Máster se planteó la siguiente **hipótesis**: una dieta rica en fitomelatonina podría tener un efecto beneficioso sobre la calidad seminal de los moruecos.

De este modo, el **objetivo principal** de este trabajo consistió en evaluar el efecto del consumo de dietas ricas en fitomelatonina procedente de subproductos vegetales sobre la calidad seminal y la composición del plasma seminal del morueco. Y, para ello, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1) Evaluar el efecto de una dieta en fitomelatonina sobre la concentración de melatonina en el plasma seminal.

2) Analizar los posibles cambios en la calidad seminal de los moruecos alimentados con una dieta rica en fitomelatonina.

3) Estudiar los cambios en la actividad de las enzimas de defensa antioxidante, con el fin de determinar si la fitomelatonina actúa modulando estas enzimas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ANIMALES UTILIZADOS Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Para realizar los experimentos se utilizaron 18 moruecos de 2 años de edad de raza Rasa Aragonesa, estabulados en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Zaragoza. Los animales fueron asignados al azar en dos grupos: nueve machos fueron alimentados con un pienso comercial (grupo control), y los otros nueve fueron alimentados con una dieta conformada en un 20% por una mezcla de diversas fuentes naturales de fitomelatonina y en un 80% por pienso comercial. Los subproductos de la industria utilizados en esa mezcla fueron pulpa de granada, pulpa de tomate y orujo de uva. La dieta se mantuvo durante cinco meses (de febrero a julio).

4.1.1 Obtención de muestras seminales y extracción de plasma seminal

Las muestras seminales se obtuvieron por el método de la vagina artificial, de forma individual y cada 15 días, realizándose además una extracción de forma previa al comienzo de la dieta, en el mes 0 (febrero). Tras la recogida, las muestras se mantuvieron a 37 °C durante el transporte al laboratorio y hasta su uso.

El plasma seminal se extrajo mediante centrifugación a 20000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Tras esa primera centrifugación, el sobrenadante fue sometido a una segunda centrifugación a 20000 x g durante otros 10 minutos a 4 °C. Las muestras de plasma seminal obtenidas fueron alicuotadas y almacenadas a -20 °C hasta su análisis.

4.1.2 Obtención de muestras de sangre y extracción de plasma sanguíneo

De forma mensual, se recogieron 4 ml de sangre de cada animal mediante punción venosa de la vena yugular en tubos de vacío que contenían heparina (*BD Vacutainer* ®, Plymouth, Reino Unido) como anticoagulante. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y a 600 x g. Tras la centrifugación se recuperó el plasma sanguíneo , y se almacenó a -20 °C hasta el momento de su análisis.

4.2 EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS ESPERMÁTICAS

4.2.1 Análisis de la motilidad espermática

La determinación de la motilidad espermática se realizó mediante un sistema automatizado de análisis espermático asistido por ordenador (CASA, del inglés *Computer Assisted Semen Analysis*), con el programa ISAS 1.0.4. (*Integrated Semen Analysis System*, Proiser S.L., Valencia, España). Para esta determinación se hizo una dilución 1:100 con medio bifase (sacarosa 0,25 M, EGTA 100 mM, fosfato sódico 0,5 mM, glucosa 50 mM, HEPES 100 mM, KOH 20 mM), se colocó una gota (8 µl) en un portaobjetos y se evaluó con un microscopio de contraste de fases con objetivo 10x y conectado a una cámara (Basler A312f, Basler Vision Components, Exton, PA) y a un ordenador. Se analizaron cinco campos por gota. El programa es capaz de integrar las imágenes captadas mostrando las trayectorias de los espermatozoides y clasificándolos en función de su movimiento (estáticos o mótiles) y su velocidad (lentos, medios, rápidos). De este modo, ISAS proporciona valores de motilidad total (MT, porcentaje de espermatozoides mótiles) y de motilidad progresiva (MP, porcentaje de espermatozoides que se mueven siguiendo una trayectoria recta).

4.2.2 Estudio de la viabilidad celular (integridad de la membrana plasmática)

La viabilidad, entendida como la integridad de la membrana espermática, se valoró mediante el método descrito por Harrison y Vickers (44), conocido como la doble tinción con ioduro de propidio/diacetato de carboxifluoresceína (PI/CFDA). Esta técnica se basa en la distinta coloración que presentan los espermatozoides tras su incubación con los dos colorantes fluorescentes en función de la integridad de su membrana plasmática. Así, se consideran viables los espermatozoides teñidos de color verde, pues ello implica la presencia de esterasas intracelulares capaces de hidrolizar el diacetato de carboxifluoresceína (incoloro) a carboxifluoresceína (fluorescencia verde) y que su membrana está íntegra al presentar impermeabilidad al ioduro de propidio. Por otro lado, los espermatozoides con fluorescencia roja se consideran no viables, ya que tienen la membrana plasmática dañada y por tanto permeable

al ioduro de propidio, el cual penetra en el interior de la célula y se une al ADN, proporcionando fluorescencia roja (Figura 2.A).

Para esta evaluación, las muestras se diluyeron en el medio bifase, anteriormente descrito, a una concentración final de 5×10^6 células/ml y se añadieron 3 μl de diacetato de carboxifluoresceína (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos, 10 μM en DMSO), 3 μl de ioduro de propidio (Sigma-Aldrich, 7,3 μM en agua destilada), y 3 μl de formaldehido al 0,5 % (V/V) en agua MilliQ para la fijación de las células. Seguidamente las muestras se incubaron a 37 °C en oscuridad durante 15 minutos, y luego se evaluaron mediante un citómetro de flujo Beckman Coulter FC 500 (Beckman Coulter, Fullerton, California, Estados Unidos), que usa un láser de argón a 488 nm. La fluorescencia se detectó mediante los filtros FL1-525 \pm 5 nm (para CFDA) y FL4-675 \pm 5 nm (para IP), y se analizaron un total de 20.000 eventos, con una media de 500-1.000 eventos/segundo. Se diferenciaron cuatro subpoblaciones de espermatozoides y se consideraron los CFDA+/ IP- como viables, tal y como se muestra en la figura 2.B.

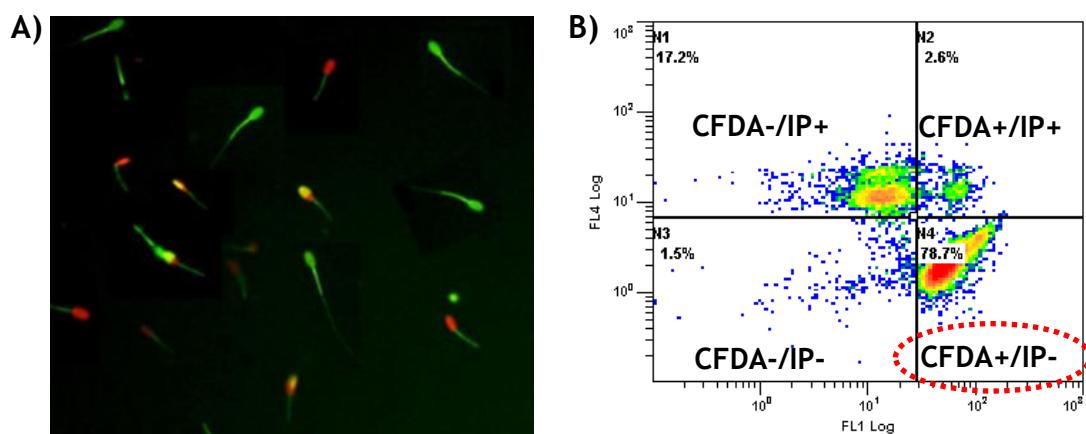


Figura 2. **A)** Imagen representativa de la doble tinción de los espermatozoides ovinos con ioduro de propido y diacetato de carboxifluoresceína, evaluada mediante microscopía de fluorescencia con filtro B-2A (filtro de excitación 450-490 nm) y aumento 400x **B)** Diagrama representativo de la integridad de membrana evaluada por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

4.2.3. Determinación de la inversión de fosfatidilserina

La fosfatidilserina (FS) es un fosfolípido que normalmente se encuentran en la cara interna de la membrana plasmática, pero en los procesos apoptóticos se transloca a la cara externa para que la célula pueda ser reconocida por los fagocitos y, por tanto, pueda ser eliminada. Por su parte, la anexina (Annex) es una proteína que muestra una alta afinidad por la FS, y se puede obtener de forma comercial unida a un fluoróforo para su detección mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. En este trabajo, se utilizó Annexin V Fluorescein Conjugate (Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos), para marcar las células que presentasen translocación de FS con fluorescencia verde, y se combinó con ioduro de propidio (IP) que, tal y como se ha explicado anteriormente, permite diferenciar células con membrana íntegra de las que tienen la membrana dañada (que son las que muestran fluorescencia roja).

De este modo, se pudieron distinguir, tal y como se muestra en la figura, cuatro poblaciones diferentes en la muestra (Figura 3): células que presentaron fluorescencia verde y roja (Anex+/IP+), y que por tanto tenían la membrana dañada y mostraban inversión de FS; células que presentaron únicamente fluorescencia verde (Anex+/IP-), que mostraban inversión de FS pero mantenían la membrana intacta; células que presentaron únicamente fluorescencia roja (Anex-/IP+), con la membrana dañada pero sin inversión de FS; y por último, células que no presentaron fluorescencia (Anex-/IP-), con la membrana intacta y sin translocación de FS. Esta última población es la que se evaluó en este trabajo.

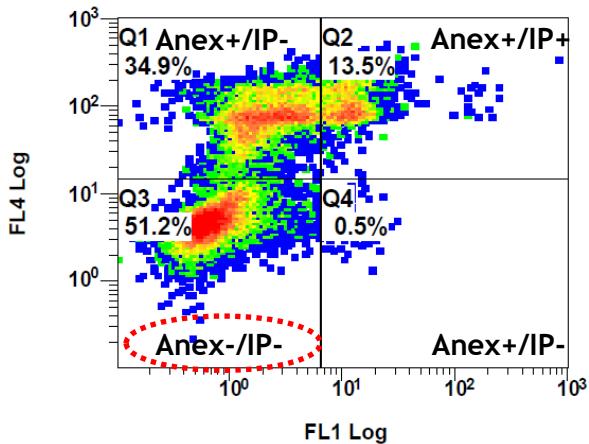


Figura 3. Diagrama representativo de la evaluación de la translocación de fosfatidilserina en la membrana espermática ovina, evaluada por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

Para este análisis, se diluyeron las muestras en el tampón proporcionado por la casa comercial (*Binding Buffer Apoptosis Detection Kit*, Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos) hasta alcanzar una concentración de 4×10^6 células/ml. Se añadió 2 μl de Annexin V y 3 μl de IP y se incubaron a 37 °C en oscuridad durante 15 minutos. Las muestras se analizaron inmediatamente mediante citometría de flujo, utilizando los filtros FL1-525 \pm 5 nm (para anexina) y FL4-675 \pm 5 nm (para IP), tal y como se ha descrito en el apartado 4.2.2.

4.2.4 Estudio de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Los niveles de especies reactivas de oxígeno se evaluaron mediante el uso de 2',7'-dclorohidrofluorescein-diacetato (H₂DCFDA), un colorante capaz de atravesar la membrana plasmática del espermatozoide y penetrar en el interior celular, donde es hidrolizado por esterasas intracelulares a 2',7'-dclorodihidrofluoresceína (H₂DCF), que es no permeable y no fluorescente. Posteriormente, este compuesto es oxidado por H₂O₂ a dclorofluoresceína (DCF), que emite fluorescencia a 530 nm tras su excitación a 488 nm (45). Este colorante se utilizó en combinación con yoduro de propidio (IP) que, recordemos, permite discriminar entre células viables y no viables.

Para esta evaluación, las muestras se diluyeron a una concentración de 5×10^6 células/ml en medio bifase y se incubaron con 5 μl de H₂DCFDA 10 μM

y 3 μ l de IP 1,5 mM durante 15 minutos a 37 °C en oscuridad, y se fijaron con 5 μ l de formaldehído al 0,5 % (V/V) en agua MilliQ. Pasado ese tiempo, las muestras se analizaron por citometría de flujo mediante los filtros FL1-525 \pm 5 nm (para H₂DCFDA) y FL4-675 \pm 5 nm (para IP). En este trabajo se evaluaron las células H₂DCFDA-/IP-, que corresponde a espermatozoides viables con bajos niveles de ROS.

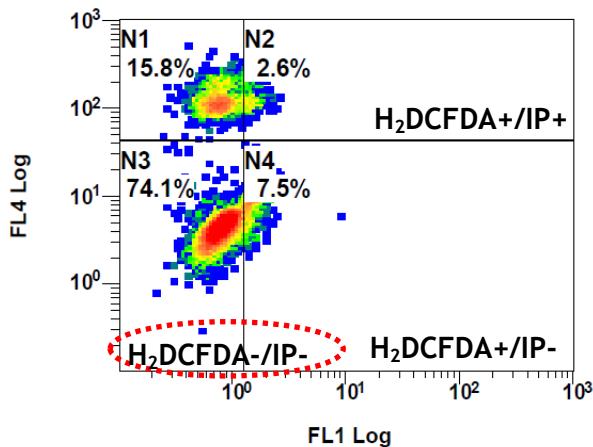


Figura 4. Diagrama representativo de las poblaciones obtenidas en la evaluación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) por citometría de flujo, utilizando los fotodetectores FL1 y FL4.

4.3 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MELATONINA EN PLASMA SEMINAL

La concentración de melatonina en plasma seminal fue evaluada utilizando un inmunoensayo comercial de tipo competitivo (*Direct saliva melatonin ELISA kit*, Bühlmann Laboratories AG, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se colocaron 100 μ l de cada muestra, así como de los controles y los estándares, por duplicado en los pocillos correspondientes de una placa de 96 pocillos recubiertos con un anticuerpo anti-melatonina y se dejó incubar durante 16-20 horas a 2-8 °C. Tras la incubación, se añadieron 50 μ l de melatonina biotinilada a los pocillos y se incubó durante tres horas a 2-8 °C. Pasado ese tiempo, se realizaron tres lavados, y tras los lavados se añadieron 100 μ l de estreptavidina conjugada a peroxidasa (HRP). Se incubó durante más de 60 minutos en un agitador a 600 rpm a 18-28 °C. Posteriormente, se realizaron otros tres lavados y se añadieron 100 μ l de TMB (tetrametilbenzidine) a los pocillos. La placa se incubó protegida de la luz

durante 30 minutos a 18-28 °C y pasado ese tiempo se añadieron 100 µl de una solución de H₂SO₄ 0,25 M a cada pocillo. Por último, se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas de ELISA (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania).

4.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

4.4.1 Glutatión reductasa (GRD, EC.1.6.4.2)

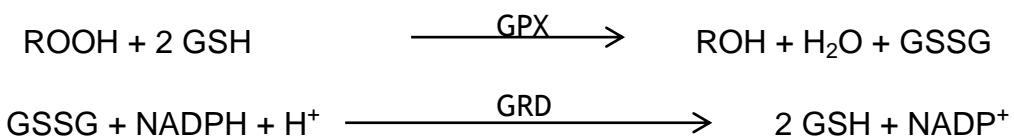
La actividad de la glutatión reductasa se midió cuantificando la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADPH, como consecuencia de la reducción del glutatión oxidado (GSSG):



Las mediciones se realizaron siguiendo el protocolo anteriormente descrito por nuestro grupo de investigación (37). Todas las muestras se cargaron por duplicado. La mezcla de reacción contenía un tampón Na₃PO₄ 501,38 mM, pH 7,2, EDTA 0,5 mM, NADPH⁺ + H⁺ 85 µM, GSSG 0,8 mM y 5 µl de cada muestra de plasma sanguíneo o seminal (volumen final en cada pocillo: 200 µl). El cambio en absorbancia producido a 340 nm se monitorizó durante 3 minutos en un lector de microplacas de absorbancia (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania).

4.4.2 Glutatión peroxidasa (GPX, EC.1.11.1.9)

La actividad de esta enzima se midió siguiendo la oxidación del glutatión (GSH) utilizando como aceptor de electrones al ter-butilhidroperóxido (t-BuO₂H), de acuerdo a la siguiente reacción:



La evaluación se realizó usando el protocolo anteriormente descrito por nuestro grupo de investigación (46) basado en el descrito por Paglia y Valentine (47). La mezcla de reacción contenía un tampón Na₃PO₄ 501,38 mM, pH 7,2, EDTA 0,5 mM, NADPH⁺ + H⁺ 85 µM, GRD 54 mUI, GSH 2 Mm,

t-BuO₂H 1,2 mM y 6 µl de muestras de plasma sanguíneo o seminal (volumen final en cada pocillo 200 µl). El cambio en absorbancia producido a 340 nm se monitorizó durante 3 minutos en un lector de microplacas de absorbancia (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania).

4.4.3 Catalasa (CAT, EC.1.11.1.6)

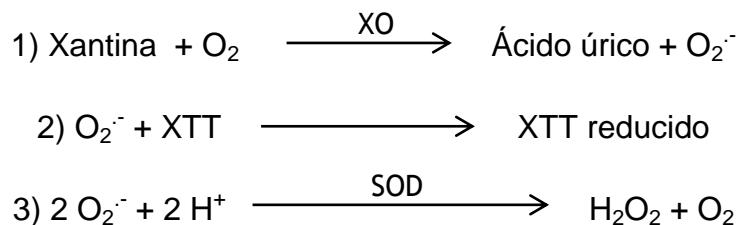
La actividad enzimática de la catalasa se analizó en una placa de cuarzo midiendo la disminución de la absorbancia a 240 nm debido a la reducción de H₂O₂ a H₂O y O₂ en presencia de dicha enzima.



La mezcla de reacción contenía un tampón Na₃PO₄ 62,5 mM, pH 7, H₂O₂ 200 mM y 4 µl de muestras de plasma seminal (volumen final en cada pocillo 200 µl). Y el cambio en absorbancia producido a 240 nm se monitorizó durante dos minutos en un lector de microplacas de absorbancia (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania).

4.4.4 Superóxido dismutasa (SOD, EC.1.15.1.1)

Por último, la actividad de SOD se evaluó como la disminución de la velocidad de la reacción de reducción del XTT por el anión superóxido (O₂⁻) producido por la enzima xantina oxidasa (XO). Como podemos ver, las reacciones 2 y 3 compiten por el anión superóxido, de modo que una menor tasa de reducción del XTT (reacción 2) puede entenderse como un aumento de la actividad de la SOD, que cataliza la reacción 3.



La mezcla de reacción está formada por tampón Na₃PO₄ 40,5 mM, pH 7,8, xantina 0,99 mM, xantina oxidasa 0,15 mUI, XTT 30 mM, y 10 µl de

muestras de plasma sanguíneo (volumen final en cada pocillo 200 µl). Y el cambio en absorbancia producido a 470 nm se monitorizó durante tres minutos en un lector de microplacas de absorbancia (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania).

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados presentados en este trabajo se muestran como la media ± S.E.M. (error estándar de la media) del número de muestras indicadas para cada caso. El análisis estadísticos de los datos se realizó con el software IBM SPSS (IBM Statistical Package for the Social Sciences, Armonk, Nueva York, Estados Unidos). Las diferencias se evaluaron mediante la prueba U de Mann-Whitney, tras haber analizado la normalidad de los datos de las variables estudiadas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 EFECTOS DE LA DIETA RICA EN FITOMELATONINA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE MELATONINA EN PLASMA SEMINAL

En primer lugar, se analizó la concentración de melatonina en plasma seminal y se observó un aumento de los niveles de esta hormona en las muestras de moruecos alimentados con fitomelatonina a partir del segundo mes respecto a las muestras del grupo control, aunque ese aumento no resultó estadísticamente significativo (Figura 5).

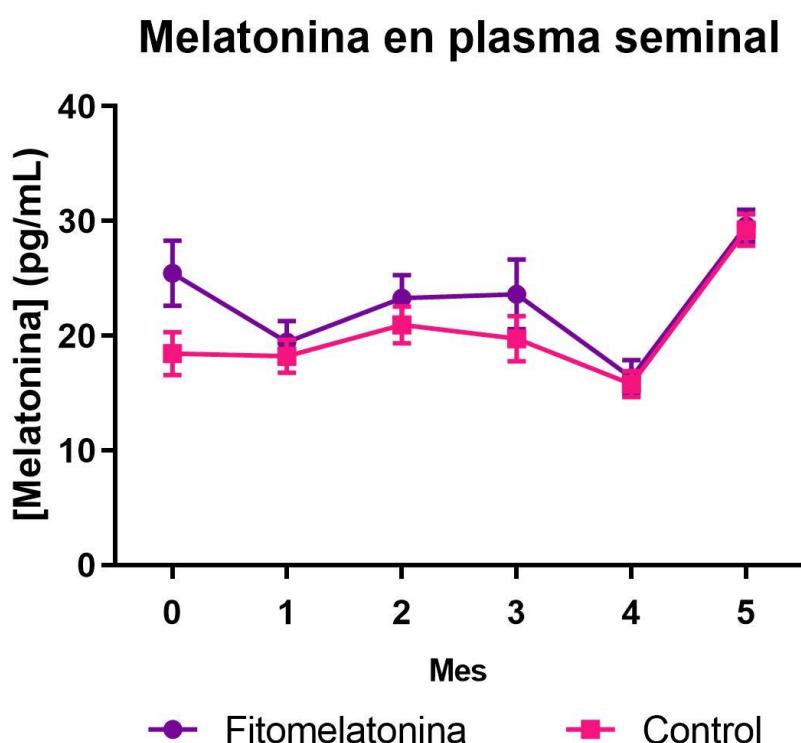


Figura 5. Variaciones mensuales de los niveles de melatonina en plasma seminal de animales alimentados con una dieta rica en fitomelatonina (●) y en muestras de animales alimentados con una dieta control (■). Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (n=9).

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación demostraron que el tratamiento con implantes subcutáneos de melatonina aumentaba los niveles de melatonina del plasma seminal en ovino durante la estación no reproductiva

(37). En otro estudio, realizado con razas ovinas distintas (Poll Dorset y Merina), se observó además que los implantes subcutáneos de melatonina aumentaban no solo los niveles de la hormona en plasma seminal, sino también en sangre (48). De este modo, y teniendo en cuenta la facilidad con la que la melatonina se distribuye por los tejidos (49), podríamos hipotetizar que la administración oral de melatonina a través de la dieta aumentaría los niveles de melatonina en sangre, y por tanto también en el plasma seminal. Sin embargo, la concentración de melatonina administrada a través de implantes subcutáneos es mucho mayor que la se puede aportar a través de subproductos alimentarios (38), lo que podría explicar la falta de significación estadística de nuestros resultados. Es posible que el aumento de la concentración de melatonina inducida por la dieta sea superior en plasma sanguíneo que en plasma seminal (33), por lo que, para comprobar esta hipótesis se extrajeron muestras de sangre de los animales de ambos grupos con el fin de analizar los niveles de la hormona en este fluido. Sin embargo, todavía no se dispone de estos resultados.

5.2 EFECTO DE UNA DIETA RICA EN FITOMELATONINA SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA

En segundo lugar, para determinar los posibles efectos de la dieta rica en fitomelatonina sobre la calidad de las muestras espermáticas, se evaluaron los cambios en la motilidad total y progresiva, la integridad de membrana plasmática y en determinados parámetros de apoptosis y en los niveles de ROS.

5.2.1 Efecto sobre la motilidad

Al analizar la motilidad espermática se observó, por un lado, un aumento del porcentaje de espermatozoides móviles totales en las muestras procedentes de animales alimentados con una dieta rica en fitomelatonina respecto de las muestras procedentes del grupo control, tal y como se aprecia en la figura 6.A, si bien esas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, ese aumento no se observó al analizar la motilidad progresiva de las muestras (Figura 6.B). Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que se

había visto que la adición de melatonina *in vitro* a muestras seminales no alteraba significativamente la motilidad (28).

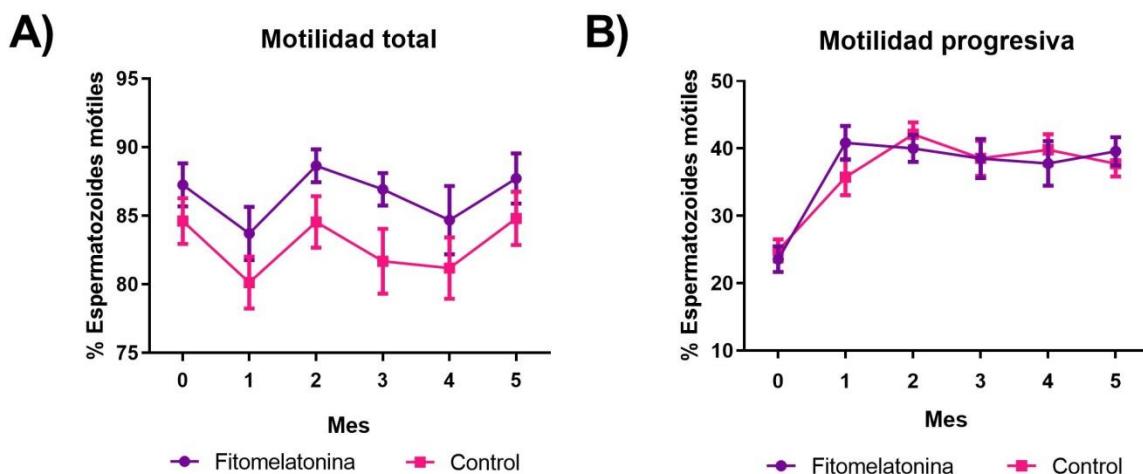


Figura 6. Porcentaje de espermatozoides mótiles (A) y mótiles progresivos (B) en muestras seminales de moruecos alimentados con una dieta rica en fitomelatonina (—●—) o con una dieta control (—■—). Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (n=18).

5.2.2 Efecto sobre la viabilidad

Por otro lado, al evaluar la viabilidad (integridad de membrana plasmática) se observaron diferencias significativas a partir del primer mes de consumo (mes 1, $P < 0,05$; mes 5, $P < 0,01$ y meses 2, 3 y 4 $P < 0,001$) en las muestras procedentes de animales alimentados con una dieta rica en fitomelatonina en comparación con las muestras procedentes de animales alimentados con la dieta control, tal y como se observa en la figura 7. La mayor parte de los trabajos sobre el efecto de la melatonina exógena sobre la viabilidad espermática ovina se han realizado en espermatozoides criopreservados (50), o con la hormona añadida *in vitro* (51), por lo que este trabajo sugeriría que una dieta rica en fitomelatonina podría mejorar la integridad de la membrana espermática.

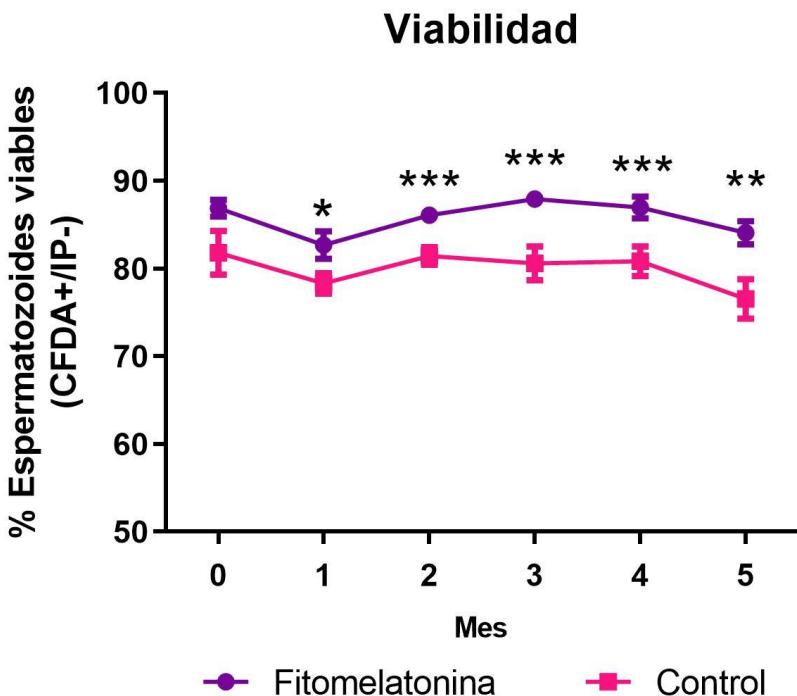


Figura 7. Porcentaje de espermatozoides viables (CFDA+/IP-) en muestras seminales de moruecos alimentados con una dieta rica en fitomelatonina (●) o con una dieta control (■). Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (n=18). * P < 0,05, ** P < 0,01 y *** P < 0,001 .

En este trabajo también se observó una ligera disminución de la viabilidad en ambos grupos entre las muestras obtenidas a tiempo cero, (antes de iniciar la dieta) y el primer mes. Esta disminución podría explicarse como una respuesta fisiológica de los animales al estrés, inducido por el cambio de jaula y ambiente, pues se sabe que los cambios producidos en el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA) como consecuencia de un estrés (estrés negativo) pueden alterar también el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (52).

5.2.3 Efecto sobre la inversión de fosfatidilserina de la membrana plasmática

Al analizar la inversión de fosfatidilserina, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides viables sin inversión de este fosfolípido entre las muestras procedentes de ambos grupos (Figura 8). A pesar de que la melatonina *in vitro* tiene efecto antiapoptótico en los

espermatozoides de distintas especies (53,54), incluida la ovina (28), su administración por vía oral no parece influir en este parámetro.

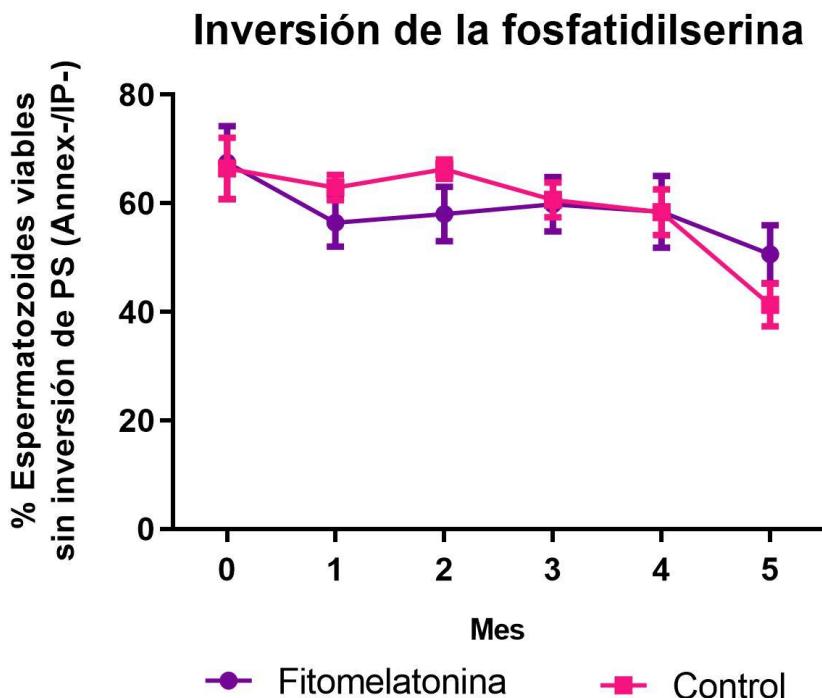


Figura 8. Porcentaje de espermatozoides viables sin inversión de fosfatidilserina (Annex-/IP-) en muestras seminales de moruecos alimentados con una dieta rica en fitomelatonina (●) o con una dieta control (■). Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (n=18).

5.2.4 Efecto sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)

No obstante, al evaluar los efectos de la dieta sobre los niveles de ROS, se observó un aumento significativo ($P < 0,01$) del porcentaje de espermatozoides viables con bajos niveles de ROS a partir del segundo mes de experimento en las muestras procedentes de moruecos alimentados con la dieta rica en fitomelatonina, en comparación con los moruecos del grupo control, tal y como muestra la figura 9. Esta diferencia fue aumentando los meses posteriores, y se mantuvo hasta el final del experimento.

Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

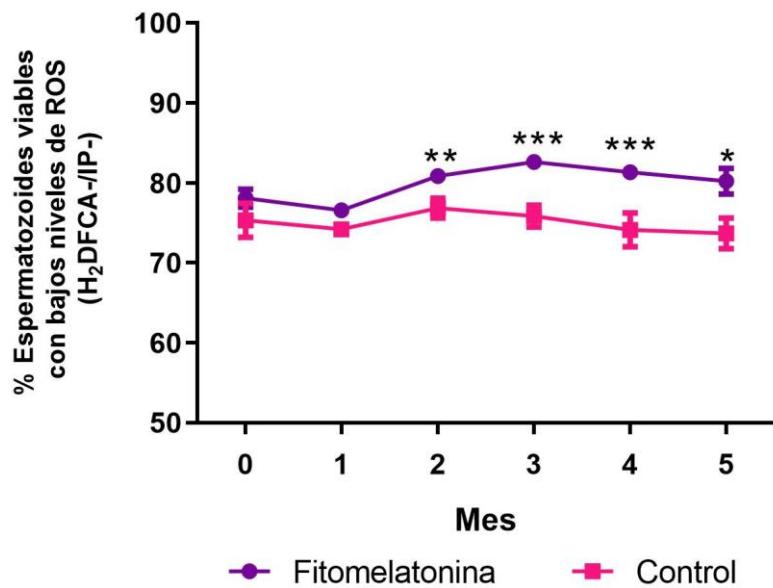


Figura 9. Porcentaje de espermatozoides viables con bajos niveles de ROS (H₂DCFDA- / IP-) en muestras seminales de moruecos alimentados con una dieta rica en fitomelatonina (●) o con una dieta control (■). Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (n=18). * P < 0,05, ** P < 0,01 y *** P < 0,001.

Se ha documentado que la incubación de muestras espermáticas con melatonina *in vitro* reduce el daño por estrés oxidativo causado por ROS (29,55). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la melatonina, añadida a muestras incubadas en condiciones capacitantes (39 °C, 5 % CO₂, 100% humedad) y en medios con sustancias elevadoras del AMPc (adenosín monofosfato cíclico), necesario para lograr la capacitación de los espermatozoides ovinos *in vitro*, es capaz de disminuir los niveles de ROS cuando se añade a concentraciones de 10 nM y 1 μM, y por tanto evitar parcialmente la capacitación espermática (56). Esa disminución de ROS también la observamos aquí en el grupo alimentado con fitomelatonina. En base a estos resultados, podríamos hipotetizar que una dieta rica en fitomelatonina protegería del daño oxidativo de la misma forma que cuando se añade *in vitro* a las muestras seminales y aumentando así el porcentaje de espermatozoides viables con bajos niveles de ROS. La melatonina podría

ejercer esa acción bien de forma directa, atravesando la membrana plasmática de los espermatozoides y actuando como molécula antioxidante (55); a través de su interacción con receptores específicos de membrana, denominados MT₁ y MT₂, con la que se activan cascadas de señalización mediadas por segundos mensajeros que pueden derivar en una disminución de los niveles de especies reactivas de oxígeno (57); o bien de forma indirecta, modulando la actividad de las enzimas antioxidantes (58).

5.3 EFECTO DE UNA DIETA RICA EN FITOMELATONINA SOBRE LAS ENZIMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Tras observar que los moruecos alimentados con una dieta rica en melatonina de origen vegetal presentaban un aumento en el porcentaje de espermatozoides con bajos niveles de ROS, y que este aumento no se debía únicamente a una mejora de la viabilidad, ya que no observamos ningún efecto sobre el porcentaje de espermatozoides viables sin inversión de la fosfatidilserina, hipotetizamos que la melatonina presente en la dieta protegería frente al daño oxidativo disminuyendo los niveles de ROS intracelulares. No obstante, quedaba por determinar su mecanismo de acción. Para identificar una posible acción indirecta de la melatonina sobre el daño oxidativo a través de la modulación de la actividad las enzimas antioxidantes, se analizó la actividad de la catalasa (CAT), glutatión reductasa (GRD) y glutatión peroxidasa (GPX) tanto en plasma sanguíneo como en plasma seminal. Además, se valoró la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) únicamente en plasma sanguíneo, ya que el proceso de congelación utilizado para la conservación de las muestras provocó su inactivación en las muestras de plasma seminal.

Sin embargo, cuando se analizaron las actividades de las enzimas CAT, GRD y GPX, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo alimentado con una dieta rica en fitomelatonina y el grupo control, ni en las enzimas del plasma sanguíneo (Figura 10) ni en las presentes en el plasma seminal (Figura 11). Del mismo modo, tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos cuando se valoró la actividad de la SOD del plasma sanguíneo (Figura 11).

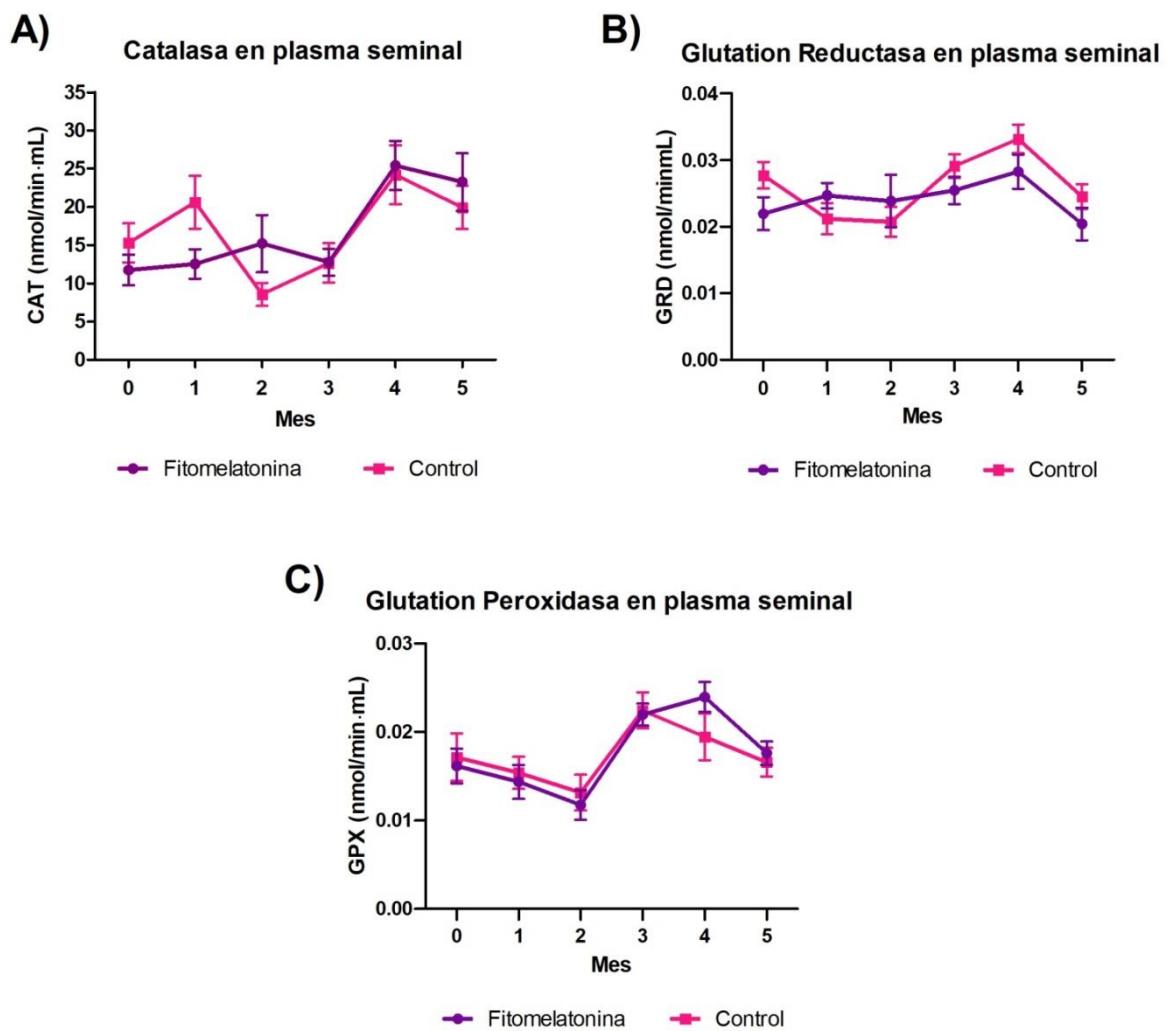


Figura 10. Actividades enzimáticas de la catalasa (**A**), la glutatiación reductasa (**B**) y la glutatiación peroxidasa (**C**) presentes en muestras de plasma seminal de moruecos alimentados con una dieta rica en fitomelatonina (●) o con una dieta control (■). Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (n=18).

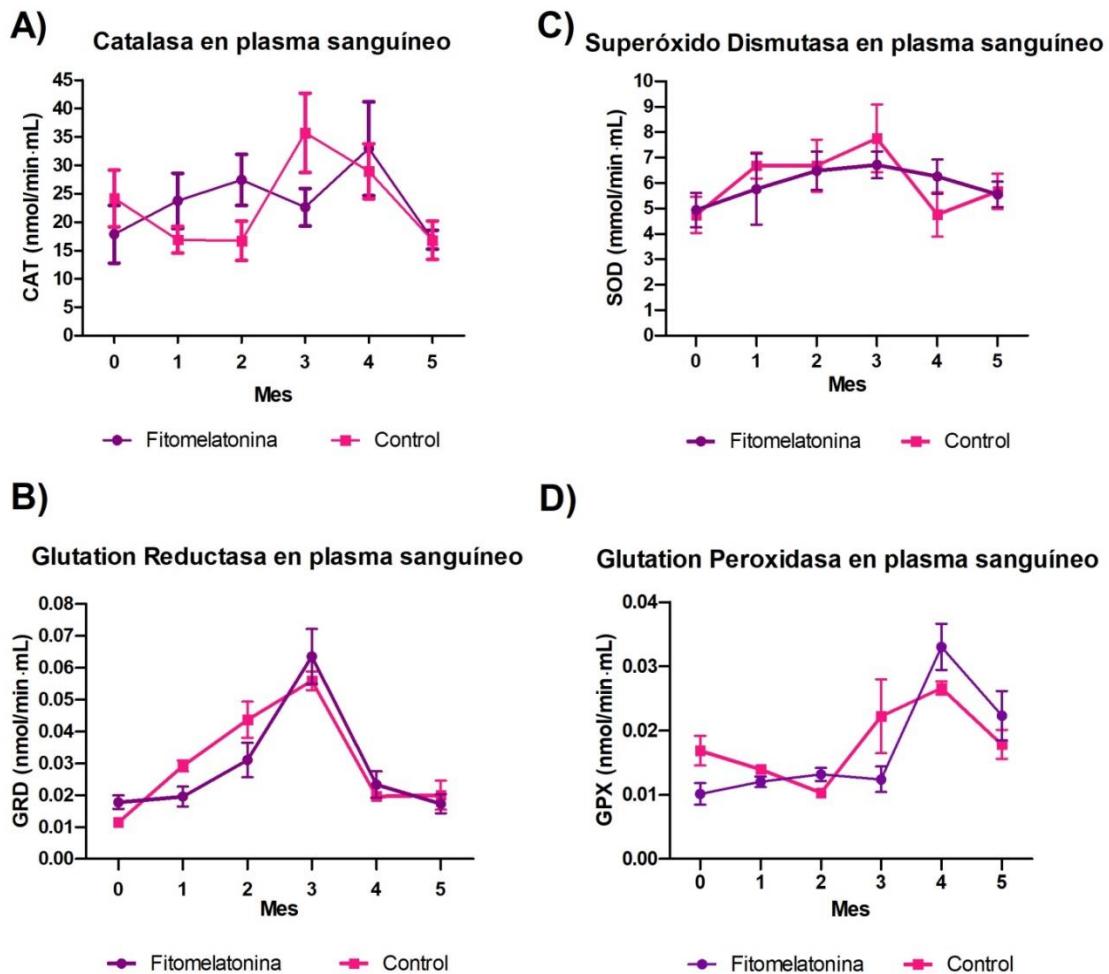


Figura 11. Variaciones mensuales de las actividades de la catalasa (**A**), la superóxido dismutasa (**B**), la glutación reductasa (**C**) y la glutación peroxidasa (**D**) presentes en muestras de sangre de animales alimentados con una dieta rica en fitomelatonina (●) y en muestras de animales alimentados con una dieta control (■). Los valores se muestran como media ± error estándar de la media (n=9).

Parte de estos resultados concuerdan con los descritos anteriormente por nuestro grupo de investigación. En concreto, cuando se analizó la actividad de la CAT en muestras seminales de animales tratados con implantes subcutáneos de melatonina en época no reproductiva, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los animales tratados y los animales del grupo control (37). Sin embargo, en ese mismo trabajo, también se observó un aumento de la actividad enzimática de GPX y GRD en el plasma seminal de los

animales a los que se les implantó melatonina de forma subcutánea respecto de los animales control, aumento que no se observa al alimentar a los animales con fitomelatonina. Dado que los implantes de melatonina inducen un aumento de la concentración de la misma en plasma seminal muy superior al observado en este trabajo (37), es posible que una dieta rica en fitomelatonina no sea capaz de aumentar los niveles de esta hormona hasta los niveles necesarios para mejorar la actividad de las enzimas antioxidantes.

En cuanto a las actividad de las enzimas antioxidantes en el plasma sanguíneo, y pese a que en este estudio no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos estudiados, cabe destacar que en la especie humana se ha descrito recientemente que tomar suplementos de melatonina aumenta la actividad de la enzima GPX en plasma sanguíneo, protegiendo así del daño oxidativo causado por el ejercicio de alta intensidad (59).

De este modo, al no detectarse cambios en la actividad de las enzimas de defensa antioxidante ni en plasma seminal ni en plasma sanguíneo, la melatonina ejercería su acción antioxidante en los animales alimentados con una dieta rica en fitomelatonina modulando los niveles de especies reactivas de oxígeno de manera directa, bien atravesando la membrana plasmática y captando esas moléculas de ROS o, tal vez, a través de sus receptores de membrana. Este mecanismo concuerda con el observado para la melatonina añadida *in vitro* a muestras de espermatozoides humanos (29), en muestras de semen de verraco (55) y en muestras humanas sometidas a criopreservación (60).

Finalmente, en base a los resultados obtenidos, todo parece apuntar a que la dieta rica en melatonina vegetal mejora la viabilidad espermática y protegería a los espermatozoides ovinos frente al daño oxidativo disminuyendo los niveles de ROS en las células de forma directa. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales la fitomelatonina de la dieta ejerce esta acción se desconocen. Tampoco podemos descartar que otros antioxidantes presentes en los subproductos utilizados en la dieta estén contribuyendo de forma sinérgica con la fitomelatonina a producir este efecto, pues los polifenoles y las antocianinas de la granada han demostrado tener una potente

actividad antioxidante (61), al igual que el licopeno, ácido ascórbico, vitamina E y flavonoides del tomate (62) y las catequinas, flavonoles, ácido benzoico y ácido cinámico del orujo de uva (63).

6. CONCLUSIONES

- 1) La dieta rica en fitomelatonina produjo un aumento de la concentración de melatonina en plasma seminal de los moruecos a partir del segundo mes de tratamiento, en comparación con el grupo control, aunque este aumento no fue estadísticamente significativo.
- 2) La dieta rica en fitomelatonina produjo un aumento significativo del porcentaje de espermatozoides viables y espermatozoides viables con bajos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) a partir del segundo mes de alimentación, en comparación con el grupo control. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides mótiles, mótiles progresivos ni en el porcentaje de espermatozoides viables sin inversión de la fosfatidilserina.
- 3) El aumento del porcentaje de espermatozoides viables con bajos niveles de ROS no se relacionó con cambios en la actividad de las enzimas de defensa antioxidante de plasma sanguíneo o plasma seminal, lo que sugiere que la fitomelatonina disminuiría los niveles intracelulares de ROS de los espermatozoides de forma directa, y no a través de la modulación de enzimas antioxidantes.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. "Caracterización del sector ovino y caprino en España" Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. [Internet]. [citado 26 de enero de 2021]. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/caracterizaciondelsectorovinoycaprinoenespana2018_tcm30-380879.pdf
2. Análisis de la evolución del sector ovino español. Impacto de los regímenes de ayudas y estrategias a impulsar (2006-2012), Subdirección General de Productos Ganaderos, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. [Internet]. [citado 26 de enero de 2021]. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/An%C3%A1lisis%20de%20la%20evoluci%C3%B3n%20del%20sector%20ovino%20espa%C3%B1ol_tcm30-58889.pdf
3. Gómez-Sal A. Aspectos Ecológicos de los sistemas agrícolas. Las dimensiones del desarrollo. Agroecología y Desarrollo. 2000. :29.
4. Millennium Ecosystem Assessment (MA) Ecosystems and Human Well-Being: Synthesis. Island Press, Washington (DC); 2005.
5. Groot R, Wilson M, Boumans R. A Typology for the Classification Description and Valuation of Ecosystem Functions, Goods and Services. Ecol Econ. 2002;41.
6. Ripoll-Bosch R, de Boer IJM, Bernués A, Vellinga TV. Accounting for multi-functionality of sheep farming in the carbon footprint of lamb: A comparison of three contrasting Mediterranean systems. Agricultural Systems. 2013;116:60-8.
7. Rodríguez-Ortega T, Bernués A, Olaizola AM, Brown MT. Does intensification result in higher efficiency and sustainability? An energy analysis of Mediterranean sheep-crop farming systems. Journal of Cleaner Production. 2017;144:171-9.

8. Ripoll-Bosch R, Díez-Unquera B, Ruiz R, Villalba D, Molina E, Joy M, et al. An integrated sustainability assessment of mediterranean sheep farms with different degrees of intensification. *Agricultural Systems*. 2012;105(1):46-56.
9. Slominski A, Tobin DJ, Zmijewski MA, Wortsman J, Paus R. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol Metab*. 2008;19(1):17-24.
10. Smith MD, Baker PC. The maturation of melatonin synthesis in the lateral eyes of the mouse. *Comparative and General Pharmacology*. 1974;5(3):275-7.
11. Huether G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia*. 1993;49(8):665-70.
12. Brzezinski A, Seibel MM, Lynch HJ, Deng MH, Wurtman RJ. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987;64(4):865-7.
13. Gonzalez-Arto M, Luna C, Pérez-Pé R, Muñoz-Blanco T, Cebrián-Pérez JA, Casao A. New evidence of melatonin receptor contribution to ram sperm functionality. *Reprod Fertil Dev*. 2016;28(7):924-35.
14. Yu H, Dickson EJ, Jung S-R, Koh D-S, Hille B. High membrane permeability for melatonin. *J Gen Physiol*. 2016;147(1):63-76.
15. Martínez B, Sánchez Y, Urra K, Daymara Y, Burgos JL. Hormona de la oscuridad. *Rev Latinoamer Patol Clin*. 2012;59(4):222-32.
16. Tan D-X, Hardeland R, Manchester LC, Paredes SD, Korkmaz A, Sainz RM, et al. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2010;85(3):607-23.
17. McGuire NL, Kangas K, Bentley GE. Effects of melatonin on peripheral

- reproductive function: regulation of testicular GnIH and testosterone. *Endocrinology*. 2011;152(9):3461-70.
18. Rosa HJD, Bryant MJ. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*. 2003;48(3):155-71.
 19. Chemineau P, Malpaux B, Delgadillo JA, Guérin Y, Ravault JP, Thimonier J, et al. Control of sheep and goat reproduction: Use of light and melatonin. *Animal Reproduction Science*. 1992;30(1):157-84.
 20. Ebling F, Hastings M. The neural basis of seasonal reproduction. *Annales de zootechnie*. 1992;41(3-4):239-46.
 21. Malpaux B, Thiéry JC, Chemineau P. Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod Nutr Dev*. 1999;39(3):355-66.
 22. Malpaux B, Viguié C, Skinner DC, Thiéry JC, Chemineau P. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res Bull*. 1997;44(4):431-8.
 23. Misztal T, Romanowicz K, Barcikowski B. Effect of melatonin on daily LH secretion in intact and ovariectomized ewes during the breeding season. *Anim Reprod Sci*. 2002;69(3-4):187-98.
 24. Casao A, Cebrián I, Asumpção ME, Pérez-Pé R, Abecia JA, Forcada F, et al. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8:59.
 25. Ortiz A, Espino J, Bejarano I, Lozano GM, Monllor F, García JF, et al. High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility. *J Pineal Res*. 2011;50(2):132-9.
 26. Fujinoki M. Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction*. 2008;136(5):533-41.
 27. Di Francesco S, Mariotti E, Tsantarliotou M, Sattar A, Venditto I, Rubessa

- M, et al. Melatonin promotes in vitro sperm capacitation in buffalo (*Bubalus bubalis*) Abstract No. 311. Reproduction Fertility and Development. 1 de 2010;22:311-2.
28. Casao A, Mendoza N, Pérez-Pé R, Grasa P, Abecia J-A, Forcada F, et al. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *J Pineal Res.* 2010;48(1):39-46.
 29. du Plessis SS, Hagenaar K, Lampiao F. The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. *Andrologia.* 2010;42(2):112-6.
 30. Cai J, Jones DP. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem.* 1998;273(19):11401-4.
 31. Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction.* 2013;146(5):R163-174.
 32. Luna C, Mendoza N, Casao A, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways link capacitation with apoptosis and seminal plasma proteins protect sperm by interfering with both routes†. *Biol Reprod.* 2017;96(4):800-15.
 33. Kennaway DJ, Seemark RF. Circulating levels of melatonin following its oral administration or subcutaneous injection in sheep and goats. *Aust J Biol Sci.* 1980;33(3):349-53.
 34. Arendt J, Symons AM, Laud CA, Pryde SJ. Melatonin can induce early onset of the breeding season in ewes. *J Endocrinol.* 1983;97(3):395-400.
 35. Ronayne E, Jordan B, Quirke JF, Roche JF. The effect of frequency of administration of melatonin on the time of onset of the breeding season in anoestrous ewes. *Animal Reproduction Science.* 1989;18(1):13-24.
 36. Rekik M, Taboubi R, Ben Salem I, Fehri Y, Sakly C, Lassoued N, et al. Melatonin administration enhances the reproductive capacity of young

- rams under a southern Mediterranean environment. *Anim Sci J.* 2015;86(7):666-72.
37. Casao A, Pérez-Pé R, Abecia JA, Forcada F, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JÁ. The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defence system of Rasa Aragonesa rams. *Anim Reprod Sci.* 2013;138(3-4):168-74.
 38. Arnao M. Phytomelatonin: Discovery, Content, and Role in Plants. *Advances in Botany.* 2014;e815769.
 39. Manchester LC, Tan DX, Reiter RJ, Park W, Monis K, Qi W. High levels of melatonin in the seeds of edible plants: possible function in germ tissue protection. *Life Sci.* 2000;67(25):3023-9.
 40. Reiter RJ, Tan D-X, Manchester LC, Simopoulos AP, Maldonado MD, Flores LJ, et al. Melatonin in edible plants (phytomelatonin): Identification, concentrations, bioavailability and proposed functions. *World Rev Nutr Diet.* 2007;97:211-30.
 41. Hattori A, Migitaka H, Iigo M, Itoh M, Yamamoto K, Ohtani-Kaneko R, et al. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem Mol Biol Int.* 1995;35(3):627-34.
 42. Reiter RJ, Manchester LC, Tan D. Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition.* 2005;21(9):920-4.
 43. Palacín I, Abecia J-A, Forcada F, Casao A, Cebrián J-Á, Muiño T, et al. Effects of exogenous melatonin treatment on out-of-season ram fertility. *Italian Journal of Animal Science.* 2008;7(2):199-206.
 44. Harrison RA, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1990;88(1):343-52.

45. Guthrie HD, Welch GR. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci.* 2006;84(8):2089-100.
46. Martí E, Mara L, Martí JI, Muñoz-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology.* 2007;67(9):1446-54.
47. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70(1):158-69.
48. Pool KR, Rickard JP, Pini T, de Graaf SP. Exogenous melatonin advances the ram breeding season and increases testicular function. *Sci Rep [Internet].* [citado 4 de abril de 2021];10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7297710/>
49. Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, et al. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Curr Neuropharmacol.* 2017;15(3):434-43.
50. Kaya A, Aksoy M, Baspınar N, Yıldız C, Ataman MB. Effect of melatonin implantation to sperm donor rams on post-thaw viability and acrosomal integrity of sperm cells in the breeding and non-breeding season. *Reprod Domest Anim.* 2001;36(3-4):211-5.
51. Succu S, Berlinguer F, Pasciu V, Satta V, Leoni GG, Naitana S. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *J Pineal Res.* 2011;50(3):310-8.
52. Wingfield JC, Sapolsky RM. Reproduction and resistance to stress: when and how. *J Neuroendocrinol.* 2003;15(8):711-24.
53. da Silva CMB, Macías-García B, Miró-Morán A, González-Fernández L, Morillo-Rodríguez A, Ortega-Ferrusola C, et al. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. *J Pineal*

Res. 2011;51(2):172-9.

54. Konakchieva R, Todorov P. Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor- and extracellular signal-regulated kinase-mediated pathways. *Fertil Steril*. 2011;96(4):e159.
55. Jang HY, Kim YH, Kim BW, Park IC, Cheong HT, Kim JT, et al. Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Reprod Domest Anim*. 2010;45(6):943-50.
56. Gimeno-Martos S, Casao A, Yeste M, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Pérez-Pé R. Melatonin reduces cAMP-stimulated capacitation of ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 2019;31(2):420-31.
57. Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, et al. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J*. 2010;24(10):3603-24.
58. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*. 2004;36(1):1-9.
59. Ortiz-Franco M, Planells E, Quintero B, Acuña-Castroviejo D, Rusanova I, Escames G, et al. Effect of Melatonin Supplementation on Antioxidant Status and DNA Damage in High Intensity Trained Athletes. *Int J Sports Med*. 2017;38(14):1117-25.
60. Najafi A, Adutwum E, Yari A, Salehi E, Mikaeili S, Dashtestani F, et al. Melatonin affects membrane integrity, intracellular reactive oxygen species, caspase3 activity and AKT phosphorylation in frozen thawed human sperm. *Cell Tissue Res*. 2018;372(1):149-59.
61. Sharma P, McClees SF, Afaq F. Pomegranate for Prevention and Treatment of Cancer: An Update. *Molecules* [Internet]. [citado 4 de junio de 2021];22(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5560105/>

62. Frusciante L, Carli P, Ercolano MR, Pernice R, Di Matteo A, Fogliano V, et al. Antioxidant nutritional quality of tomato. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(5):609-17.
63. Cotoras M, Vivanco H, Melo R, Aguirre M, Silva E, Mendoza L. In Vitro and in Vivo Evaluation of the Antioxidant and Prooxidant Activity of Phenolic Compounds Obtained from Grape (*Vitis vinifera*) Pomace. *Molecules*. 2014;19(12):21154-67.

8. ANEXOS



Avda. Montañana, 930
50059 - ZARAGOZA (España)
Tfno.: (34) 976 71 63 05
Fax: (34) 976 71 63 35
NIF: G-50202530

D. Daniel Villalba Mata, Secretario de las XIX Jornadas sobre Producción Animal (online) organizadas por la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA),

CERTIFICA:

Que la comunicación titulada **EFFECTO DEL CONSUMO DE DIETAS RICAS EN FITOMELATONINA EN LA REPRODUCCIÓN DE MORUECOS** cuyos autores son Peña-Delgado, V., Carvajal-Serna, M., Miguel-Jiménez, S., Abecia J.A., Fondevila, M., Pérez-Pe, R y Casao, A. ha sido presentada en formato Oral en las **XIX Jornadas sobre Producción Animal (online)**, organizadas por la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario, durante los días 1 y 2 de junio de 2021 con sede en Zaragoza.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Zaragoza, a 2 de junio de 2021.



- Daniel Villalba Mata -

e-mail: jornadasaida2021@aida-itea.org
<http://www.aida-itea.org>



EFFECTO DEL CONSUMO DE DIETAS RICAS EN FITOMELATONINA EN LA REPRODUCCIÓN DE MORUECOS

Peña-Delgado¹, V., Carvajal-Serna¹, M., Miguel-Jiménez¹, S., Abecia¹, J.A., Fondevila², M., Pérez-Pe¹, R y Casao¹, A.

¹Grupo BIOFITER-IUCA, y ²IA2, Universidad de Zaragoza, Zaragoza. España; vpdelgado@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La melatonina ha sido usada en forma de implantes subcutáneos para modular la estacionalidad reproductiva en el ganado ovino (Abecia *et al.*, 2006; Casao *et al.*, 2013). Sin embargo, el consumidor final exige cada vez más el uso de alternativas ecológicas y libres de hormonas para la producción de alimentos. Por ello resultaría interesante poder sustituir la melatonina sintética por otras fuentes naturales como la fitomelatonina, que está presente de forma natural en muchos vegetales. Además, si utilizamos subproductos vegetales de la industria agroalimentaria, permitiría poner en valor dichos subproductos y encajar con las propuestas de la economía circular. Así, nos planteamos como objetivo estudiar la influencia del consumo de dietas ricas en fitomelatonina procedentes de subproductos vegetales sobre los parámetros de calidad seminal y la composición del plasma seminal en moruecos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante 5 meses (Febrero-Julio) 9 moruecos de raza Rasa Aragonesa fueron alimentados con una dieta comercial y otros 9 con una dieta rica en fitomelatonina (20% de inclusión sobre una dieta comercial de una mezcla de: pulpa de granada, subproducto de la elaboración de zumo, orujo de uva derivado de la industria vinícola y tomate, subproducto de la industria conservera). Se obtuvieron muestras seminales por vagina artificial cada 15 días, y se evaluó la motilidad, viabilidad, niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) y marcadores apoptóticos (inversión de la fosfatidilserina, PS) siguiendo los protocolos descritos por nuestro grupo de investigación (Gimeno-Martos *et al.*, 2019). Adicionalmente, se evaluó la concentración de melatonina mediante un kit comercial, y la actividad de las enzimas antioxidantes del plasma seminal mediante espectrofotometría (Casao *et al.*, 2013). Las diferencias entre grupos experimentales se analizaron mediante la prueba U de Mann-Withney, tras evaluar la normalidad de su distribución mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se encontraron diferencias significativas en la motilidad (total o progresiva) al comparar al grupo control con el grupo alimentado con una dieta enriquecida en fitomelatonina. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que la adición de melatonina a muestras seminales *in vitro*, no alteraba significativamente la motilidad (Casao *et al.*, 2010). Tampoco se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides vivos sin inversión de la PS, pero sí en la viabilidad (a partir del primer mes) y en el porcentaje de espermatozoides que presentaban bajos niveles de ROS intracelular (a partir del tercer mes). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la concentración de melatonina en plasma seminal, a pesar de que el grupo fitomelatonina presentaba valores superiores a partir del tercer mes, y tampoco en la actividad de las enzimas antioxidantes.

CONCLUSIÓN

Estos resultados sugieren que una dieta rica en fitomelatonina mejora la calidad seminal, disminuyendo el daño oxidativo. Este efecto podría deberse a una acción antioxidante directa de esta hormona, sin actuar a través de las enzimas antioxidantes presentes en el plasma seminal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia, J. A., *et al.* 2006. Domest. Anim. Endocrinol. 31: 52-62 • Casao, A., *et al.* 2013. Anim. Reprod. Sci., 138: 168-174 • Gimeno-Martos, S. *et al.* 2019. Reprod. Fertil. Dev. 31: 420-431.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL-2017-83799-R y DGA-A07_17R. V.P-D. y S. M-J disfrutan de una beca predoctoral de la DGA y M. C-S. de una PRE2018-085198. Los autores agradecen a Bodegas Tempore, Conservas Vega del Ebro y Vitalgrana (Humat Spain) el suministro de los subproductos vegetales, y a G. Gonzalo (SEA, F. Veterinaria), el procesado de los mismos y la preparación de raciones.

