

## CUANTIFICACIÓN DE MELATONINA, LÍPIDOS Y PROTEÍNAS OXIDADOS EN SEMEN OVINO DE ÉPOCA REPRODUCTIVA Y NO REPRODUCTIVA

A. Casao, C. Luna, E. Serrano, R. Pérez-Pé, T. Muiño-Blanco y J.A. Cebrián-Pérez.  
<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. adriana@unizar.es

### INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides de mamíferos son extremadamente sensibles al estrés oxidativo, que se puede definir como una alteración del equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes, a favor de los prooxidantes. Es decir, se produce un aumento de *Especies Reactivas de Oxígeno* (ROS) que se encuentran en el tracto genital masculino (Lemkecher et al. 2005). Esta excesiva producción de ROS afecta a las membranas lipídicas de los espermatozoides a causa de la lipoperoxidación y también a la oxidación proteica y al DNA. En cuanto a los agentes antioxidantes, la melatonina ha sido utilizada en forma de implantes exógenos en moruecos y se ha observado, entre otras acciones, un efecto protector del daño oxidativo en espermatozoides (Gavella y Lipovac 2000).

La reproducción en la especie ovina es altamente estacional. Durante la estación no reproductiva, con niveles bajos de melatonina plasmática, la calidad espermática desciende. Aunque este descenso en la calidad espermática se suele relacionar con el descenso de actividad del eje hipotálamo-hipofisario, la presencia de melatonina en plasma seminal humano (Luboshitzky et al. 2002), y de receptores en el espermatozoide humano (van Vuuren et al. 1992), sugieren una acción directa de esta hormona en la célula espermática. Por tanto, el primer objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de melatonina en el plasma seminal de morueco, y sus posibles variaciones estacionales. Y el segundo, estudiar las diferencias en la cantidad de lípidos y proteínas oxidadas, tanto en plasma como en espermatozoides ovinos, en época reproductiva y no reproductiva, y analizar si estas diferencias guardan relación con las variaciones en la cantidad de melatonina.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Para la obtención del semen, mediante vagina artificial, se emplearon moruecos adultos entre 2 y 4 años, pertenecientes a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado selecto de la raza Rasa Aragonesa (ANGRA), estabulados en la Facultad de Veterinaria.

El plasma seminal analizado se obtuvo del primer eyaculado de dichos sementales, recogido conjuntamente para evitar diferencias individuales. El semen se centrifugó inmediatamente a 13.000 rpm durante 10 minutos. La centrifugación se realizó dos veces para eliminar cualquier resto de células, y el plasma seminal obtenido se congeló a -20°C en oscuridad hasta su evaluación conjunta.

La determinación de los niveles de melatonina en plasma seminal se realizó mediante un método de ELISA directo con un kit comercial (Direct Saliva Melatonin ELISA Kit, Bühlmann Laboratories AG, Switzerland), siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial. Al final del proceso se determinó la absorbancia de las placas a 450 nm (TECAN Spectrafluor plus, Suiza). Los resultados se expresaron como media  $\pm$  S.E., y los valores semanales de melatonina se agruparon por estaciones. Las diferencias entre grupos se estudiaron mediante ANOVA (SPSS, versión 14.0).

La acumulación de proteínas oxidadas, tanto en espermatozoides como en plasma seminal se evaluó por el contenido en grupos carbonilos, que se cuantificó espectrofotométricamente a 360 nm mediante la reacción con DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) (Morte et al. 2008). El contenido en grupos carbonilos se calculó usando un coeficiente de extinción molar de  $2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para el DNPH, y se expresó en nmoles de DNPH/10<sup>6</sup> espermatozoides en el caso de las muestras espermáticas, y como nmoles de DNPH/mg de proteína en el caso de plasma seminal.

La peroxidación lipídica se determinó determinando las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) formadas, que se cuantificaron espectrofotométricamente a 530 nm y se calcularon utilizando un coeficiente de extinción molar de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Morte et al. 2008). Los resultados se expresaron como nmoles de TBARS/10<sup>6</sup> espermatozoides en el

caso de muestras espermáticas y como nmoles de TBARS/mg de proteína en el caso de plasma seminal. En ambos procedimientos, la determinación de la cantidad de proteínas en plasma seminal se llevó a cabo mediante el método de Bradford.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto al estudio de la presencia de melatonina en plasma seminal ovino, en esta fase inicial del estudio se analizaron únicamente dos muestras mensuales por duplicado para realizar una primera aproximación de los niveles anuales de melatonina, y los resultados obtenidos se agruparon por estación. El test de ELISA detectó la presencia de melatonina en todas las muestras de plasma seminal analizadas, muchas de ellas con valores superiores al rango superior detectado por el test (50 pg/ml), por lo que, inicialmente, los resultados se calcularon mediante la extrapolación de la curva patrón obtenida con los calibradores. Posteriormente, las muestras se diluirán para un estudio más preciso. El análisis de todas las muestras se realizó en una única placa de ELISA, y el coeficiente de variación intra-ensayo fue del 10,98%.

Los valores obtenidos indican que la concentración de melatonina en plasma seminal fue significativamente inferior en primavera que en otoño ( $P < 0,05$ ) e invierno ( $P < 0,01$ ) (Tabla 1). Esta variación es similar a las variaciones estacionales de melatonina en plasma sanguíneo en el morueco (Sheikheldin *et al.* 1992), lo que indicaría que la cantidad de melatonina en plasma seminal es reflejo de los niveles de melatonina sanguínea, con diferencias estacionales. Esta variación en los niveles de melatonina en plasma seminal podría ser en parte responsable de las diferencias en fertilidad y calidad seminal observadas entre época reproductiva y no reproductiva o en tratamientos con melatonina exógena (Casao *et al.* 2008; Palacín *et al.* 2008).

Curiosamente, la cantidad de proteínas y lípidos oxidados en plasma seminal fue significativamente mayor en época reproductiva que en no reproductiva (0.48 y 0.17 vs. 0.28 y 0.09 para proteínas y lípidos respectivamente). Sin embargo, este aumento no se tradujo en diferencias significativas en la oxidación de proteínas y lípidos en las células espermáticas (Figura 1). Sin olvidar el hecho de que estos son resultados preliminares, y que el número de muestras analizadas no es muy elevado, se podría sugerir que una mayor cantidad de melatonina en plasma seminal en época reproductiva es capaz de evitar que aumenten los niveles de oxidación en los espermatozoides a pesar de que la cantidad de proteínas y lípidos oxidados son mayores en plasma seminal de esta época.

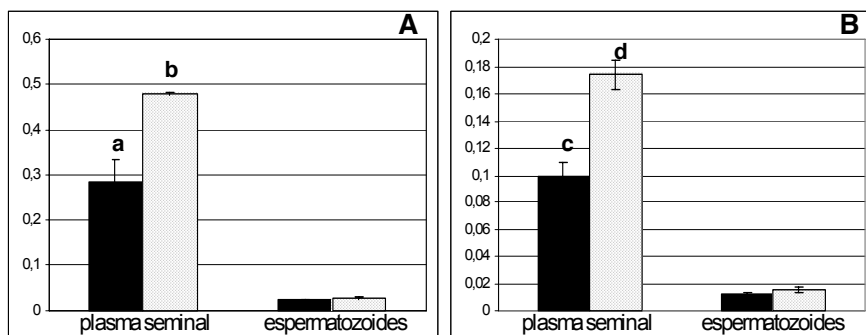
Finalmente, el análisis de melatonina en plasma seminal podría ser un método no invasivo para determinar cambios hormonales en animales donantes de semen, evitando que un manejo excesivo pudiera afectar a la calidad del semen, y permitiría correlacionar variaciones hormonales con cambios en la calidad seminal de un mismo animal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Casao, A., Vega, S., Palacín, I., Pérez-Pe, R., Laviña, A., Quintín, F. J., Sevilla, E., Abecia, J. A., Cebrián-Pérez, J. A., Forcada, F. & Muño-Blanco, T. (2008). *Reprod. Domest. Anim.* In press.
- Gavella, M. & Lipovac, V. (2000). *Arch. Androl.* 44: 23-27.
- Lemkecher, T., Dartigues, S., Vaysse, J., Kulski, O., Barraud-Lange, V., Gattegno, L. & Wolf, J. P. (2005). *Gynecol Obstet Fertil* 33: 2-10.
- Luboshitzky, R., Shen-Orr, Z. & Herer, P. (2002). *Arch. Androl.* 48: 225 - 232.
- Morte, M. I., Rodrigues, A. M., Soares, D., Rodrigues, A. S., Gamboa, S. & Ramalho-Santos, J. (2008). *Anim. Reprod. Sci.* 106: 36-47.
- Palacín, I., Abecia, J. A., Forcada, F., Casao, A., Cebrian-Perez, J. A., Muino-Blanco, T., Palacios, C. & Pontes, J. M. (2008). *Ital. J. Anim. Sci.* 7: 199-206.
- Sheikheldin, M. A., Howland, B. E. & Palmer, W. M. (1992). *J. Pineal Res.* 12: 58-63.
- van Vuuren, R. J., Pitout, M. J., van Aswegen, C. H. & Theron, J. J. (1992). *Clin Biochem.* 25: 125-7.

**Tabla 1.** Niveles de melatonina (pg/ml) en plasma seminal de morueco de raza Rasa Aragonesa según la estación del año. Superíndices distintos indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Estación	n	Melatonina (pg/ml)
Invierno	14	72,8 ± 21,6 <sup>b</sup>
Primavera	12	23,8 ± 4,2 <sup>a</sup>
Verano	10	40,4 ± 10,5
Otoño	10	83,3 ± 25,1 <sup>b</sup>



**Fig. 1.-** Cuantificación de proteínas (A) y lípidos (B) oxidados en plasma seminal y en muestras espermáticas, en época no reproductiva (■) y en época reproductiva (□). Los resultados de proteínas oxidadas están expresados en nmoles DNP/mg de proteína en plasma seminal y en nmoles DNP/10<sup>6</sup> espermatozoides en muestras espermáticas (A) y los resultados de lípidos oxidados están expresados en nmoles TBARS/mg de proteína en el plasma seminal y en nmoles TBARS/10<sup>6</sup> espermatozoides en muestras espermáticas. En todos los casos como valores medios ± S.E. (n=3). a,b:  $P < 0,05$ ; c,d:  $P < 0,01$ .

**Agradecimientos:** Este trabajo se ha realizado gracias a las ayudas CICYT-FEDER AGL 2007-61229, CICYT-FEDER AGL 2008-01476, DGA A-26 y DGA 040/08. Los autores agradecen a ANGRA el suministro de sementales.

#### QUANTIFICATION OF MELATONIN AND OXIDIZED PROTEINS AND LIPIDS IN RAM SEMEN IN BREEDING AND NON-BREEDING SEASON

**ABSTRACT:** The aim of this study was to investigate the presence of melatonin in ram seminal plasma throughout the year. Weekly seminal plasma samples from nine Rasa Aragonesa rams were collected for one year, and in an initial step of this study two samples per month were measured in duplicate with a commercial melatonin competitive ELISA test. Preliminary results showed that melatonin concentration in ram seminal plasma was higher in autumn ( $P < 0.05$ ) and winter ( $P < 0.01$ ) (breeding season in Rasa Aragonesa rams) than in spring, showing seasonal variations similar to blood melatonin. Surprisingly, the levels of protein and lipid oxidation in seminal plasma were significantly higher in the breeding season than in the non-breeding one ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively). However, the level of oxidized sperm proteins and lipids was similar in both seasons. Further studies must be done to confirm these results which suggest a possible role of melatonin in protecting sperm membranes against oxidative damage. Our results also showed that melatonin concentration in ram seminal plasma can be easily measured, and it might be correlated with variations in sperm quality.

**Keywords:** melatonin, oxidation, ram, seminal plasma.