



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

OSASUN ZIENTZIAK

**Antzutasun maskulinoa duten
pazienteen estratifikaziorako
biomarkatzaile metabolikoen
bilaketa eta tresna diagnostiko
baten garapena**

*Irune Calzado, Manu Araolaza,
Ainize Odriozola, Malen Zabala,
Lorena Crisol, Iratxe Ajuria,
Jose Roberto Matorras,
Mikel Albizuri eta Nerea Subirán*

63-70 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.04.07>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



LAGUNTZAILEAK



Antzutasun maskulinoa duten pazienteen estratifikaziorako biomarkatzaile metabolikoen bilaketa eta tresna diagnostiko baten garapena

Irune Calzado^{1,5}, Manu Araolaza^{1,5}, Ainize Odriozola^{1,2,5}, Malen Zabala², Lorena Crisol³, Iratxe Ajuria⁴, Roberto Matorras⁵, Mikel Albizuri¹ eta Nerea Subirán^{1,2,5}

(1) Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea. Fisiologia Departamentua (UPV/EHU). Leioa, Bizkaia.

(2) Mepro Medical Reproductive Solutions. Donostia.

(3) Donostiako Unibertsitate Ospitalea. Donostia.

(4) IIS Biobizkaia. Galdakao-Usansolo Ospitalea. Andrologiako Unitatea. Galdakao.

(5) IIS Biobizkaia. Gurutzetako Unibertsitate Ospitalea. Barakaldo.

irune.calzado@ehu.eus

Laburpena

Gaur egun giza antzutasunak munduko biztanleriaren %17.5ari eragiten dio eta kasuen %50ak faktore maskulinoei lotuta daude. Horrez gain, gizonen antzutasuna aztertzekeo tresna diagnostikoak mugatuak dira, ez baitira %100ean eraginkorrak, eta gameto maskulinoen suntsipena dakarte. Ildo horretan, azterketa metabolikoak eta lipidomikoak oso baliagarriak izan daitezke, bai semen-kalitatea ebaluatzekeo, bai gizonen antzutasuna eragiten duten kausen karakterizazio integralagoa gauzatzeko maila molekularrean. Gainera, likido seminalen biomarkatzaile metabolikoak identifikatzeak aukera eman diezaguke semen-lagin berean proba diagnostiko bat gauzatzeko espermatozoideak suntsitu gabe.

Hitz gakoak: antzutasuna, biomarkatzailea, metabolomika, lipidomika.

Abstract

Nowadays, human infertility affects approximately 17.5% of the global population and in 50% of cases, it is due to a male factor. Furthermore, diagnostic tools for male infertility have many limitations, as they are not 100% effective and involve the destruction of the male gametes. Metabolic and lipidomic studies could be of great use for evaluating semen quality, allowing us to have a more comprehensive and integrated molecular characterization of the underlying causes of male infertility. Additionally, the identification of metabolic biomarkers in seminal fluid could enable us to perform a diagnostic test on the same seminal sample without destroying the spermatozoa.

Keywords: infertility, biomarker, metabolomic, lipidomic.

1. Sarrera eta motibazioa

Antzutasuna mundu osoan garrantzi handia duen arazo mediko eta soziala da, 186 milioi pertsoneri eragiten die (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009), eta ugalketa-sistemako gaixotasun gisa definitzen da. Hain zuzen, 12 hilabete edo gehiago antisorgailurik gabeko ohiko harreman sexualak izan ondoren haurdunaldi klinikorik ez lortzean ematen da (Inhorn eta Patrizio, 2015). Antzutasunaren prebalentzia %17.5 ingurukoa da mundu osoan (Osasunaren Munduko Erakundea (OME), 2023), eta bikotearen arazoa den arren, estimatzen da **faktore maskulinoek** kasuen %50etan eragiten duela. Gaur egun, espermaren oinarritzko analisiak edo **seminogramak** erabiltzen dira ezaugarri makroskopiko eta mikroskopikoen bidez semen laginak aztertzekeo, patologia diagnostikatzeko helburuarekin (OME, 2021):

1. taula: OME 2021eko parametro seminalak eta lotutako patologia.

Parametro seminalak	Erreferentziazko beheko muga	Lotutako patologia
Bolumen seminalak	1.4 (1.3-1.5) mL	Hipospermia/hiperespermia
Espermatozoide kopurua	39 (35-40) M	Oligozoospermia
Mugikortasun totala	42 (40-43) %	Astenozoospermia
Mugikortasun progresiboa	30 (29-31) %	
Bizitasuna	54 (50-56) %	Nekrozoospermia
Morfologia	4 (3.9-4) %	Teratozoospermia

Hala ere, seminogramak kalitate seminala determinatzeko iragarpen-balio mugatua du, lagundutako ugalketa tratamenduen etengabeko porrot-tasa altuek argi eta garbi erakusten duten bezala. Gainera, Lagundutako Ugalketako Tekniken (LUT) garapenak gizonen antzutasunarekin lotutako ikerketa geldiarazi du, eta horrek gizona paziente gisa ez artatzea eragin du.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Azken urteotan, hainbat ikerketa egin dira gizonen antzutasunean esku hartzen duten mekanismo molekularrak identifikatu eta ulertzeko xedearekin. Zehazki, **metabolismoak** zelulen fenotipo eraldatuari laguntzen diola adierazten duten ikerketak hainbat dira; izan ere, metabolismoan ematen diren aldaketek nabarmenki eragiten dute zelula-barneko prozesu ugarietan, hala nola hazkuntzan, proliferazioan, diferentziazioan eta mugikortasunean. Espermatozoideek ATP kopuru handiak behar dituzte, mugimendu eta hiperaktibaziorako beharrezkoak diren prozesu mekanikoak eta seinalizazio-prozesuak mantendu ahal izateko (Said eta Land, 2011). Hortaz, espermatozoideen bioenergia zehatz-mehatz aztertu da erabiltzen duten biderik eraginkorrena zein den definitzeko helburuarekin (Lepina *et al.*, 2019). **Gure ikerketataldean egindako aurretiazko azterketa proteomikoek ondorioztatu** dutenez, **antzutasuna erakusten duten semen-laginek metabolismo energetikoarekin lotutako proteinak aldatuta dituzte**, bide glikolitikokoak eta fosforilazio oxidatibo bidekoak, besteak beste (Navarro Santos, 2023). Hori dela eta, biomarkatzaile metabolikoak oso erabilgarriak izan daitezke semen-kalitatea ebaluatzeko, pazienteak estratifikatzeko eta tresna diagnostikoak garatzeko. Gainera, biomarkatzaile metabolikoak likido seminalean identifikatzeko, proba diagnostikoa semen-lagin berean egitea ahalbidetuko du espermatozoideak suntsitu gabe, eta horrek gaur egun erabat baztertzeko den semen-frakzioari balio erantsia emango lioke.

Hortaz, proiektu honen **helburu nagusia** antzutasun maskulinoa duten pazienteetan likido seminalean biomarkatzaile metabolikoak identifikatzea eta eredu metabolikoak definitzea da. Horretarako, Kromatografia Likidoari lotutako tandem Masa Espektrometria teknika erabiliko da (LC-MS/MS). Helburu horren barruan, honako azpi helburu hauek lortu nahi dira:

- 1) Analisi metabolomiko eta lipidomikoen baldintzak optimizatzea, bai likido seminalean, bai espermatozoideetan.
- 2) Likido seminalaren eta espermatozoideen frakzioen arteko konparazioa egitea, ziurtatzeko likido seminaleko profil metabolikoak espermatozoideetan sortutako alterazio metabolikoen isla direla.
- 3) Eskala handiko azterketa metabolomikoa eta lipidomikoa egitea likido seminalean, tresna diagnostikoa garatzeko erabiliko diren biomarkatzaile metabolikoak identifikatzeko.

3. Ikerketaren muina

3.1 Metodologia

1. MUGARRIA: Pazienteen hautaketa eta laginen prozesamendua

Gure ikerketan Euskal Osasun Zerbitzu Publikoko Laguntza Bidezko Ugalketa Unitateetan (FIV/ICSI) laguntza bidezko ugalketa-tratamenduak egiten dituzten bikoteetako gizonak sartuko dira (Gurutzea, Galdakao eta Donostiako Ospitalekoak). Azterketa honetan sartzen diren pazienteek 30 eta 50 urte bitarteko adina eta alterazio hormonal eza izango dute. Horrez gain, ez dute ugal-aparatuaren anomalia fisikorik izango, eta erradioterapiarik eta/edo kimioterapiarik jaso duten hautagaiak baztertuak izango dira. Inkusio irizpideak betetzen dituzten eta ikerketa honetan parte hartzea onartu duten pazienteen semen-lagin osoak erabiliko dira. Laginak 3 eta 5 egun bitarteko abstinentsia sexualaren ondoren jasoko dira, eta ohiko seminograma egingo zaie, bolumena, kontzentrazioa, mugikortasuna eta morfologia neurtuz. Ondoren, espermatozoideak eta likido seminala banatuko dira. Azkenik, laginak -80°C -tan biltegitratuko dira, ondorengo analisi molekularra egin arte.

2. MUGARRIA: Biomarkatzaile metabolikoak identifikatzea LC-MS/MS bidez

Gure helburua likido seminalean eredu metaboliko bat definitzea da, tresna diagnostiko bat garatzeko aukera emango diguna. Azterketa metabolomikoetarako, Kromatografia Likidoari lotutako tandem Masa Espektrometria teknikaren bidez egingo da (LC-MS/MS), eta bideratu gabeko ikuspegi teknika erabiliko da. Ikuspegi honek bide metaboliko nagusietako metabolitoen ebaluazio kuantitatiboa egitea ahalbidetzen du. Analisiak egiteko, bi zutabe kromatografiko erabiliko dira: bat analisi lipidomikorako, metabolito apolarrek (bereziki lipidoak) zehazteko, eta beste zutabe unibertsalago bat metabolito polarrenak zehazteko (metabolomika). Gainera, neurketak elektropray ionizazio (ESI) moduan egingo dira, ESI+ eta ESI- moduetan zehazki, positiboki zein negatiboki ionizatzen diren metabolitoak determinatzeko. Analisi horien guztien datuak *Lipid Search*, *MetaboAnalyst 5.0*, *Compound Discoverer* softwareekin eta SOLO erremintarekin aztertuko dira analisi bioestatistikoak egiteko eta kaltetutako bide metabolikoak zehazteko helburuarekin.

3.2 Emaizak

Jarraian erakutsiko diren emaitzetan lanaren lehenengo bi helburuak landu dira nagusiki. Lehendabizi, analisi-baldintzen optimizaziorako laginen *pool* bat prestatu zen hiru laginekin, horietako bi patologikoak (terato eta astenoteratozoospermikoak) eta bat normozoospermikoa. Likido seminalaren **bolumen** (20 μ L, 50 μ L eta 70 μ L) eta espermatozoideen **kontzentrazio** (1.25 M, 0.63 M eta 0.31 M) desberdinen erreplikak prestatu ziren, balio egokienak determinatzeko helburuarekin. Erauzketa lipidomikoak isopropanola erabiliz egin ziren; erauzketa metabolomikoak, berriz, metanolarekin. Ondoren, bi frakzioen analisi lipidomikoa eta metabolomikoa egin ziren:

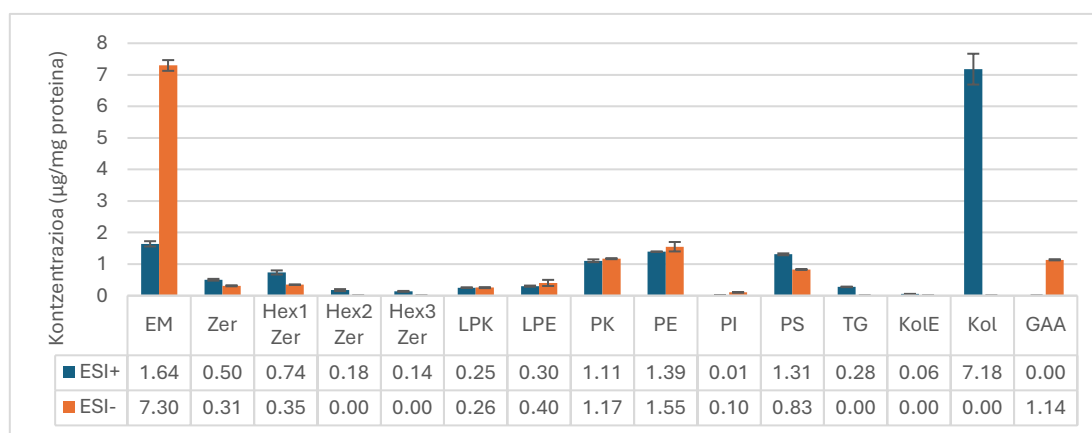
3.2.1 Lipidomikaren optimizazioa

Lipidomikarako analizatutako laginak alderantzizko faseko UHPLC-QOrbitrap-HFX zutabe batean prozesatu ziren (*Acquity™ Premier C18 CSH VanGuard™ 2.1 x 100 mm, 1.7 μ m*).

- Likido seminala

Likido seminalaren analisisan, lipido kopuru handiagoa identifikatu zen likido seminalaren 70 μ L-tan, erreproduzigarritasun eta linealtasun ona mantenduz, eta, beraz, bolumen hori optimotzat jo zen. ESI positiboan eta negatiboan detektatutako lipido familia ugariak erakusten dira hurrengo irudian (**1. irudia**):

1. irudia. ESI+ eta ESI- frakzioen azterketa lipidomikoan likido seminalean zehaztutako konposatu nagusiak (EM: esfingomielinak; Zer: zeramidak; HexZer: hexosilzeramidak; LPK: lisofosfatidilkolinak; LPE: lisofosfatidiletamolaminak; PK: fosfatidilkolinak; PE: fosfatidiletanolaminak; PI: fosfatidilinositolak; PS: fosfatidilseinak; TG: triglizeridoak; KolE: kolesterol esterra; Kol: kolesterol; GAA: gantz azido askeak).



ESI positiboaren kasuan, Kol-ak eman zuen kontzentrazioarik handiena (7.18 μ g/mg proteina), eta, ondoren, EM-ak (1.64 μ g/mg proteina), PK-ak (1.11 μ g/mg proteina), PS-ak (1.31 μ g/mg proteina) eta PE-ak (1.39 μ g/mg proteina). Kontzentrazio horiek profil lipidikoa adierazten dute,

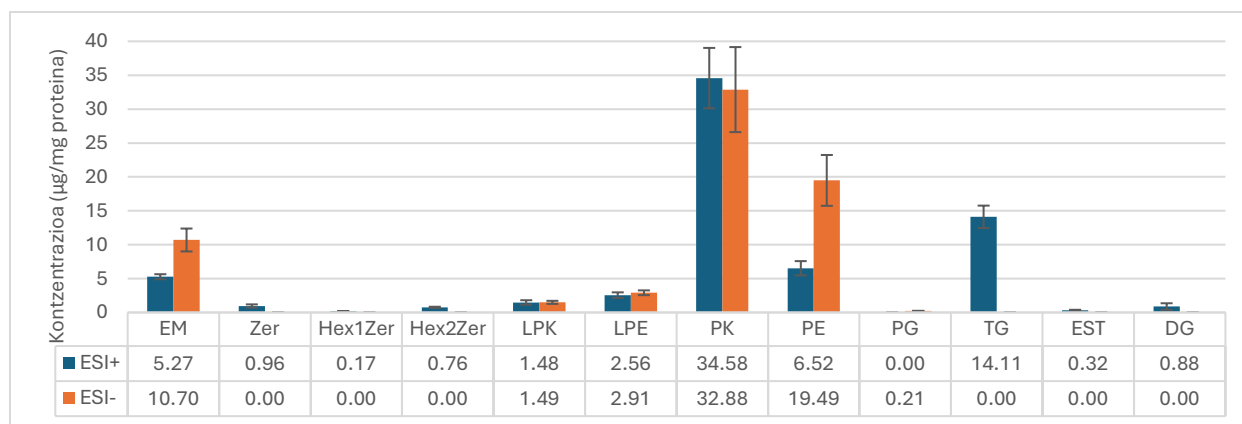
zelula-mintzetan egiturazko lipidoak nagusi direlako, eta espermatozoideen kalitatean eta funtzionaltasunean eragin posibleak dituztelako. Zer-ak ($0.51 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina) eta HexZer-ak ($0.73 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina) ere detektatu ziren, baina kontzentrazio baxuagoetan. Bestalde, **ESI negatiboan**, kontzentrazioarik altuena EM-ri dagokio ($7.30 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina), talde positiboan baino nabarmenki handiagoa izanik, eta horrek esfingolipidoen ibilbide metabolikoetan alterazioak egon daitezkeela adierazten du. PK-ak ($1.17 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina), PE-ak ($1.55 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina) eta PS-ak ($0.83 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina) erakutsi zituzten kontzentrazioak ESI positiboan aurkitutakoen antzekoak izan ziren. Zer-ak, ($0.31 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina) eta HexZer-ak ($0.35 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina), ESI positiboan baino kontzentrazio baxuagoak erakutsi zituzten. Aitzitik, LPK-en ($0.26 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina) eta LPE-en ($0.40 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina) kontzentrazioak altuagoak izan ziren. TG-en ($0.28 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina) eta GAA-en ($1.14 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina) presentziak ere dinamika lipidikoan aldaketa iradokitzen du, eta horrek eragina izan lezake mugikortasun espermatozikoan.

Oro har, **kolesterolak**, **esfingomielinak** eta **fosfatidilkolinak** nabarmentzen dira likido seminalean. Lipido horiek funtsezkoak dira mintz zelular espermatozikoaren egiturarako eta funtziorako, eta horrek iradokitzen du haien kontzentrazioan gertatzen diren aldaketak lotuta egon daitezkeela gizonen antzutasun-arazoekin. Zehazki, esfingomielinen presentzia mintz espermatozikoaren jariakortasun eta egonkortasun aldaketekin lotuta egon daiteke. Alterazio horrek eragina izan dezake espermatozoideek obulu bat ernaltzeko duten gaitasunean, eta, ondorioz, esfingolipidoak eremu garrantzitsua izan daitezke gizonen antzutasunean biomarkatzaile lipidikoei buruzko etorkizuneko azterketetarako.

- Espermatozoideak

Espermatozoideen frakzioan, 1.25 M kontzentrazioan detektatutako lipido familia ugarienak ESI positibo eta negatibo ionizazio moduetan erakusten dira (**2. irudia**):

2. irudia. Espermatozoideen ESI+ eta ESI- frakzioen azterketa lipidomikoan zehaztutako konposatu nagusiak (EM: esfingomielinak; Zer: zeramidak; HexZer: hexosilzeramidak; LPK: lisofosfatidilkolinak; LPE: lisofosfatidiletanolaminak, PK: fosfatidilkolinak; PE: fosfatidiletanolaminak; PG: fosfatidilglizerolak; TG: triglizeridoak; EST: esterolak; DG: diazilglizerolak).



ESI positiboaren kasuan, lipido klase ugarienak PK-ak izan ziren, batez besteko $34.58 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina kontzentrazioarekin (**2. irudia**), eta ondoren, TG-ak ($14.11 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina) eta EM-ak ($5.27 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina). Kontzentrazio txikiagoetan identifikatutako beste lipido klase batzuk PE-ak ($6.52 \mu\text{g}/\text{mg}$), LPE-ak ($2.56 \mu\text{g}/\text{mg}$), LPK-ak ($1.48 \mu\text{g}/\text{mg}$), Zer-ak ($0.96 \mu\text{g}/\text{mg}$), HexZer-ak ($0.93 \mu\text{g}/\text{mg}$), EST-ak ($0.32 \mu\text{g}/\text{mg}$) eta DG-ak ($0.88 \mu\text{g}/\text{mg}$) izan ziren. **ESI negatiboan**, aldiz, PK-ak ere izan ziren nagusi, batez besteko $32.88 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina kontzentrazioarekin. Bestalde, gainerako lipido klase hauek identifikatu ziren ere: PE-ak ($19.49 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina), EM-ak ($10.70 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina), LPE-ak ($2.91 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina), LPK-ak ($1.49 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina) eta PG-ak ($0.21 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina).

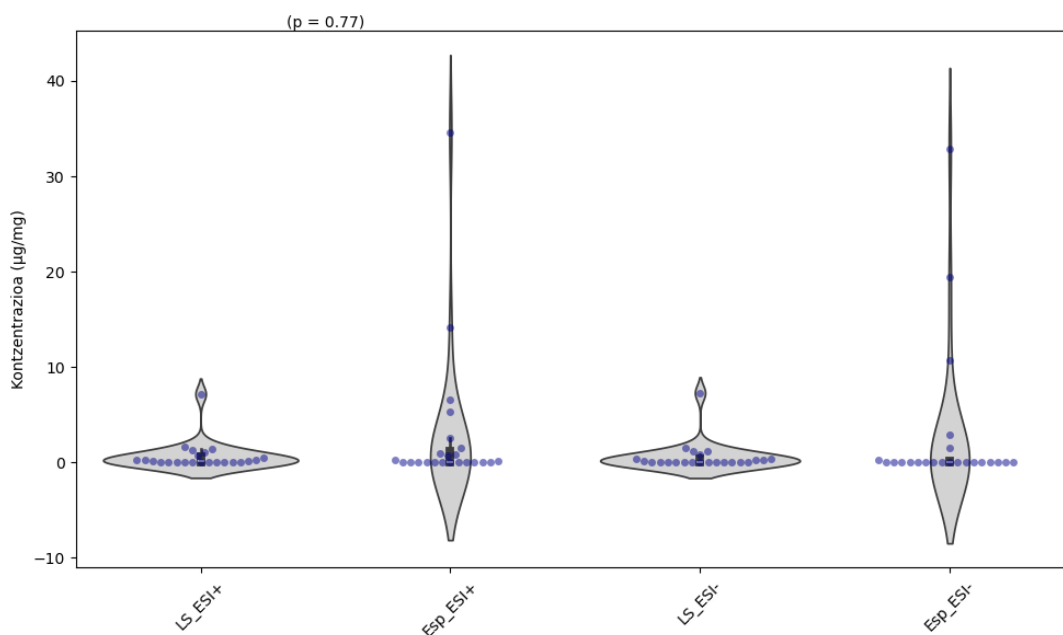
Ondorioz, **fosfatidilkolinak** izan ziren bi ionizazio moduetan klase lipidiko ugarienak, eta horrek espermatozoideetan duen zeregin estrukturala eta funtzionala nabarmentzen du. ESI positiboan, triglizeridoak izan ziren bigarren klaserik garrantzitsuenak, eta ESI negatiboan, berriz, fosfatidiletanolaminak. Mota lipidiko horiek funtsezkoak dira zelula-mintzaren osotasunerako eta espermatozoideen zelula barneko seinalizaziorako.

Hala ere, analisi honetan, muga garrantzitsu bat espermatozoideen kontzentrazio txikia izan zen, eta horrek hainbat konposatu familia detektatzea eragotzi zuen. Kolesterolak, adibidez, detekzio mugatik behera egon ziren. Laginen *pool* batekin lan egiten denean arazo hori ez da hain kritikoa zelula kantitatea errazago aldatu daitekeelako, baina analisi indibidualetan kontzentrazio txikiak erronka garrantzitsua izan daitezke, bereziki oligozoospermia kasuetan. Eraitza hauek kontzentrazioa handitzeko beharra azpimarratzen dute, detekzio zabalagoa bermatzeko.

- Espermatozoideen eta likido seminalaren arteko konparazioa lipidomikan

Espermatozoideen eta likido seminalaren frakzioen arteko konparazioak zenbait erronka izan zituen, espermatozoideetan lipido-konposatuak gutxiago detektatu zirelako. Muga hori izan arren, azterketa zehatza egin zen. Frakzioen arteko desberdintasun estatistikoak ebaluatzeko, faktore baten ANOVA analisia egin zen, emaitzen adierazgarritasuna $p < 0.05$ mailan bereiziz. Azterketa horrek adierazi zuen ***p*-balioa 0.05-etik gorakoa zela (0.77)**, eta horrek baieztatzen du **ez dagoela alde esanguratsurik likido seminalean eta espermatozoideetan detektatutako konposatuen batez bestekoen artean**. Biolin-grafikoak antzeko banaketak erakusten ditu lau baldintzen artean, dispersioaren desberdintasun eta balio atipiko batzuekin espermatozoideen frakzioan, ziur asko analisi-baldintza ez optimoen ondorioz (**3. irudia**).

3. irudia. Espermatozoide eta likido seminal ESI positibo eta negatibo frakzioetan, azterketa lipidomikoaren konposatuen biolin grafikoa (LS_ESI+: likido seminal ESI positibo frakzioa; Esp_ESI+: espermatozoideak ESI positibo frakzioa; LS_ESI-: likido seminal ESI negatibo frakzioa; Esp_ESI-: espermatozoideak ESI negatibo frakzioa).



3.2.2 Metabolomikaren optimizazioa

Metabolomikarako analizatutako laginak UHPLC-QOrbitrap-HFX (ESI+ eta ESI-) alderantzizko faseko, baina unibertsalagoa den zutabe batean prozesatu ziren (*Acquity UPLC BEH C18 Column, 1.7 µm, 2.1 X 100 mm WATERS*). Espermatozoideen frakzioaren kontzentrazioa optimoa ez denez, analisi metabolomikarako **likido seminalean** zentratzea erabaki zen. Frakzio honetan, analisi lipidomikoan bezala, 70 µL determinatu ziren bolumen optimo gisa.

Analisi honetan, bereziki eikosanoide familiako hainbat konposatu detektatu ziren, batez ere ESI negatibo ionizazio moduan (**4. irudia, barra laranja**): **19(R)-hidroxi Prostaglandina A2, 19(R)-hidroxi Prostaglandina E1 eta 15(R),19(R)-hidroxi Prostaglandina F2**. Gizonen antzutasunaren testuinguruan, prostaglandinen sintesiaren edo jardueraren desorekak espermatozoideen mugikortasun eta ernaltzeko gaitasun-aldaketekin lotu dira (Yu *et al.*, 2019; Szczuko *et al.*, 2020). Horrez gain, prostaglandinen kontzentrazio handiak traktu genitaleko

prozesu inflamatorio kronikoekin lotuta egon daitezkeela behatu da, eta horrek semenaren kalitatea kaltetzen du (Schaefer *et al.*, 1998).

Hala ere, emaitza hauen aurrean, zalantza sortu zen konposatu horiek likido seminalen kontzentrazio altuetan dauden ala erauzketan zehar beste konposatu batzuen oxidaziotik datozen. Hau zehazteko, proba metabolomiko bideratu bat egin zen likido seminalen konposatu-familia hori aztertzeko, BHT (butilhidroxitolueno) antioxidatzailearen kontzentrazio bat gehituz. Antioxidatzaile hori analisi kimikoetan asko erabiltzen da. Oxidazio lipidikoa eta proteikoa inhibitzen dituen eragile gisa jarduten du, eta, horri esker, erauzketa prozesuan bestelako konposatuen eraketa sahisten du (Li *et al.*, 2016; Delgado *et al.*, 2015).

- Eikosanoideen proba metaboliko bideratua likido seminalen

Esperimentu honen helburua likido seminalen laginetan BHT antioxidatzailearen presentzia eikosanoideen presentzia konstantea den egiaztatzea zen. Eikosanoideak oxidazioarekiko bereziki sentikorrek diren konposatuak dira, hortaz, BHT-ren aurrean haien presentzia konstantea mantentzen bada, konposatu hauen jatorria biologikoa dela ondoriozta dezakegu. Esperimentu hau aurrera eramateko, *pool* bat prestatu zen berriro ere hiru laginekin, bi patologikoak (terato eta astenozoospermikoak) eta bat normozoospermikoa. Analisi bideratua egiteko, eikosanoideen barne estandarrak gehitu ziren: **Leukotriene E4-d5** 1 ppm, **Prostaglandin I E2-d4** 5 ppm, **15-HERE d8** 1 ppm, **Thromboxane B2-d4** 1ppm eta **Arachidonic d8** 1 ppm. Analisi hau ESI negatibo moduan soilik egin zen, matrize horretan eikosanoideak nagusi baitira. Jarraian, egindako konparazioak deskribatzen dira:

- **1. konparazioa: antioxidatzaile kantitatea**

Hurrengo konparazioan, BHT antioxidatzailearen bi kontzentrazio ezberdinek (150 µg/mL eta 500 µg/mL) eikosanoideen detekzioan duten eragina ebaluatu zen. Emaitzen analisia *Student t*-testa erreminta bidez gauzatu genuen, emaitzen adierazgarritasuna $p < 0.05$ mailan bereiziz. Emaitzek p -balioa 0.05 baino handiagoa zela erakutsi zuten, eta horrek bi taldeen batez bestekoen artean alde esanguratsurik ez dagoela adierazten du. Hortaz, BHT kantitateak ez du eraginik detektatutako konposatuen kontzentrazioan; hau da, **likido seminalen laginetan eikosanoideak egoteak ez du zerikusirik antioxidatzaile kopuruarekin**. Horrek indartu egiten du deskribatutako hipotesia: konposatu horiek jatorri biologikoa dute, eta ez dira erauzketa-prozesuan zehar degradazioek edo oxidazioek eragindako produktuak.

- **2. konparazioa: disolbatzailea**

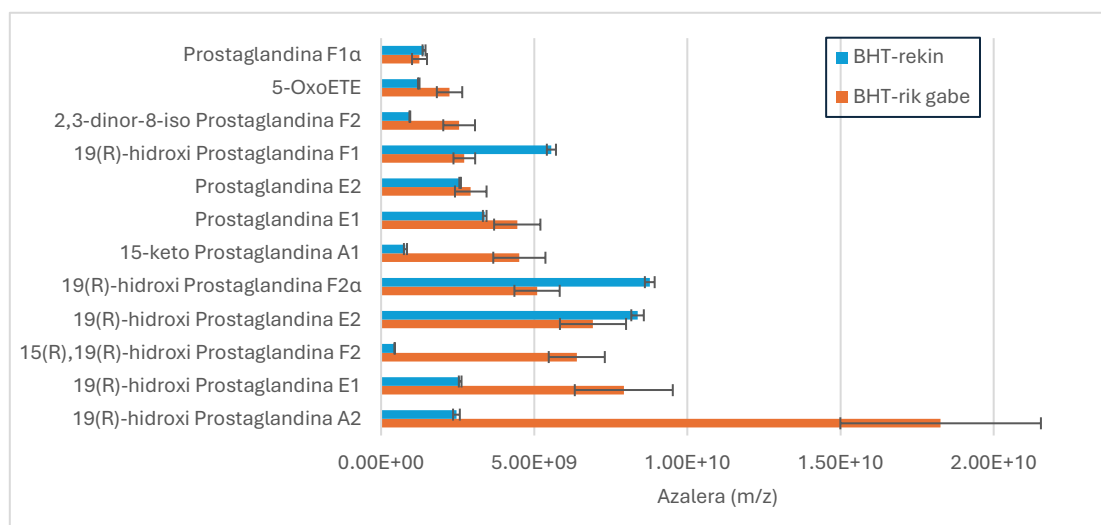
Konparazio honetan, aldiz, disolbatzaileak eikosanoideen detekzioan eragin ote dezakeen egiaztatu nahi izan zen. Horretarako, bi disolbatzaile (etanola eta metanola) baldintza berberetan alderatu ziren, eta berriz ere *Student t*-testa egin zen. Emaitzen arabera, p -balioa 0.05 baino handiagoa izan zen, eta horrek bi taldeen batez bestekoen artean alde esanguratsurik ez dagoela erakusten du. Hau da, likido seminalen laginetan detektatutako eikosanoideen kopurua ez da aldatzen erabilitako disolbatzaile motaren arabera. Horrek berriro indartzen du eikosanoideen jatorri biologikoa.

Oro har, detektatu ziren konposatu ugariak prostaglandinen deribatu hidroxilatuak izan ziren, hala nola **19(R)-hidroxi Prostaglandina F2α** eta **19(R)-hidroxi Prostaglandina E2 (4. irudia, barra urdina)**. Beste konposatu batzuk, hala nola 19(R)-hidroxi Prostaglandina F1 eta Prostaglandina E1, kantitate baxuagotan detektatu ziren. Prostaglandinak azido arakidonikoaren metabolismoaren produktuak dira, entzima espezifikoek katalizatuak, hala nola **hidroxi-reduktasa prostaglandina**. E1 eta E2 bezalako prostaglandinek funtsezko rolak betetzen dituzte mugikortasun espermatozoiden erregulazioan, funtzio immunologiko lokalean eta mintz zelularren integritatean, eta hauek funtzio kritikoak dira gizonen ugalkortasunerako (Schaefer *et al.*, 1998; Tsoi, 2017). Hortaz, prostaglandinak eta horien deribatu hidroxilatuak biomarkatzaile posibleak izan daitezke likido seminalaren egoera fisiologikoa ebaluatzeko.

Analisi honek prostaglandinen eta haien deribatu hidroxilatuen nagusitasun argia erakusten du, metabolomikaren aurretiazko emaitzetan ikusitakoaren antzera. Nahiz eta bi frogak laginen *pool* ezberdinekin egin, bi frogetan lortutako datuek 0.05 baino p -balioa handiagoa erakutsi zuten

Student t testaren ondoren. Hortaz, eikosanoideen kantitatea BHT-rik gabeko taldean handiagoa dirudien arren, estatistikoki ez dago ezberdintasunik bi taldeen batez bestekoen balioen artean.

4. irudia. Eikosanoide ugarienak likido seminal frakzioan BHT-rekin eta BHT-rik gabe.



Laburbilduz, lortutako emaitzek baieztatzen dute eikosanoideen presentzia esanguratsua dela aztertutako laginetan, eta iradokitzen dute erauzketa-prozesuan ez direla oxidatzen, eta likido seminalean prostaglandina-mailetan anomaliak gizonen antzutasun arazoekin lotuta egon daitezkeela. Hala ere, eta edozein oxidazio posible minimizatzeko, protokoloan BHT erabiltzea erabaki zen, bere presentziak ez duelako analisisian eragin negatiborik.

4. Ondorioak

Jarraian, egindako analisiekin zehaztu ditugun ondorio nagusiak deskribatzen dira:

- **Likido seminalaren** laginetan bolumen optimoa **70 μ L-tan** determinatu da bi analisisetan, metabolomikan zein lipidomikan.
- **Espermatozoideen frakzioan erabilitako kontzentrazio maximoa ez da nahikoa** izan detekzio optimoa lortzeko, eta, beraz, proba hori **errepikatu** beharra dago zelulen **kontzentrazioa handituz**.
- **Espermatozoideen frakzioan** gauzatutako **lipidomika** analisisian **fosfatidilkolinak, triglizeridoak** eta **esfingomielinak** nabarmendu dira, zelulen funtzio estrukturalen funtsezkoak diren lipidoak.
- **Likido seminalean** gauzatutako **lipidomika** analisisian, **kolesterolak, esfingomielinak** eta **fosfatidilkolinak** nabarmendu dira, zelula-mintzen egiturarekin eta esperma-funtzionaltasunarekin duten lotura nabarmenduz.
- **Likido seminalaren** azterketa **metabolomikoan**, lehen analisisetan **prostaglandina-kopuru handia** ikusi da (bereziki prostaglandina hidroxilatuak), eta analisi sakonago baten ondoren, beste konposatuen oxidaziotik ez datozela eta **jatorri biologikoa** dutela zehaztu da. Prostaglandinak likido seminalean duten presentzia gizonen antzutasun-arazoekin lotuta egon daitekeenez, eskala handiko azterketan konposatu hauetan sakontzea abiapuntu interesgarria izan daiteke.
- **Espermatozoideen eta likido seminalaren profil lipidomikoak antzekoak** dira, eta horrek bi frakzioen arteko konposizio konparagarria iradokitzen du.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Protokoloaren optimizazio-proben ondoren, **eskala handiko azterketa metabolomiko eta lipidomikoa burutzea** planifikatu da, espermatozoideen ugalkortasun diagnostikorako

adierazleak izan daitezkeen biomarkatzaileak bilatzeko eta identifikatzeko helburu nagusiarekin. Gaur egun, helburu hori lantzen ari gara, eta deskribatutako hirugarren helburuari dagokio. Eskala handiko analisirako guztira likido seminalaren **181 lagin** hautatu dira, eta talde desberdinetan antolatu dira. Lagin **normozoospermikoak (43)** kontrol gisa erabiliko dira, eta **patologia larriak** dituzten laginak **(88)**, berriz, biomarkatzaileak zehazteko, identifikatzeko eta eredu bat sortzeko erabiliko dira. Patologia larri horiek definitzeko, irizpide hauek ezarri dira:

- **Astenozoospermia:** mugikortasun progresiboa $< \%15$
- **Oligozoospermia:** kontzentrazioa $< 16 \text{ M/mL}$
- **Teratozoospermia:** morfologia (% FN) $< \%3,1$

Ondoren, garatutako eredu baliozkotuko da zehaztutako irizpideen gainetik dauden gainerako **lagin patologikoak** erabiliz **(50)**.

6. Erreferentziak

- Delgado, A. E., Palacio, O., eta Aperador, W. (2015). Efecto de Butil Hidroxitolueno (BHT) en la Estabilidad Oxidativa de un Lubricante a Base de Aceite de Ajonjolí. *Información Tecnológica*, 26(4), 81–88. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000400011>
- Inhorn, M. C., eta Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update*, 21(4), 411–426. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016>
- Lepine, S., McDowell, S., Searle, L. M., Kroon, B., Glujovsky, D., eta Yazdani, A. (2019). Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 7. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010461.pub3>
- Li, H., Zhou, X., Gao, P., Li, Q., Li, H., Huang, R., eta Wu, M. (2016). Inhibition of lipid oxidation in foods and feeds and hydroxyl radical-treated fish erythrocytes: A comparative study of Ginkgo biloba leaves extracts and synthetic antioxidants. *Animal Nutrition (Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui)*, 2(3), 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.04.007>
- Navarro Santos, B. (2023). *Influencia de las nulismías espermáticas en la infertilidad: caracterización proteómica e identificación de biomarcadores diagnóstico y de selección*. <http://hdl.handle.net/10810/59879>
- Said, T. M., eta Land, J. A. (2011). Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 17(6), 719–733. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr032>
- Schaefer, M., Hofmann, T., Schultz, G., eta Gudermann, T. (1998). A new prostaglandin E receptor mediates calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 3008–3013. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3008>
- Szczuko, M., Kikut, J., Komorniak, N., Bilicki, J., Celewicz, Z., eta Ziętek, M. (2020). The Role of Arachidonic and Linoleic Acid Derivatives in Pathological Pregnancies and the Human Reproduction Process. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9628. <https://doi.org/10.3390/ijms21249628>
- Tsoi, S. (2017). *The biological effects of prostaglandins on human sperm function*. https://doi.org/10.5353/th_991043984189803414
- World Health Organization. (2021). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th edition*.
- World Health Organization. (2023). *Infertility Prevalence Estimates, 1990–2021*.
- Yu, L., Yang, X., Ma, B., Ying, H., Shang, X., He, B., eta Zhang, Q. (2019). Abnormal arachidonic acid metabolic network may reduce sperm motility via P38 MAPK. *Open Biology*, 9(4). <https://doi.org/10.1098/rsob.180091>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., eta van der Poel, S. (2009). The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Human Reproduction*, 24(11), 2683–2687. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep343>

7. Eskerrak eta oharrak

Iruñe Calzadok doktoretza aurreko beka bat jaso zuen Euskal Herriko Unibertsitatearen (UPV/EHU) eskutik. Proiektu hau Carlos III Osasun Institutuaren (SCIII), Osasun Ministerioaren eta Eusko Jaurlaritzako Osasun Sailaren laguntzekin egin zen. Lipidomika eta metabolomika analisiak SGIKER-eko Analisi Zerbitzuarekin elkarlanean egin ziren.