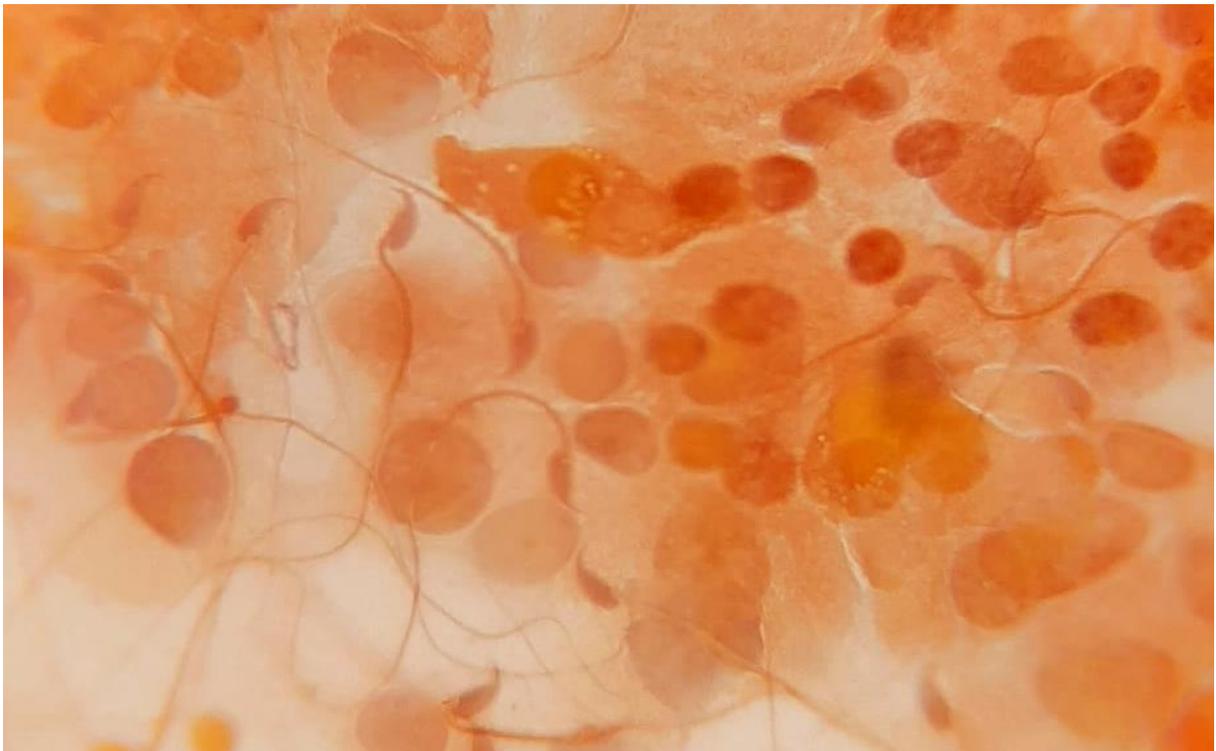


# Búsqueda de potenciales biomarcadores lipídicos de fertilidad masculina

---

## Search for lipid biomarkers of male fertility



Máster de Biomedicina; Universidad de La Laguna; Curso 2020-2021

### **Trabajo de Fin de Máster**

**Elena Mesa Provecho**

Tutorizado por:

Dr. José Antonio Pérez Pérez y Dra. Diana Botelho Reis

Dr. José Antonio Pérez Pérez, componente/coordinador del Grupo de Investigación NUTRAHLIPIDS y Dra. Diana Botelho Reis adscritos a la Titulación Máster en Biomedicina por la ULL

**CERTIFICAN:**

- Que el Trabajo Fin de Máster (TFM) titulado “Búsqueda de potenciales biomarcadores lipídicos de fertilidad masculina”, ha sido realizado bajo nuestra supervisión por D<sup>a</sup> Elena Mesa Provecho, matriculada en el Máster en Biomedicina, durante el curso académico 2020-2021.
- Que una vez revisada la memoria final del TFM, damos nuestro consentimiento para ser presentado a la evaluación (lectura y defensa) por el Tribunal designado por la Comisión Académica de la Titulación.
- Que se ha indicado expresamente, a través del mecanismo de entrega de la memoria TFM por sede electrónica ULL, el deseo de hacer público o no los resultados del TFM.

Para que conste, se firma el presente certificado en La Laguna a 7 de septiembre de 2021.

Dr. José Pérez Pérez

Dra. Diana Botelho Reis



Escuela de Doctorado y Estudios de Posgrado. Edificio Central. Campus Central. 38071 La Laguna.  
C/ Delgado Barreto S/N, Tfno. (00 34) 922 31 9000  
<http://www.esuelas.ull.es/view/centros/escueladoctorado/inicio-master@ull.es>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3779985 Código de verificación: TqquJLKO

Firmado por: José Antonio Pérez Pérez  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 07/09/2021 13:48:10

## Índice

Resumen.....	1
1. Introducción .....	3
2. Hipótesis .....	8
3. Objetivos .....	8
4. Material y métodos.....	9
4.1. Animales de experimentación.....	9
4.2. Extracción de esperma.....	9
4.3. Espermiograma.....	12
4.4. Análisis lipídico.....	18
4.5. Análisis estadístico .....	22
5. Resultados y Discusión .....	23
5.1. Peso medio de los ejemplares y peso medio testicular.....	23
5.2. Extracción de esperma.....	24
5.3. Espermiograma.....	25
5.4. Contenido de lípido total y perfil de clases lipídicas del esperma de ratón .....	28
5.5. Perfil de ácidos grasos del esperma de ratón .....	32
6. Conclusiones .....	39
7. Bibliografía .....	40
Anexo: estudio lipídico del pienso .....	46

## Resumen

Actualmente, alrededor de 186 millones de personas padecen problemas de fertilidad, lo que ha generado un creciente interés en el estudio de esta patología. El presente trabajo pretende evaluar potenciales biomarcadores de calidad espermática y/o fertilidad a través de los parámetros clásicos estudiados en el espermograma, y del análisis comparado detallado del perfil lipídico del esperma de dos cepas de ratón, CD-1, con mayor índice de éxito reproductivo, y C57BL/6 con un índice más bajo. Además, se valora el uso de distintas técnicas para la extracción de esperma, la extracción clásica (EC) y la extracción alternativa (EA), observando resultados considerablemente mejores con la EA. Papanicolau modificada y hematoxilina-eritrosina fueron las técnicas de coloración de frotis que mejores resultados proporcionaron. Los resultados obtenidos para los parámetros celulares del espermograma no mostraron diferencias significativas entre grupos. El estudio lipídico del esperma reflejó diferencias significativas en la proporción de colesterol (CHO), siendo más abundante en CD-1, mientras que entre los ácidos grasos, cabe destacar el ácido araquidónico (ARA), un ácido graso poliinsaturado de la serie omega-6, que resultó estar más representado en la cepa CD-1, lo cual podría relacionarse con su posible rol en la fertilidad masculina.

**Palabras clave:** esperma, ratón, lipidómica, ácido araquidónico, biomarcador, fertilidad, calidad espermática.

## Abstract

Nowadays, about 186 million people suffer from fertility problems, which has generated a growing interest in the study of this pathology. The present work aims to evaluate potential biomarkers of sperm quality and/or fertility through the classical parameters studied in the spermogram, and the detailed comparative analysis of the sperm lipid profile of two mouse strains, CD-1, with a higher reproductive success index, and C57BL/6 with a lower index. In addition, the use of different techniques for sperm extraction, classical extraction (CE) and alternative extraction (AE), is evaluated, showing considerably better results with AE. Modified Papanicolau and hematoxylin-

erythrosin were the smear staining techniques that provided the best results. The results obtained for the cellular parameters of the spermiogram showed no significant differences between groups. The sperm lipid study showed significant differences in the proportion of cholesterol (CHO), being more abundant in CD-1, while among the fatty acids, arachidonic acid (ARA), a polyunsaturated fatty acid of the omega-6 series, was more represented in the CD-1 strain, which could be related to its possible role in male fertility.

**Keywords:** sperm, mouse, lipidomics, arachidonic acid, biomarker, fertility, sperm quality.

## 1. Introducción

En los últimos años y a nivel global, los problemas de fertilidad se han hecho cada vez más evidentes, suponiendo una problemática no solo individual o de pareja, sino también a nivel social y económico. La infertilidad afecta a millones de personas en edad reproductiva. Las estimaciones sugieren que globalmente existen alrededor de 48 millones de parejas y 186 millones de personas que viven afectados por esta condición (Boivin et al., 2009; Mascarenhas et al., 2012; Rutstein & Shah, 2004). Esto ha hecho que la Sociedad Española de la Fertilidad (SEF) hable de una “epidemia de infertilidad”. Dada su importancia y su repercusión, la Organización Mundial de la Salud (OMS) junto con el Comité Internacional para la Supervisión de las Técnicas de Reproducción Asistida reconocieron oficialmente a la infertilidad como una enfermedad del sistema reproductor en 2009 (Zegers-Hochschild et al., 2009). La OMS define a la infertilidad como “la ausencia de embarazo tras 12 meses o más de relaciones sexuales sin empleo de métodos anticonceptivos”.

Aunque tradicionalmente se ha asociado los problemas de fertilidad a la mujer, este fenómeno afecta a ambos sexos, siendo en torno a la mitad de los casos consecuencia del factor masculino (Evenson et al., 1999). Aunque la infertilidad masculina puede ser causada por un gran número de factores, en hasta el 25% de los casos es idiopática (Evenson et al., 1999). Según una declaración reciente de la OMS, las principales causas de infertilidad en el aparato reproductor masculino son: 1) obstrucción del tracto reproductivo causando disfuncionalidades en la eyeción del semen; 2) trastornos hormonales; 3) baja producción de espermatozoides (concentración espermática); 4) función y calidad anormales de los espermatozoides, en relación a la morfología y a la movilidad; 5) factores ambientales y de estilo de vida como el tabaquismo, la ingesta excesiva de alcohol y la obesidad (Gore et al., 2015; Segal & Giudice, 2019).

El seminograma o espermiograma, es una prueba diagnóstica cuyo objetivo es valorar la calidad del semen. Se estudian determinados parámetros macroscópicos, como el pH y el volumen, así como parámetros de tipo microscópico como la morfología, la movilidad y la concentración de espermatozoides. Hoy en día, los seminogramas representan el examen diagnóstico inicial, así como el más importante y sencillo para iniciar el estudio de un posible factor masculino de infertilidad. Aportan información sobre la

espermatogénesis y la condición fisiológica de los tejidos comprometidos, permitiendo diagnosticar el estado funcional o las anomalías presentes en los distintos órganos que producen el semen (Espinoza-Navarro & Sarabia, 2011; Serrano, 2012)

Desde hace varias décadas, la OMS ha publicado una serie de manuales para el análisis del semen que permiten tomar valores de referencia y estandarizar los parámetros evaluados durante el espermiograma. En el año 2010, esta Organización publicó la 5ª edición del manual, que además, incluye valores de referencia para estudios que actualmente se realizan para evaluar la función espermática como la integridad de las membranas, la determinación de anticuerpos anti-espermatozoides y de especies reactivas de oxígeno (ROS, *del inglés Reactive Oxygen Species*), fragmentación del DNA, etc.

En España, las investigaciones realizadas en los últimos años muestran una tendencia clara en cuanto a la disminución de la calidad espermática, en estudios a corto (Mendiola et al., 2013) y largo plazo (Corrales et al., 2011). Por otro lado, también se cuestiona la relevancia de los parámetros estudiados en los análisis estándar, describiéndose como pobres indicadores de la calidad espermática.

En el año 2000, el Dr. Richard M. Sharpe de la Universidad de Edimburgo (Escocia) escribió: “Uno de los más tristes aspectos científicos de la reproducción humana e infertilidad es nuestra persistente ignorancia sobre las causas y el tratamiento de la infertilidad masculina” (Sharpe, 2000). Tras más de 20 años, a pesar de los grandes avances logrados en reproducción asistida y las cada vez más numerosas investigaciones del factor masculino en la infertilidad, esta afirmación prevalece. Se hace evidente pues, la necesidad de explorar nuevas ramas y aplicar nuevos enfoques que nos aporten información sobre las causas y factores de riesgo de la infertilidad masculina, que abran el paso a nuevos tratamientos y nos permitan encontrar biomarcadores de utilidad para su diagnóstico.

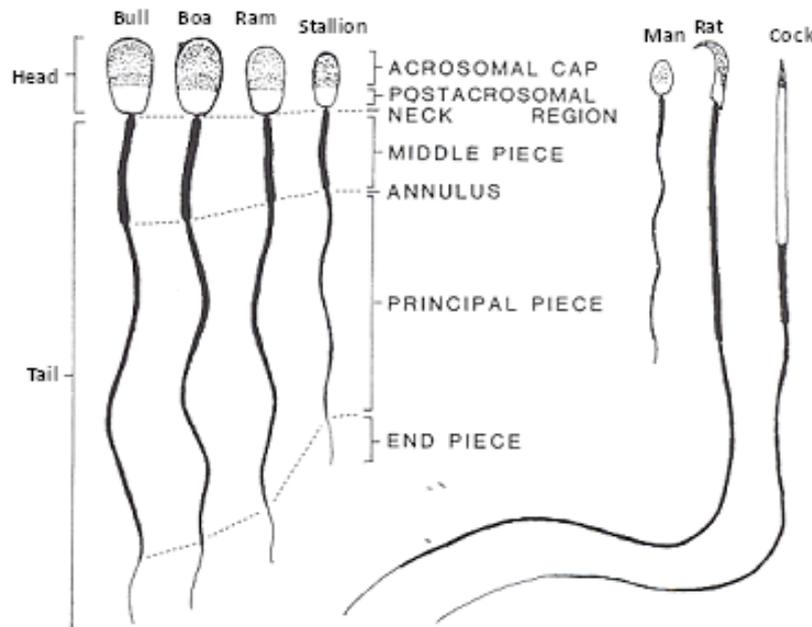
A principios de los años 2000, empiezan a surgir las conocidas como ciencias “ómicas”, como la genómica, la transcriptómica y la proteómica. Estas ómicas suponen un nuevo enfoque multidisciplinar cuyo objetivo general es identificar, caracterizar y cuantificar todas las moléculas biológicas que intervienen en la estructura, la función y la dinámica de una célula, un tejido o un organismo (Vailati-Riboni et al., 2017). Años después del

nacimiento de estas ómicas iniciales, surgen otras ramas como la lipidómica, en la que nos centraremos en este trabajo.

La lipidómica representa una disciplina emergente que aúna la biología de los lípidos, la tecnología y la medicina, y cuyo objetivo es elaborar un atlas completo del lipidoma celular y tisular (Lam et al., 2017). Esta disciplina, originalmente clasificada como una rama de la metabolómica, se ha convertido en la actualidad en un campo de estudio por sí misma debido a la gran diversidad funcional y estructural de los lípidos junto con su abundancia endógena (Wang et al., 2020). Los avances en lipidómica permiten determinar alteraciones del perfil lipídico, así como su relación con distintos trastornos fisiológicos y patologías. Permiten detectar alteraciones en el metabolismo de los lípidos además de las modulaciones de estas moléculas en las diferentes rutas. Esto, a su vez, contribuye al descubrimiento y caracterización de nuevos biomarcadores y a comprender la asociación y mecanismos de acción de los lípidos en diversas patologías. Además, aporta vías para la prevención, el diseño de fármacos y el tratamiento de estas dolencias actuando sobre el impacto o la alteración de los lípidos (Zárate et al., 2017).

El estudio de la fertilidad masculina también ha sido abordado desde la lipidómica, aportando un nuevo enfoque y estudiando en detalle las características lipídicas de la membrana de los espermatozoides. Los espermatozoides son células haploides que constituyen los gametos masculinos. Se trata de células altamente diferenciadas que se forman a partir de células madre diploides, espermatogonias, durante un proceso de diferenciación denominado espermatogénesis que tiene lugar en los tubos seminíferos de los testículos. Cuando salen del testículo, estos espermatozoides siguen siendo inmaduros y deben pasar por una serie de modificaciones para adquirir la capacidad de fecundar al ovocito. En líneas generales, los espermatozoides están formados por una cabeza, una pieza media y una cola, como se muestra en la Imagen 1 (Garner & Hafez, 2000). Estas células carecen de la mayor parte de los orgánulos, y en ellas no se produce síntesis de proteínas ni transporte de vesículas (Flesch & Gadella, 2000). A pesar de ello, cuentan con capacidades glicolíticas y respiratorias dado la necesidad y relevancia de su motilidad (Vazquez & Roldan, 1997). Además, cuentan con la capacidad de sintetizar lípidos *de novo* (Svetlichnyy et al., 2014; Vazquez & Roldan, 1997). La membrana plasmática de los espermatozoides no solo es vital para la protección de la célula, sino que desempeña

un papel crucial durante la capacitación de los espermatozoides, en la interacción espermatozoide-ovocito y, finalmente, en la fecundación (Tapia et al., 2012).



**Imagen 1.** Esquema de las estructura básica del espermatozoide en distintos animales (Garner & Hafez, 2000).

La distribución de los lípidos en la membrana de los espermatozoides presenta una distribución heterogénea y asimétrica, siendo la composición lipídica de la cabeza y la cola diferentes dada la distinta función de cada una de ellas (Oresti et al., 2011). La membrana de los espermatozoides sufre diversos procesos de modificación de sus lípidos, relacionados con los diferentes requerimientos fisiológicos a lo largo de su vida (Shan et al., 2021). Durante la maduración en el epidídimo, se producen eventos de liberación, modificación y también adsorción de lípidos (Christova et al., 2004; Fleisch & Gadella, 2000). Posteriormente, en el tracto reproductor femenino se producen nuevas modificaciones como el aumento de la fosfatidilcolina (PC), observada *in vivo* en presencia de las secreciones del tracto femenino (Evans et al., 1980). Otros cambios en la membrana plasmática como la alteración de la composición lipídica y la asimetría de los fosfolípidos transmembrana, la difusión lateral de los fosfolípidos, la pérdida de colesterol y la reorganización de los dominios estructurales resistentes a los detergentes tienen lugar durante el proceso de capacitación (Boerke et al., 2008; Companyó et al.,

2007; Zigo et al., 2020). También las alteraciones de la membrana que permiten la adhesión de los espermatozoides al epitelio del istmo hasta que se produzca la ovulación (Shan et al., 2021) y el posterior desprendimiento de dicho epitelio (Bianchi & Wright, 2016) son vitales para que se produzca la correcta fertilización del ovocito.

Como fin último, la membrana plasmática del espermatozoide se fusiona con la del gameto femenino, dando lugar a un cigoto. Como podemos ver, los lípidos juegan un importante papel en los procesos de fertilización, por lo que la función de estos compuestos en la fertilidad masculina está recibiendo una atención investigadora creciente durante los últimos años (Shan et al., 2021).

Aunque existe gran cantidad de estudios llevados a cabo en humanos, centrados sobre todo en la búsqueda de marcadores de viabilidad de la membrana tras procesos de criopreservación, éstos suponen una serie de desventajas frente al estudio en modelos de experimentación animal. El estudio con animales nos asegura una homogeneidad en las muestras que resulta imposible en humanos. Dado el carácter preliminar de este estudio, se hizo uso de muestras procedentes de dos cepas distintas de ratón, *Mus musculus*, con distinto índice de éxito reproductivo: la línea CD-1, no consanguínea, con mayor índice reproductivo, y la cepa C57BL/6, con un índice menor. De esta manera, tratamos de obtener resultados iniciales que sirvan de punto de partida para futuros ensayos de fertilidad masculina en distintas condiciones y/o con muestras humanas.

## 2. Hipótesis

Dada la relevancia de los lípidos en los procesos de fertilidad masculina, podrían existir diferencias en la composición lipídica de los espermatozoides de la línea CD-1 y la cepa C57BL/6 que determinen su distinto índice de éxito reproductivo. Por otro lado, podría darse una correlación entre los resultados obtenidos para la evaluación de la calidad espermática mediante espermograma y los resultados obtenidos en el estudio lipídico.

## 3. Objetivos

El principal objetivo del presente estudio fue evaluar posibles biomarcadores lipídicos asociados a eventos de infertilidad masculina utilizando dos cepas de ratones con distinto índice de éxito reproductivo.

Para la consecución de este objetivo general, se abordaron los siguientes objetivos específicos:

1. Optimizar el protocolo de extracción y procesamiento de las muestras de esperma.
2. Cuantificar el lípido extraíble de muestras de esperma.
3. Determinar el perfil de clases lipídicas del esperma de los dos grupos de estudio.
4. Determinar la composición de ácidos grasos del esperma de los dos grupos de estudio.

## 4. Material y métodos

### 4.1. Animales de experimentación

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron un total de 10 muestras de esperma de ratón procedentes de dos grupos bien diferenciados; 5 muestras de ratones pertenecientes a la cepa CD-1 y otras 5 de la cepa C57BL/6. Dada la pequeña cantidad de esperma extraíble por animal, cada una de las muestras analizadas estaba conformada por un pool de 3 ratones.

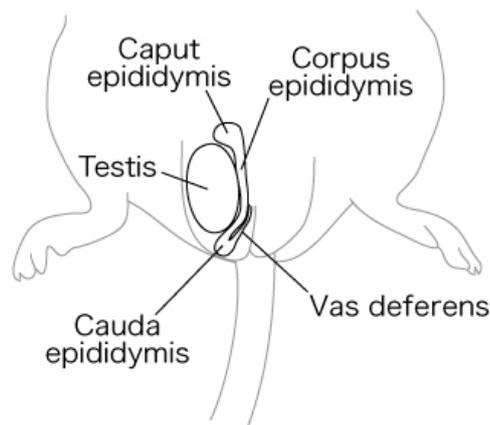
Todos los animales utilizados fueron machos en edad reproductiva de entre 12-15 semanas de edad, procedentes del Estabulario del Servicio General de Apoyo a la Investigación (SEGAI) de la Universidad de La Laguna. Los animales se estabularon en jaulas de 380 x 200 x 590 mm en grupos de 15 individuos y fueron mantenidos bajo las siguientes condiciones ambientales controladas: ciclo de 12 horas de luz (7h-19h) y 12 h de oscuridad (19h-7h), 22°C de temperatura y una humedad relativa del 50%. Los animales fueron alimentados con pienso comercial (Teklad Global Diet, Envigo RMS, Barcelona, España), con una composición proximal de 20% proteína, 67% hidratos de carbono y 13% grasa (para más información sobre el pienso ver Anexo), teniendo libre acceso a comida y agua. El cuidado y tratamiento de los animales se realizó siguiendo las directrices institucionales en cumplimiento del Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero (BOE, 8 de febrero de 2013, núm. 34, p. 11370-11421) y las leyes y políticas internacionales (Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, del 22 de septiembre de 2010) sobre protección de los animales utilizados para experimentos y otros propósitos científicos.

### 4.2. Extracción de esperma

Previa a la extracción del esperma, se sacrificó a los animales mediante dislocación cervical. Una vez sacrificado, se pesó cada animal y se extrajeron y pesaron sus testículos.

Se utilizaron dos técnicas distintas de extracción con el fin de valorar la eficiencia y calidad de cada una de ellas:

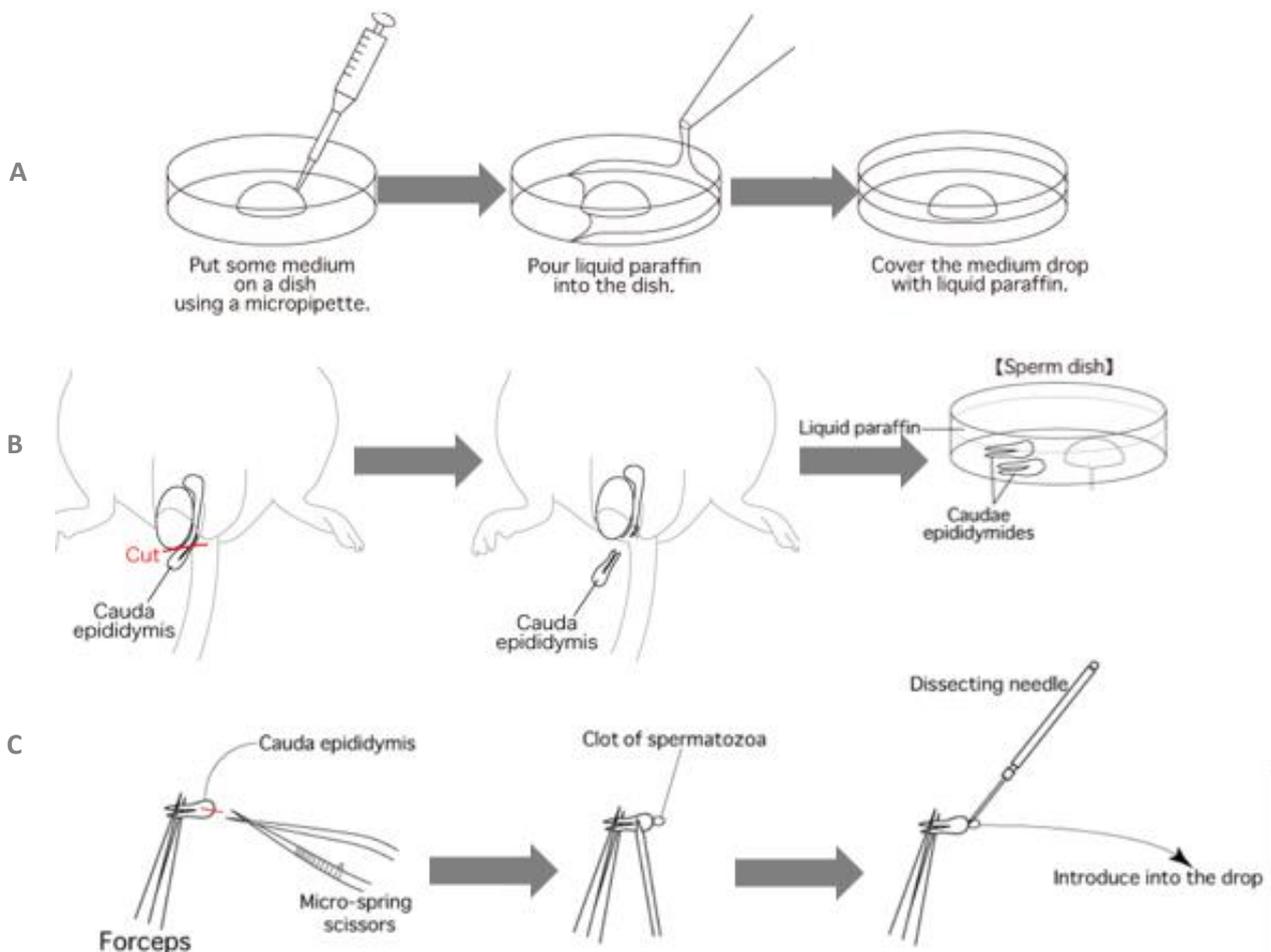
1) La primera de las técnicas utilizada, a la que denominaremos a partir de este momento “extracción clásica” (EC), consistió en extraer la región caudal del epidídimo junto con una sección de aproximadamente 3-4 cm del conducto deferente (Imagen 2). A continuación, se procedió a su limpieza mediante el uso de material quirúrgico, asegurando en todo momento que no quedaran restos de sangre y/o grasa. El tejido limpio se pasó a una placa de Petri de 35 mm de diámetro con 800  $\mu$ L de medio M2 (Sigma-Aldrich, USA) y se mantuvo en el incubador a una temperatura de 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 80% de humedad durante 5 minutos. Transcurrido ese periodo, se sacó del incubador y mediante el uso de pinzas quirúrgicas se presionó el epidídimo caudal durante ~45 segundos. Con ayuda de otra pinza se apretó cuidadosamente el conducto deferente en sentido descendente desde la base del epidídimo hasta el extremo del conducto, desplazando los espermatozoides hacia el exterior a través del conducto deferente, quedando los espermatozoides suspendidos en el medio.



**Imagen 2.** Esquema de los componentes estructurales en el escroto de ratón. Obtenida del Manual de Técnicas de ingeniería reproductiva en ratones de la Universidad de Kumamoto (Japón).

2) En la segunda técnica, a la que llamaremos “extracción alternativa” (EA) (Imagen 3), el primer paso consistió en la preparación de placas de Petri de 35 mm, pipeteando 100  $\mu$ L de medio M2 (Sigma-Aldrich) en el centro de esta y vertiendo aceite mineral hasta llenar la placa y cubrir la gota central de medio M2 previamente dispuesta. Tras ello, las placas fueron almacenadas en el incubador en las mismas condiciones anteriormente

descritas hasta su utilización. En esta técnica, al contrario que en la anterior, solo se extrajo la sección caudal del epidídimo y no el conducto deferente. Una vez extraído y limpio, se introdujo el epidídimo caudal en el aceite mineral. Mediante unas tijeras de microcirugía se realizó un corte perpendicular al dorso del epidídimo, y presionando ligeramente con ayuda de un punzón o pinzas se facilitó la salida del espermatozoides por dicho corte que, al contacto con el aceite mineral, formó una micela que se arrastró hacia la gota central de medio. Para favorecer la disgregación de esta micela en el medio, se introdujo nuevamente la placa en el incubador durante 5 minutos. Tras este periodo, se agitó ligeramente la placa mediante movimientos circulares y se pasó la gota de medio con los espermatozoides a un tubo Eppendorf.



**Imagen 3.** Protocolo extracción alternativa. A. Preparación de las placas. B. Corte, extracción e introducción del epidídimo caudal en la placa. C. Extracción del espermatozoides. Imagen modificada obtenida del Manual de Técnicas de ingeniería reproductiva en ratones de la Universidad de Kumamoto (Japón).

En ambos procedimientos, tras la extracción del espermatozoide, se tomó un pequeño volumen para desarrollar el espermiograma y se conservó el resto a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de desarrollar su análisis lipídico.

### 4.3. Espermiograma

Parte de los procedimientos llevados a cabo en esta investigación para analizar los parámetros relacionados con la calidad espermática fueron desarrollados con muestras en fresco, mientras que otros requirieron la fijación de frotis.

#### **Análisis en fresco:**

Con las muestras en fresco se probaron distintos procedimientos para determinar, 1) Porcentaje de movilidad, 2) Aglutinación, 3) Concentración espermática y 4) Vitalidad.

**1) Porcentaje de movilidad** → El porcentaje de espermatozoides móviles se valoró visualmente. Se pipetearon  $10\text{ }\mu\text{L}$  de una dilución 1:10 de la muestra sobre un porta y se colocó un cubre sin presionar. Una vez en el microscopio, con el aumento de 40X, se seleccionaron inicialmente 2 campos visuales y se valoró el porcentaje de espermatozoides móviles en cada uno de ellos para obtener un valor medio. En el caso de que existiera una diferencia de más de 30 puntos porcentuales entre las zonas seleccionadas, se tomó un tercer campo con el fin de corregir errores. Se valoró por una parte si existía o no movimiento, y por otra, si este era progresivo, entendiendo por progresivo a aquel movimiento que implica desplazamiento del espermatozoide.

**2) Aglutinación** → La aglutinación se valoró en base a los criterios recogidos en el Manual de Laboratorio para el examen y procesamiento de semen humano de la Organización Mundial de la Salud (5ª Edición) (Cao et al., 2011). Se entiende por aglutinación, a la presencia de cúmulos de espermatozoides móviles que se encuentran adheridos entre sí de diversas maneras, cabeza con cabeza, cola con cola o de forma mixta (Imagen 4). No se debe confundir la aglutinación con la agregación; esta última, se refiere a la presencia de espermatozoides móviles unidos a restos celulares o a espermatozoides muertos. El grado de aglutinación depende, por una parte, del número

de espermatozoides que se encuentran adheridos, y por otra, del lugar por el que se produce la adhesión.

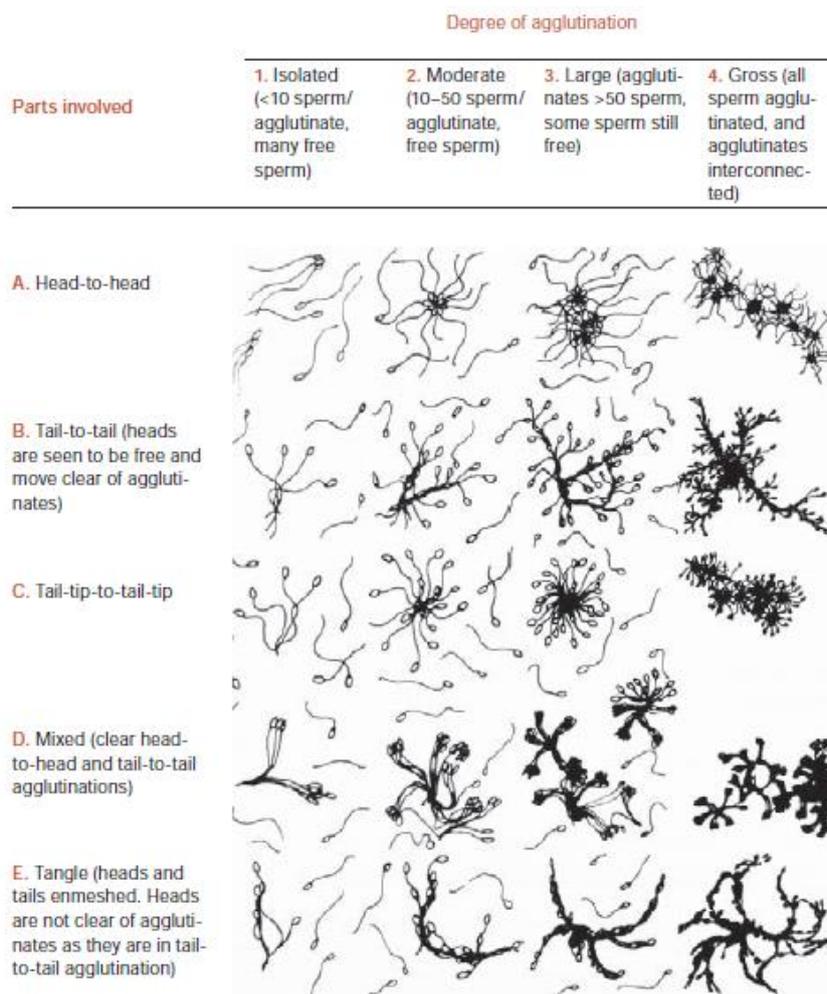
En relación al número, existen 4 grados de aglutinación:

*Grado 1 - Aglutinación aislada:* aglutinaciones conformadas por menos de 10 espermatozoides, con gran cantidad de espermatozoides libres.

*Grado 2 - Aglutinación moderada:* adhesiones de entre 10-50 espermatozoides, presencia de espermatozoides libres.

*Grado 3 - Aglutinación elevada:* aglutinaciones de más de 50 espermatozoides, baja presencia de espermatozoides libres.

*Grado 4 - Aglutinación grave:* no hay espermatozoides libres, todos se encuentran formando aglutinaciones que se interconectan.



**Imagen 4.** Diagrama esquemático de los diferentes grados y tipos de agregación espermática (Rose, 1976).

Respecto a las zonas involucradas a la adhesión, se clasifican las aglutinaciones en: *Tipo A* - adhesión cabeza-cabeza; *Tipo B* - adhesión cola-cola; *Tipo C* - entre las puntas de las colas; *Tipo D* – mixta (cabeza-cabeza y cola-cola); *Tipo E* - enredada (Rose, 1976).

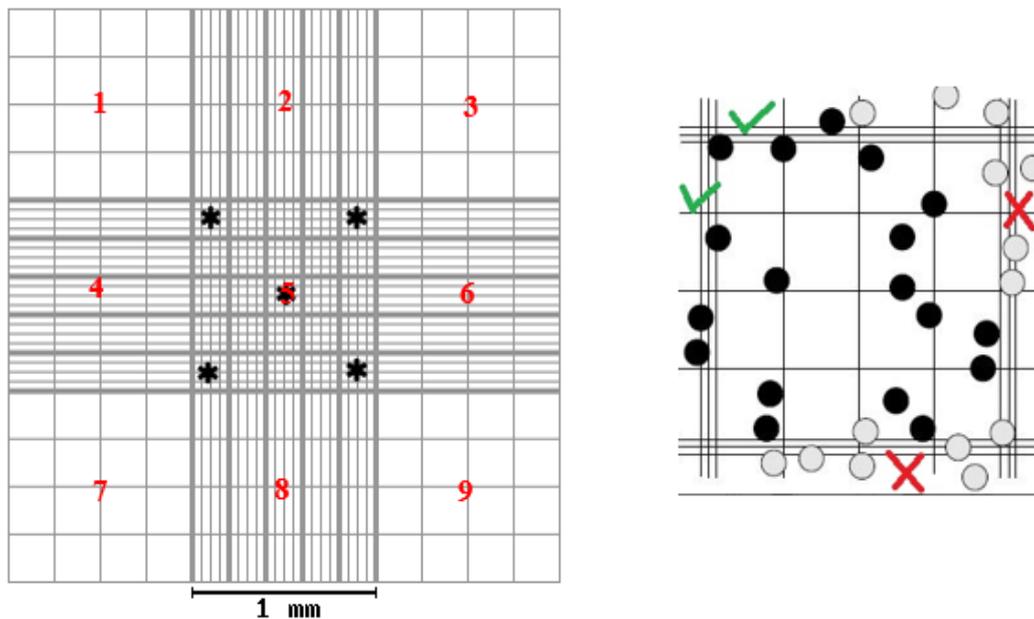
Para valorar la aglutinación, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:10 de la muestra, se colocaron sobre un porta y se colocó un cubre sin presionar. En el microscopio, con el aumento de 40X, se realizó un barrido a lo largo de todo el porta para determinar grado y tipo de aglutinación predominante.

- 3) Concentración espermática** → Para la determinación de la concentración espermática, se utilizó la misma cantidad y dilución que en los procedimientos anteriores. El conteo se llevó a cabo mediante el uso de una cámara de Neubauer.

La cámara de Neubauer está compuesta por 2 áreas separadas para el conteo, cada una con un patrón cuadrado idéntico. Como se ilustra en la imagen 5, cada zona está compuesta por 9 cuadrados grandes de  $1 \text{ mm}^2$ . El central (5), a su vez se encuentra dividido en 25 cuadrados secundarios más pequeños, de  $0,04 \text{ mm}^2$ , divididos en 16 cuadrados terciarios de  $0,004 \text{ mm}^2$ . El número de espermatozoides se determinó en 5 de los cuadrados secundarios de  $0,04 \text{ mm}^2$ . Teniendo en cuenta que se usaron ambas zonas de conteo, de cada muestra se contaron 10 cuadrados secundarios. Para contabilizar las células en los márgenes, sobre las líneas divisorias de cada cuadrado secundario, se utilizó siempre el mismo patrón, contabilizándose únicamente aquellas que se encontraran sobre el margen superior y derecho, e ignorando las que estuvieran sobre los dos márgenes restantes. Mediante el conteo en cámara, conociendo el área utilizada, la profundidad de la cámara y el factor de dilución, se determinó la concentración espermática de la muestra.

- 4) Vitalidad espermática** → La vitalidad se valoró al mismo tiempo que se realizó el conteo en la cámara de Neubauer. Para ello, se utilizó la prueba de exclusión de tinción mediante una solución de trypan-blue al 0,4% (ThermoFisher Scientific, USA). Esta prueba se basa en que las células viables, que mantienen la integridad de su membrana,

son impermeables al colorante y se mantienen incoloras, mientras que las células muertas se tiñen de azul. De este modo, añadiendo el colorante durante el conteo, es posible determinar la proporción de espermatozoides vivos.



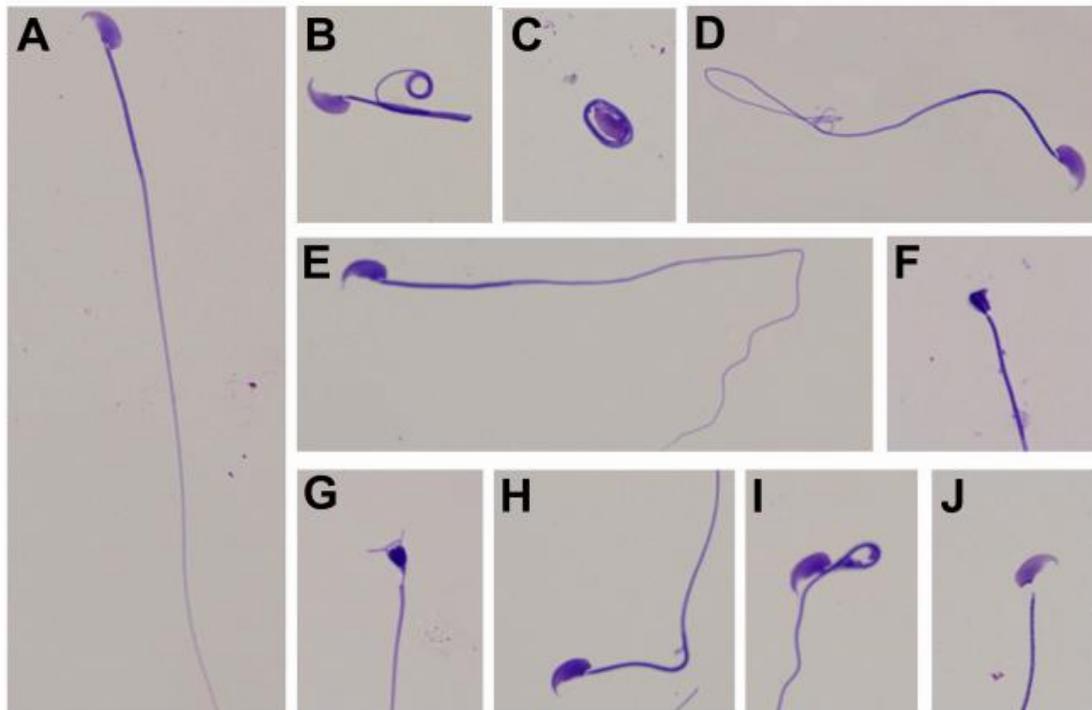
**Imagen 5.** Diagrama esquemático de la cámara de Neubauer. A la izquierda, imagen de la zona de conteo, numerados del 1 al 9 los cuadrados primarios, con asteriscos marcados los cuadrados secundarios en los que se realizó el conteo. A la derecha, esquema de un cuadrado secundario, los círculos oscuros representan las células que habría que contar, incluyendo aquellas en los márgenes.

### Análisis de la morfología. Tinción de frotis teñidos

Para el estudio morfológico diferenciamos entre los espermatozoides de apariencia normal, que siguen el esquema de la imagen 6 (Panahi et al., 2017), y aquellos con distintas anomalías morfológicas como las que se observan en la imagen 7 (Bruner-tran et al., 2014).



**Imagen 6.** Esquema de la morfología normal de un espermatozoide de ratón (Panahi et al., 2017).



**Imagen 7.** Anomalías morfológicas de los espermatozoides. A → Espermatozoide normal; B-E → Defectos comunes de la cola; F → Defecto del acrosoma; G → cabeza deforme; H-I → Defectos de la pieza media; J → Espermatozoide decapitado (Bruner-tran et al., 2014).

El estudio morfológico se realizó mediante distintas tinciones de frotis fijados, 1) Diff-Quik, 2) Papanicolau modificada y 3) hematoxilina-eritrosina.

Para la realización de los frotis, se utilizó una dilución 1:10 de la muestra de espermatozoides. Se tomó una alícuota de 5  $\mu$ L de dicha dilución y se dispuso con una pipeta en uno de los extremos del porta. Con la ayuda de un cubre, se esparció la alícuota a lo largo del porta aplicando una ligera presión y se dejaron secar los frotis al aire.

En este trabajo, se probaron dos técnicas para realizar el secado y la fijación de los frotis: (I) La primera de ellas consistió en dejar secar totalmente el frotis durante aproximadamente 15 minutos para posteriormente fijarlos con un spray de metanol.

(II) Alternativamente, se probó una fijación de frotis semi-húmedos, dejándolos secar entre 1-3 minutos antes de introducirlos en etanol al 95%.

Previa tinción, los frotis se hidrataron mediante inmersión en alcoholes de concentración decreciente (70% y 50%) durante 10 minutos antes de pasarlos a agua destilada. Igualmente, tras la tinción, los portas se deshidrataron haciendo uso de etanol absoluto y baños seriados de tolueno para finalmente montar con el medio de montaje Eukitt.

**1) Diff Quik** (RAL DIFF-QUIK™) → Para esta tinción, se utilizó el primer método de fijación. En base al protocolo de la casa comercial, no se llevó a cabo la hidratación del frotis, por lo que tras la aplicación del fijador (metanol) se procedió directamente a su tinción. El kit comercial RAL DIFF-QUIK™ (Ral Diagnostics, Francia) que se utilizó, cuenta con tres soluciones: la solución fijadora, la solución I, que contiene un colorante aniónico, la eosina Y, y la solución II, que contiene colorantes de tiazina (colorantes catiónicos) compuesta por azul de metileno y azure A. Los colorantes fueron aplicados en el orden y de la manera indicada en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Procedimiento con inmersiones en cada reactivo para la tinción Diff-Quik.

Reactivos	Aplicación
Solución I	3 inmersiones
Solución II	5 inmersiones
Agua destilada	2 inmersiones
Montaje	

**2) Hematoxilina-eritrosina** → Esta tinción nos permite diferenciar fácilmente los núcleos, teñidos de azul por la hematoxilina (basófila), del citoplasma, que adopta el color rosado de la eritrosina. El procedimiento y tiempos empleados se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Procedimiento con tiempos en cada reactivo para la tinción de hematoxilina-eritrosina.

Reactivos	Tiempo
Hematoxilina de Harris	2 minutos
Agua corriente	5 minutos
Agua destilada	2 minutos
Eritrosina	2 minutos
Lavado rápido en agua destilada	

**3) Papanicolau modificada** → La tinción de Papanicolaou utiliza tres colorantes: la hematoxilina, que tiñe selectivamente los núcleos, el Orange G, con gran afinidad por las proteínas, y la eosina, que tiñe los citoplasmas. Tradicionalmente, esta tinción utiliza eosina A50 (EA), que está constituida por verde luz y café Bismark. En este estudio, se sustituyó el uso de la EA por eosina B, también conocida como eritrosina. El procedimiento se indica en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Procedimiento con tiempos en cada reactivo para la tinción modificada de Papanicolau.

Reactivos	Tiempo
Hematoxilina de Harris	2 minutos
Agua corriente	5 minutos
Agua destilada	2 minutos
Eritrosina al 1%	3 minutos
Lavado rápido en agua destilada	
Orange G	1 minuto
Para reducir el exceso de Orange G, se secó brevemente con un fragmento de papel de filtro	
Deshidratación y montaje	

La observación de los frotis ya teñidos se realizó mediante un microscopio óptico, Leica DM4000B (Leica Microsystem, Alemania), utilizando para la captura de imágenes una cámara digital Leica DFC3000FX, acoplada al software Leica Q-Win (Leica, Barcelona, España) para el tratamiento y análisis de imagen.

#### 4.4. Análisis lipídico

El estudio lipídico consistió en valorar el contenido lipídico de las muestras analizadas, así como su composición, a través del análisis de la proporción de las distintas clases lipídicas y su perfil de ácidos grasos.

### **Extracción del lípido total**

Para determinar el contenido lipídico de las muestras de espermatozoides de ratón de las diferentes cepas, se realizó una extracción lipídica siguiendo el método descrito por Folch et al. (1957) modificado por Christie (2003). Para ello, se cogieron 100  $\mu\text{L}$  de espermatozoides en un tubo de ensayo al cual se añadieron 8 mL de cloroformo/metanol (CL:MET, 2:1 v/v) con 0,01% de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante, y 1,9 mL de cloruro potásico (KCl; 0,88% w/v). Las muestras se homogeneizaron en un vórtex y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos en centrifuga (Beckman Coulter Allegra 25R, IN, USA) a 4  $^{\circ}\text{C}$ , para así separar las sustancias liposolubles, extraídas por el CL:MET, de las sustancias hidrosolubles. Se trasvasó la fase liposoluble a otro tubo de ensayo a través de un filtro de poro 14-18  $\mu\text{m}$  de diámetro (Filter-Lab, Barcelona, España), previamente lavado con CL:MET, para eliminar los residuos sólidos. Se evaporó el solvente bajo atmosfera de nitrógeno y el extracto seco, se traspasó a un vial de 1,7 mL de capacidad, previamente pesado e identificado. El solvente fue nuevamente evaporado bajo atmosfera de nitrógeno y los viales con el extracto seco, colocados en un desecador durante toda la noche, en oscuridad y bajo vacío. Al día siguiente, los viales fueron nuevamente pesados para determinar el contenido lipídico gravimétricamente. Una vez determinado, el extracto fue resuspendido en CL:MET a una concentración de 10 mg/mL y guardado en congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  en atmosfera de nitrógeno hasta la realización de los siguientes análisis.

### **Determinación de la composición de clases lipídicas**

La separación de las diferentes clases lipídicas (CL) se realizó por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, del inglés *High Performance Thin Layer Chromatography*), en placas de sílica gel de 10 cm x 10 cm x 25 mm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), mediante un doble desarrollo unidireccional (Olsen y Henderson, 1989). Las placas, previamente lavadas con éter, se activaron en estufa a  $110^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos para quemar impurezas y eliminar el exceso de humedad de las placas, que fueron mantenidas en un desecador hasta su posterior utilización. Con una microjeringa Hamilton de 10  $\mu\text{L}$  se cargaron las placas con 2  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{g}$ ) de extracto lipídico. En cada placa se cargaron 5 muestras problema y un estándar de composición conocida consistente en un extracto lipídico de huevo de bacalao, además, se dejó una casilla control sin muestra, para la observación y cuantificación de los frentes de solventes. Se

emplearon dos fases móviles diferentes para la separación de los lípidos polares (LP) y de los lípidos neutros (LN). Primeramente, se utilizó una solución de isopropanol, cloroformo, metilacetato, metanol y KCl al 0,25% (5:5:5:2:1,8; v/v) para la separación de los LP y una vez desarrollada hasta el punto medio de la placa, se dejó secar bajo campana extractora durante 5 minutos. A continuación, se separaron los LN mediante una solución de hexano, éter y ácido acético (20:5:0,5; v/v) dejando que se desarrollara hasta 0,5 cm del margen superior de la placa. Una vez finalizada la cromatografía, se tiñeron las placas de manera homogénea con una solución de acetato cúprico al 3% en ácido ortofosfórico al 8%. Posteriormente, las placas se quemaron en una estufa a 160 °C durante aproximadamente 15 minutos para revelar las bandas correspondientes a las distintas CL.

Para la cuantificación de las CL se escanearon las placas en un CAMAG TLC visualizer (CAMAG, Muttenz, Suiza). Se utilizó el software winCATS (versión 1.4.4) para identificar las clases lipídicas y el software VideoScan (versión 1.02) para determinar por densitometría su proporción en cada muestra.

### **Determinación del perfil de ácidos grasos**

Para la determinación del perfil de ácidos grasos (AG) de cada muestra, se realizó la transesterificación de una alícuota del lípido por catálisis ácida, dando lugar a ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, del inglés *Fatty Acid Methyl Esters*) que fueron posteriormente purificados por cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*) y separados, identificados y cuantificados por cromatografía de gases. Durante la transesterificación del extracto de lípido, se rompen los enlaces éster entre los AG y los esqueletos hidrocarbonados y se obtienen ácidos grasos libres, a los cuales se les une un grupo metilo que va a permitir que sean volátiles y así se puedan separar por cromatografía de gases. En este estudio, debido a la reducida cantidad de esperma obtenido y al bajo contenido lipídico del mismo, se utilizó la totalidad del extracto lipídico extraído (entre 0,2-0,6 mg). Se evaporó el solvente en atmósfera de nitrógeno y se añadieron 1 mL de tolueno y 2 mL de ácido sulfúrico al 1% en metanol (v/v) al extracto seco, agitando fuertemente la mezcla en un vórtex. Hecho esto, se llenó el tubo con nitrógeno, se tapó herméticamente y se dejó reaccionar durante 16-18 horas a 50°C en un bloque calefactor y en oscuridad.

Pasado este tiempo, se atemperó la mezcla y se añadieron 5 mL de hexano:éter 1:1 (v/v) con BHT al 0,01% y 2 mL de  $\text{KHCO}_3$  al 2% (w/v), se agitó vigorosamente con vórtex, y posteriormente se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Se obtuvieron dos fases, de las cuales, se trasvasó la fase orgánica (fase superior) a otro tubo de ensayo, mientras al tubo inicial se añadieron otros 5 mL de hexano:éter (1:1, v/v) esta vez sin BHT, agitando y centrifugando nuevamente a 1500 rpm durante 5 minutos. Se recogió nuevamente la fase superior y se trasvasó al tubo que contenía la fase orgánica anterior. El solvente orgánico de ambas fases se evaporó por completo bajo atmosfera de nitrógeno y se procedió a la purificación de los FAME por TLC. Para ello, se utilizaron placas de sílice de 20 cm x 20 cm x 0,25 mm, y para la fase móvil, una solución de hexano, éter y ácido acético (90:10:1, v/v). En cada placa, además de las muestras experimentales, se cargó también una muestra de lípido ya metilada en uno de los laterales de la placa, que actuó como estándar externo, permitiendo identificar la posición de los ésteres metílicos en la misma. Una vez aplicadas las muestras, se colocaron en el interior de una cubeta con la mezcla de solventes y se tapó para proceder al desarrollo de la cromatografía. Una vez desarrolladas, se retiraron las placas de la cubeta y se esperó a que se secasen bajo campana extractora. Entonces, se pulverizó con iodina (1% iodo en cloroformo) de forma homogénea sobre la zona correspondiente al estándar externo y la parte superior de la placa donde se localiza el BHT con el objetivo de conocer la ubicación de los FAMEs de las muestras sin comprometer su integridad con la iodina.

Los FAMEs de las muestras fueron extraídos de la placa mediante raspado, pasados a un nuevo tubo de ensayo al que posteriormente se añadieron 10 mL de hexano:éter (2 mL con BHT y 8 mL sin BHT). Se agitó vigorosamente la mezcla y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. La fase superior se pasó a otro tubo previamente marcado y el solvente se evaporó completamente en presencia de nitrógeno. Los FAME resultantes se resuspendieron en hexano a una concentración de 1mg/mL y se pasaron a viales de cristal previamente identificados que se almacenaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  y bajo atmosfera de nitrógeno, hasta el momento de su análisis por cromatografía de gases.

Los ácidos grasos fueron determinados en un cromatógrafo de gases TRACE-GC (GC-ULTRA TRACE; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) equipado con un detector de ionización de llama (FID, *del inglés Flame Ionization Detector*), utilizando una columna capilar modelo CP9205-VF-WAXms (Agilent Technologies España S.L.,

Madrid, España). La cromatografía de gases separa los ácidos grasos metilados en función de su temperatura de fusión, que viene determinada por su polaridad, la longitud de la cadena hidrocarbonada, el grado de saturación, la serie a la que pertenece, etc. Los cromatogramas con los picos en los tiempos de retención y sus áreas correspondientes son generados gracias al integrador de registro, que son posteriormente transferidos electrónicamente al ordenador para su análisis, almacenamiento y generación de informes. Para la identificación de los ácidos grasos, se confrontaron los cromatogramas de las muestras con una mezcla patrón de ácidos grasos de composición conocida (Mix C4-C24 y PUFA No. 3, Supelco Inc., USA). En este estudio se integraron 35 picos por muestra. Los resultados obtenidos se expresaron en porcentajes de área.

#### 4.5. Análisis estadístico

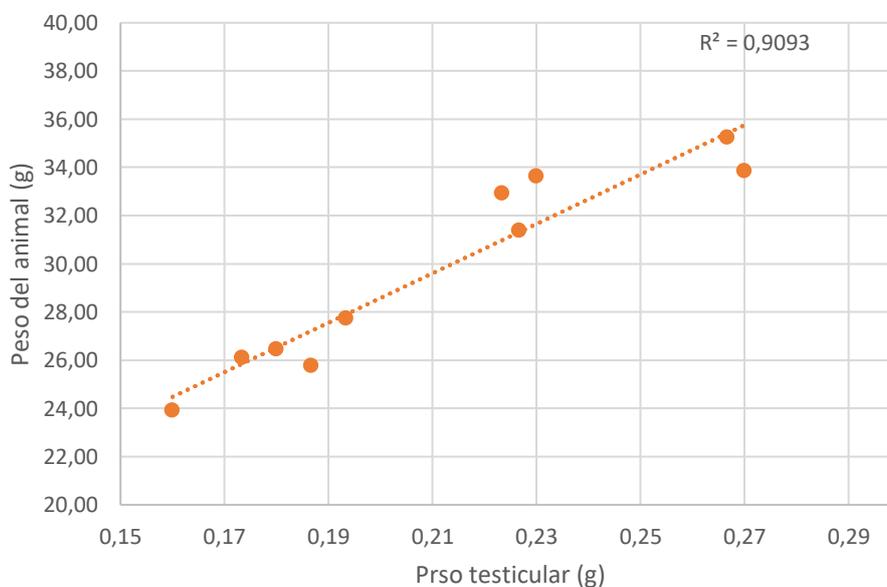
Para el análisis estadístico se utilizó el software IBM SPSS Statistics 25.0 para Windows (SPSS Inc., Nueva York, USA). Se realizó una prueba-t de muestras independientes para determinar si había diferencias significativas en la proporción de ácidos grasos y clases lipídicas entre las cepas de estudio. Se evaluaron los valores atípicos por inspección de los diagramas de caja para cada grupo. La normalidad se verificó por medio del test de Shapiro-Wilk, y la homogeneidad de varianzas por medio de la prueba de Levene. En los casos donde no se verificó la normalidad, se aplicó el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Mediante una prueba-t, y con las mismas consideraciones ya descritas, también se valoró la existencia de diferencias significativas entre los datos de peso de los animales experimentales, peso testicular y LT extraído. Además, se evaluó la correlación entre el peso de los ejemplares y el peso testicular mediante el coeficiente de Pearson dada la distribución normal de los datos. Los resultados obtenidos son expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=5). A lo largo de todo el estudio, se consideró un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Peso medio de los ejemplares y peso medio testicular

El peso medio de los ratones y el peso medio testicular fueron significativamente mayores en la cepa CD-1 ( $33,41 \pm 1,41$  y  $0,24 \pm 0,02$  g, respectivamente), que en la cepa C57BL/6 ( $26,00 \pm 1,38$  g y  $0,18 \pm 0,01$  g, respectivamente). Los pesos individuales y medios de todos los animales experimentales se muestran en la Tabla 4. El test de correlación de Pearson confirma una correlación positiva entre el peso de los ratones y el peso de sus testículos con un valor de  $R^2$  de 0,91, correlación que se representa en el Gráfico 1.

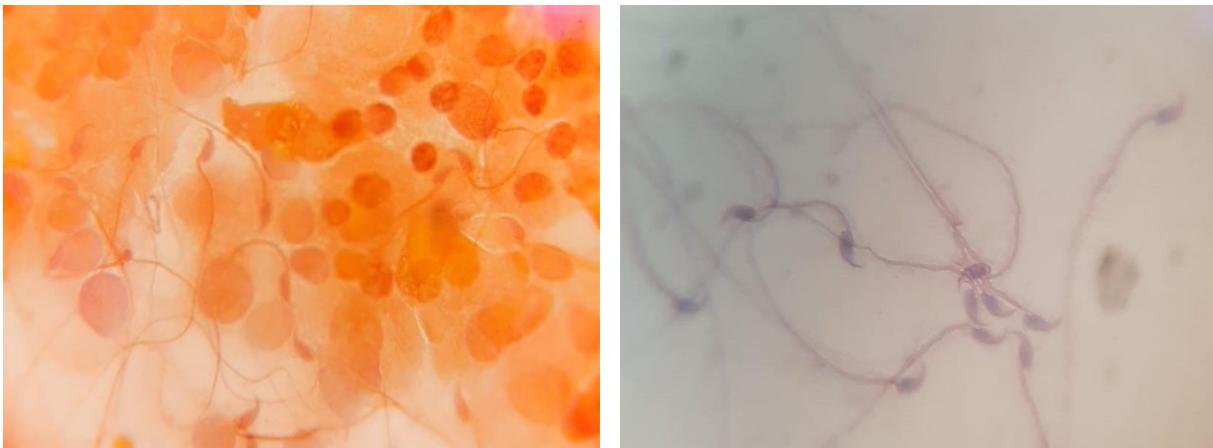
Estas diferencias de peso constituyen uno de los rasgos diferenciables entre las dos cepas de estudio. Es bien sabido que los ratones CD-1, que representan una línea no consanguínea, además de las diferencias en el índice de éxito reproductivo, se caracterizan por tener un mayor tamaño, ser más dóciles, presentar mejores cuidados maternos... Por otro lado, la cepa C57BL/6, una cepa consanguínea con homocigosis para todos los alelos, suelen presentar un tamaño más reducido y son utilizados para otros fines científicos, sobre todo como fondo genético para distintas patologías como la obesidad, síndrome metabólico, etc.



**Gráfico 1.** Correlación entre peso de los ejemplares y el peso testicular.

## 5.2. Extracción de esperma

La valoración de la calidad de las muestras obtenidas mediante el protocolo EC y el protocolo EA se llevó a cabo por medio de distintas tinciones. La extracción clásica (EC) resultó un método sencillo y rápido para la extracción de esperma, sin embargo, tanto en la observación en fresco como en los frotis, se observó gran presencia de células no espermáticas, presumiblemente procedentes del conducto deferente y del epidídimo, así como restos de tejido adiposo (Imagen 7, izquierda). En base a estos resultados se aplicó el método de extracción alternativo (EA), que, a pesar de ser más laborioso, permitió obtener muestras más limpias, sin restos celulares, ni de tejido graso (Imagen 8, derecha), por lo que se seleccionó este método para la obtención de esperma de todas las muestras.

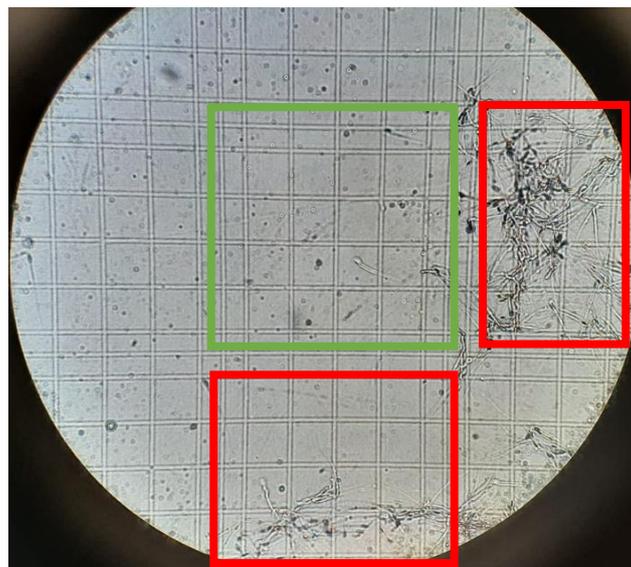


**Imagen 8.** Comparativa entre la técnica de extracción clásica (izquierda) y la extracción alternativa (derecha). A la izquierda, teñida mediante la tinción modificada de Papanicolau, se observan, además de espermatozoides, gran cantidad de células de mayor tamaño y redondeadas, células del conducto deferente. A la derecha, teñida con hematoxilina-eritrosina, se ven únicamente espermatozoides.

Los depósitos grasos perigonadales, también conocidos como depósitos epididimales, representan los mayores depósitos grasos de los roedores (Bagchi & MacDougald, 2019), por lo que si bien en ambas técnicas la limpieza del tejido resulta esencial, en la EC, en la que el tejido entra en contacto directo con el medio, este paso resulta aún mas crítico.

### 5.3. Espermiograma

Durante la valoración de la concentración espermática y su viabilidad, se observó la presencia de un elevado número de aglutinaciones de espermatozoides. Esto hizo que el conteo en la cámara de Neubauer fuera imposible en algunos cuadrantes y/o poco representativo. En la Imagen 9, se puede observar como en el cuadrante central, seleccionado para el conteo, hay un reducido número de células, mientras que en los cuadrantes adyacentes, no seleccionados, el número es muy superior. Aunque se probó con distintas diluciones de la muestra, los cúmulos y la heterogeneidad se mantuvieron. Esto, junto al hecho de que no se observaron diferencias a *grosso modo* entre los dos grupos de estudio, llevó a que finalmente se descartase el dato de valoración de la concentración espermática del presente estudio. Por otro lado, en la valoración de la vitalidad espermática, la presencia de aglutinaciones también impedía interpretar correctamente la tinción tripan-blue. Por ello, se decidió descartar este método para determinar la vitalidad espermática, y “suplirlo” por la extrapolación de los datos obtenidos en la valoración de la movilidad. Esto es, si se observó una movilidad del 90%, podemos indicar que había una vitalidad del 90%, ya que el 90% de los espermatozoides estaban vivos.



**Imagen 9.** Observación con cámara de Neubauer. En la fotografía se observan los cuadrados terciarios utilizados para el conteo. En el centro, el cuadrante en color verde seleccionado para el conteo. En rojo, los cuadrantes no seleccionados.

El porcentaje de movilidad medio en ambos grupos fue muy elevado, superior a un 80%, y no se observaron diferencias significativas entre cepas (Tabla 4). Debemos tener en cuenta que nuestras muestras procedían de ratones jóvenes, sanos y en edad reproductiva, por lo que estos datos resultan coherentes. Por otra parte, si bien existía gran porcentaje de movilidad, en general, se trató de movimiento no progresivo, es decir, sin desplazamiento, moviéndose sobre la misma posición. Esto puede ser debido a que los espermatozoides no fueron sometidos a un proceso de capacitación, proceso que tiene lugar *in vivo* en el tracto reproductor femenino, por el cual, los espermatozoides adquieren la capacidad de fertilizar al ovocito gracias a una serie de modificaciones en su membrana plasmática y en su movilidad.

La ausencia del proceso de capacitación parece haber afectado en gran medida al espermiograma, pudiendo ser también responsable de los resultados obtenidos con respecto a la aglutinación espermática. En cuanto al estudio de la aglutinación *per se*, en la mayor parte de las muestras predominaban aglutinaciones moderadas de tipo cabeza-cabeza, aunque también se observaron uniones de tipo mixto y aglutinación aislada (Tabla 4).

**Tabla 4.** Peso de los ratones (g), peso testicular (g), movilidad espermática (%) y tipo de aglutinación espermática.

	Peso	Peso medio ejemplares *	Peso testicular	Peso medio testicular *	Movilidad	Movilidad media	Tipo de aglutinación
	33,86		0,27		90-100		2A
	33,64		0,23		90-100		2A
CD-1	35,26	33,41 ± 1,41	0,27	0,24 ± 0,02	90-100	87,00 ± 9,80	1A
	31,38		0,23		70-80		2D
	32,93		0,22		70-80		2A
	27,73		0,19		70-80		1A
	25,78		0,19		80-90		2A
C57BL/6	23,93	26,00 ± 1,38	0,16	0,18 ± 0 01	90-100	87,00 ± 7,48	2A
	26,11		0,17		90-100		2A
	26,46		0,18		80-90		2D

Aglutinación tipo A: adhesión cabeza-cabeza; tipo B: adhesión cola-cola; Tipo D – mixta. Aglutinación de grado 1: aglutinaciones aisladas; grado 2: aglutinaciones moderadas. Los valores medios se expresan como media ± desviación estándar (n = 5). (\*) Indica diferencias significativas entre cepas.

Como ya se ha comentado, la valoración de la morfología de los espermatozoides se hizo mediante tinción de frotis fijados, por lo que previamente fue necesario evaluar las distintas técnicas de fijación y tinción. Inicialmente, se usó la tinción Diff-Quik que, en base a la bibliografía, suponía una opción rápida que permitía determinar fácilmente la morfología, así como observar con nitidez el acrosoma (Kruger et al., 1987) (Imagen 9). No obstante, los resultados obtenidos no resultaron favorables ya que se apreciaron anomalías morfológicas que no se habían observado durante el análisis en fresco. En concreto, se advirtió un retraimiento de la cabeza de los espermatozoides que incluso podía aparecer separada del resto de estructuras celulares. Debemos tener en consideración que en el protocolo de este kit comercial se indica que se debe llevar a cabo un secado al aire de 15 minutos de la muestra, pudiendo las anomalías descritas haber sido consecuencia de este largo periodo de secado, que triplica el tiempo empleado para las otras tinciones.



**Imagen 9.** Espermatozoide con la tinción Diff Quik. Se observan anomalías en la zona de la cabeza, así como cola cortada.

Como consecuencia de los resultados obtenidos con la tinción Diff-Quik, se optó por buscar alternativas que fueran más adecuadas. Se testó una modificación de la tinción de Papanicolau, frecuentemente utilizada para el análisis de frotis (Schulte, 1991), y la tinción con hematoxilina-eritrosina, método de tinción más popular utilizado en investigación y medicina diagnóstica (Salazar & Moreno, 2016). Ambas técnicas proporcionaron resultados favorables y similares, y permitieron visualizar la región acrosomal, teñida más tenuemente que el resto de la cabeza del espermatozoide.

En las muestras analizadas, mayoritariamente se observaron espermatozoides de forma normal, aunque de manera más o menos frecuente, se detectó la presencia de células con anomalías en la región de la cola, cola en forma de horquilla, enrollada, cortada o partida (Imagen 10). Menos frecuente fue la aparición de vesículas en la región media o cabezas con anomalías morfológicas.



**Imagen 10.** Anomalías morfológicas. Ambas fotografías muestran aglutinaciones de tipo 1A. En la izquierda (hematoxilina-eritrosina) las flechas negras indican colas en forma de horquilla, y la roja, cabeza aislada de la cola. A la derecha (modificación de Papanicolau) se señala una anomalía morfológica de la cabeza.

#### 5.4. Contenido de lípido total y perfil de clases lipídicas del esperma de ratón

El contenido de lípido total del esperma obtenido mediante la EA, se mantuvo estable entre grupos, con valores medios de  $0,50 \pm 0,07$  mg para CD-1 y de  $0,42 \pm 0,13$  mg para C57BL/6 por total de esperma recogido.

La Tabla 5, muestra la composición de clases lipídicas de los espermatozoides de la línea CD-1 y de la cepa C57BL/6. Los resultados obtenidos indican que apenas existen diferencias en la abundancia relativa de las diferentes clases lipídicas entre las líneas de estudio. Estos resultados indican la elevada estabilidad de las proporciones de las diferentes fracciones lipídicas, coincidiendo con lo observado en otras especies de mamíferos (Tapia et al., 2012) Así, el total de LP representó alrededor de un 26% del total lipídico y el de los LN en torno al 74%. Estas proporciones son similares a las encontradas en la membrana celular de los espermatozoides de todos los mamíferos (Shan et al., 2021).

No se detectaron diferencias significativas entre grupos para ninguna de las clases lipídicas polares, siendo la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE) las fracciones más abundantes con 15,1-15,6% y 4,1-4,4% del total lipídico en CD-1 y C57BL/6, respectivamente. La PC se ha relacionado con parámetros como la movilidad espermática (Lucio et al., 2017) y está involucrada en la reacción acrosómica (Cross, 1994). Por otro lado, PE, fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI) también cumplen funciones vitales: PE participa en la reorganización de microdominios durante la capacitación y la reacción acrosómica (Watanabe et al., 2014), la PS afecta a la integridad de la membrana, participa en los procesos de apoptosis y de fusión con el ovocito (Hichri et al., 2018; Whitlock & Chernomordik, 2021) y la PI participa junto con las otras clases en los procesos de capacitación y fusión (Nomikos et al., 2015), además de en el mantenimiento de las espermatogonias (Brill et al., 2016).

En nuestro estudio, la proporción de PI y PS se registró como el sumatorio de ambas clases lipídicas dado que fue imposible separar ambas bandas en la cromatografía líquida. Aun así, estudios previos han reportado que PS es más abundante (Shan et al., 2021) y que por tanto, confiere la mayor proporción del porcentaje obtenido.

Al contrario de las fracciones lipídicas polares comentadas hasta el momento, la esfingomielina (SM) no es un glicerofosfolípido sino un esfingolípido. La SM fue la clase lipídica menos representada en el espermatozoide de ambos grupos experimentales (1.1-1.8%), y tampoco se observaron diferencias entre cepas. Estudios previos han reportado que la SM y sus derivados, participan en la formación de microdominios y en la formación y transporte de vesículas (Adada et al., 2016). Durante la capacitación y la reacción acrosómica, la SM se hidroliza dando lugar a ceramidas (Zanetti et al., 2010). Las ceramidas pueden inducir la reacción acrosómica en espermatozoides (Vaquer et al., 2020) desencadenando la exocitosis acrosómica (Suhaiman et al., 2010).

En lo que respecta a los LN, el colesterol (CHO) es la clase mayoritaria y la única que muestra diferencias significativas entre grupos, representando un  $23,5 \pm 1,5\%$  del lípido total en el grupo CD-1, y un  $19,9 \pm 2,0\%$  en el C57BL/6. Se ha demostrado que durante el proceso de maduración, el epidídimo suministra colesterol a los espermatozoides mediante los epididiosomas (Gangwar & Atreja, 2015), por lo que dado que las muestras se han obtenido a partir del epidídimo no podemos descartar completamente que parte del colesterol detectado pueda provenir de estas vesículas.

El colesterol es el principal elemento regulador inhibitorio de la capacitación. Durante la capacitación, se produce una salida de colesterol, que es captado por aceptores del líquido seminal. Esto provoca un aumento en la fluidez de la membrana y una entrada masiva de calcio al interior celular, que promueve un estado de hiperactivación. Gracias a este proceso, los espermatozoides son capaces de alcanzar el ovocito y desencadenar la reacción acrosómica para finalmente fusionarse con él. Se ha planteado que el colesterol puede tener un efecto protector sobre el espermatozoide evitando que se produzca una capacitación temprana (De Jonge, 2005). Por otro lado, también se ha relacionado el colesterol, concretamente el ratio colesterol/fosfolípidos con la calidad espermática, centrándose sobre todo, en la capacidad de protección frente a criopreservación en algunos animales de interés ganadero (Fang et al., 2016).

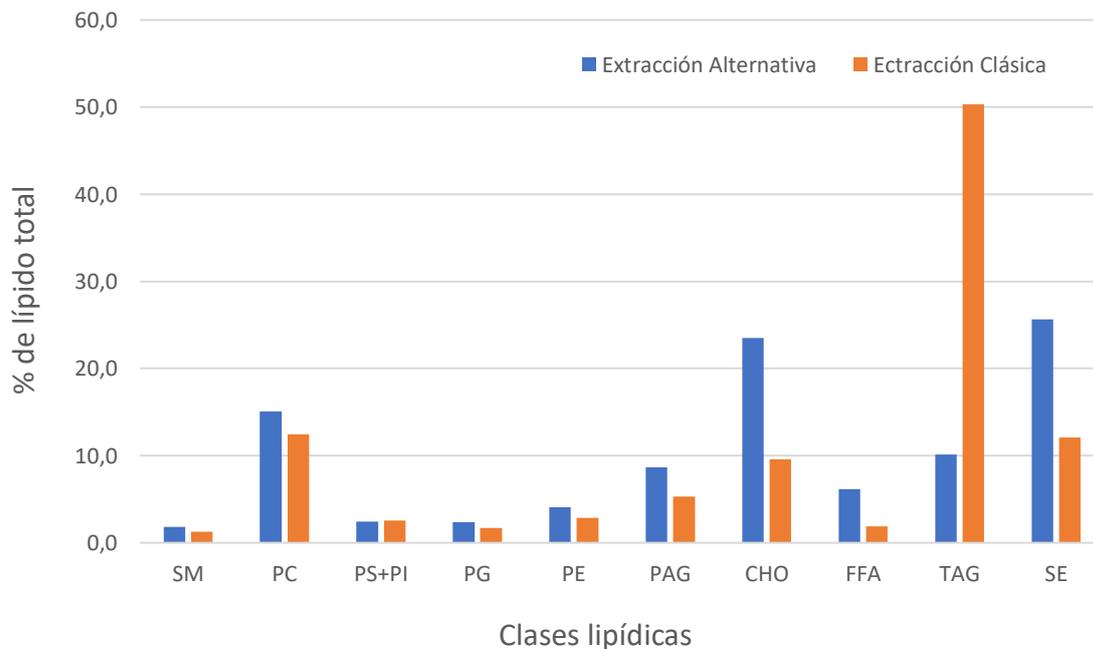
Aunque el papel del colesterol durante la capacitación es fundamental y está bien documentado, no es utilizado usualmente como biomarcador, por lo que, si bien las diferencias halladas en nuestro estudio resultan de gran interés, no podemos correlacionarlo con una mejor o peor calidad espermática, ni tampoco relacionarlo directamente con la fertilidad, haciéndose necesario el desarrollo de nuevas experimentaciones para intentar definir estas potenciales correlaciones.

Para finalizar, también se estudió la abundancia de clases lipídicas en relación con los dos métodos de extracción espermática empleados a lo largo del trabajo. Debido a la escasa cantidad de muestra, no se realizaron réplicas para la EC y no se pudo realizar un análisis estadístico que nos indicara si existían diferencias significativas entre los protocolos. Los resultados muestran que la EC parece presentar una cantidad de triacilglicéridos (TAG) considerablemente superior a la observada en la EA (Gráfica 2). Esto podría deberse a la presencia de restos de tejido graso procedentes de los depósitos epididimales del ratón, que en esta extracción se mezclan con el material espermático. Este resultado corrobora que la EC no es un método óptimo para el estudio lipídico del esperma.

**Tabla 5.** Composición de clases lipídicas (% de lípido total) del esperma de las cepas CD-1 y C57BL/6.

Clases lipídicas	CD-1	C57BL/6
<b><math>\Sigma</math> Lípidos polares</b>	<b>25,9 ± 3,8</b>	<b>25,6 ± 3,0</b>
Esfingomielina	1,8 ± 1,2	1,1 ± 1,0
Fosfatidilcolina	15,1 ± 3,1	15,6 ± 1,0
Fosfatidilserina + fosfatidilinositol	2,5 ± 1,0	2,2 ± 1,0
Fosfatidilglicerol	2,4 ± 0,4	2,4 ± 0,8
Fosfatidiletanolamina	4,1 ± 1,8	4,4 ± 1,2
<b><math>\Sigma</math> Lípidos neutros</b>	<b>74,2 ± 3,8</b>	<b>74,4 ± 3,0</b>
Monoglicéridos + diglicéridos	8,7 ± 1,3	10,6 ± 3,8
Colesterol * ( $p = 0,012$ )	23,5 ± 1,5	19,9 ± 2,0
Ácidos grasos libres	6,2 ± 1,9	6,4 ± 1,8
Triacilglicéridos	10,1 ± 5,2	10,2 ± 2,8
Ésteres de esteroles	25,7 ± 5,8	27,2 ± 4,3

Los valores son expresados como media ± desviación estándar (n = 5). (\*) Indica diferencias significativas entre cepas ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 2.** Comparativa entre composición de clases lipídicas (% de lípido total) del esperma obtenido mediante extracción alternativa (azul) y extracción clásica (naranja). SM: esfingomielina; PC: fosfatidilcolina; PS+PI: sumatorio de fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina; PE: fosfatidiletanolamina; PAG: poliacylglicéridos (mono y diacylglicéridos); CHO: colesterol; FFA: ácidos grasos libres; TAG: triacylglicéridos; SE: ésteres de esteroles.

### 5.5. Perfil de ácidos grasos del esperma de ratón

Los resultados de la composición de ácidos grasos del esperma de ambas cepas experimentales se muestran en la Tabla 6.

En ambas cepas, los ácidos grasos saturados (SFA) son la familia con mayor representación con un 40,2% en CD-1 y un 39,1% en C57BL/6, siendo el ácido palmítico (16:0) su principal exponente (21,7 y 22,0% en CD-1 y C57BL/6, respectivamente), seguido del ácido esteárico (18:0), que fue más abundante en CD-1 ( $14,9 \pm 0,7\%$ ) que en C57BL/6 ( $13,09 \pm 0,4\%$ ). Estos dos ácidos grasos representan aproximadamente el 90% del total de SFA. Estos resultados son muy similares a los obtenidos en humanos en los estudios de Zerbinati et al. (2016) y Martínez-Soto et al. (2013). En el primero de estos estudios, se observaron diferencias en la abundancia de 18:0 entre pacientes con normozoospermia, es decir, con valores normales en los parámetros estudiados en el espermiograma, y pacientes con distintos tipos de anomalías relacionadas con infertilidad como astenozoospermia, oligoastenoteratozoospermia y varicocele, en los cuales el porcentaje de ácido esteárico era significativamente mayor. Sorprendentemente, en nuestro estudio el porcentaje de ácido esteárico es mayor para la línea con mayor éxito reproductivo.

Los acetales de dimetilo (DMA), que también se reportan en nuestro estudio, son indicadores indirectos de la presencia de plasmalógenos, glicerofosfolípidos (GPL) que tienen un papel fundamental en la protección frente al daño oxidativo. Los plasmalógenos se diferencian de los demás GPL porque presentan un vinil éter en la posición sn-1 del glicerol en lugar de un ácido graso. A este vinil éter, se unen ácidos grasos saturados como el 16:0 o el 18:0, o monoinsaturados como el 18:1. En la posición sn-2, los plasmalógenos cuentan con ácidos grasos poliinsaturados, concretamente con DHA o ARA. Por último, en la posición sn-3 del glicerol podemos encontrar o bien PC, llamándose entonces plasmencilolinas, o PE, denominándose plasmeniletalominas (Messias et al., 2018). Se cree que las funciones de los plasmalógenos en el esperma son el mantenimiento de la movilidad (Lucio et al., 2017) y su acción antioxidante (Henkel, 2011). Los lípidos-éter están implicados en la formación de macro y microdominios, que son necesarios para la compartimentación de la membrana espermática (Gorgas et al., 2006). Además, dado que los enlaces éter no son fácilmente escindidos por la acción de

las lipasas, estos lípidos pueden estar involucrados en el mantenimiento de la estabilidad de la membrana (Rangholia et al., 2021).

En un estudio de Macías et al., (2011) se estudió la presencia de plasmalógenos como predictores del potencial de criopreservación de muestras de esperma de caballo. En dicho estudio, se advirtió una correlación negativa entre la lipooxidación del esperma y el porcentaje de plasmalógenos de 18:0, y una correlación positiva con el plasmalógeno de 16:0. En nuestro estudio, se detectaron ambos DMA, indicadores de la presencia de dichos plasmalógenos. Si bien no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, en la línea CD-1, el porcentaje de 16:0 DMA es muy cercano al 0% mientras que el de C57BL/6 de 1,2%. A pesar de estos resultados, no podemos confirmar que esto implique un menor riesgo de lipooxidación en el grupo CD-1 debido a la alta variabilidad entre individuos encontrada en el grupo C57BL/6.

En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), no se observan diferencias entre los grupos de estudio, constituyendo un 21,2% del total de ácidos grasos en CD-1, y un 22,3% en C57BL/6. El ácido oleico (18:1n-9) fue su representante más relevante seguido del ácido vaccénico (18:1n-7). Estos datos concuerdan bien con los valores observados en humanos, aunque en el hombre, los valores para el vaccénico son ligeramente superiores, rondando el 3% (Zerbinati et al., 2016).

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), y entre ellos los de cadena larga (LC-PUFA), representan un grupo especialmente importante y altamente estudiado en relación a la infertilidad y otras muchas otras patologías en humanos (Zárate et al., 2017). El principal PUFA en este estudio fue el 22:5n-6 (ácido de Osbond), con un 13,3 y 12,3% en CD-1 y C57BL/6, respectivamente, aportando en ambas cepas aproximadamente la mitad del total de PUFA n-6, aunque sin diferencias significativas entre grupos. En mamíferos, este ácido graso parece estar altamente relacionado con la integridad de la membrana lo cual probablemente debido a su contribución en la fluidez (Tapia et al., 2012). El ácido de Osbond también es el PUFA mayoritario en el esperma de caballo (Macías García et al., 2011), sin embargo apenas se encuentra presente en los espermatozoides de seres humanos (Zerbinati et al., 2016).

El ácido araquidónico (ARA; 20:4n-6) es el siguiente ácido graso más representado entre los PUFA n-6, siendo mayor en el grupo CD-1 ( $3,9 \pm 0,1\%$ ) que en el C57BL/6 ( $3,3 \pm$

0,5%). Este ácido graso es mayoritario entre los PUFA de la serie n-6 en humanos y muestra valores similares a los reportados en ratones (Zerbinati et al., 2016). El ARA juega un papel vital en la fertilidad masculina, dado que es precursor de la anandamida, un mediador lipídico cannabinoide, que inhibe la unión de los espermatozoides al epitelio del oviducto permitiendo que se desplacen hacia el ovocito (Gervasi et al., 2009). Las diferencias en la cantidad de ARA entre ambas cepas, podría tener relación, al menos en parte, con el menor éxito reproductivo de la cepa C57BL/6.

La concentración de los PUFA de la serie n-3 es menor en ambos grupos en relación con los de la serie n-6, siendo de un 9,4% en CD-1 y un 10,5% en C57BL/6. El ácido graso mayoritario de esta serie fue el ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3), con una proporción del 8-9% del total de ácidos grasos. A pesar de que en este estudio no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, el DHA ha sido propuesto en múltiples ocasiones en humanos como un biomarcador de interés. El DHA parece mostrar relación con la viabilidad de la membrana celular tras la criopreservación y con todos los parámetros espermáticos, especialmente con la movilidad (Collodel et al., 2020; Craig et al., 2019; Martínez-Soto et al., 2013; Shan et al., 2021; Zerbinati et al., 2016). En el estudio de Zerbinati y colaboradores, la relación entre la proporción de DHA entre los individuos sanos y aquellos con parámetros anómalos relacionados con la fertilidad resultó evidente, observándose una reducción de hasta el 40% en pacientes con astenozoospermia en comparación con los pacientes sin anomalías.

Los niveles de DHA varían entre distintas especies y también en su localización dentro de la membrana del espermatozoide, por ejemplo, en el ser humano, las mayores concentraciones de DHA se observan en la cabeza (Esmaeili et al., 2015). En ratones se ha indicado que un déficit en este ácido graso afecta a la correcta biogénesis y funcionamiento del acrosoma (Roqueta-Rivera et al., 2011).

Si bien puede resultar llamativo que en este estudio no haya diferencias en los niveles de DHA, debemos tener en cuenta que los resultados del espermiograma no muestran diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados, lo que sugiere que la diferencia de fertilidad entre las cepas de estudio parece no estar relacionada con los parámetros estudiados en el espermiograma y por ende, no depende del contenido de DHA en el espermatozoide.

Por otro lado, sí que se observan diferencias significativas en el ácido estearidónico (18:4n-3), precursor de los LC-PUFA de la serie n-3. En este, si bien la concentración es reducida en ambos grupos, es superior en el grupo de ratones C57BL/6, un 0,5%, frente al 0,3% de los CD-1.

Como ya hemos comentado, los LC-PUFA son esenciales para el desarrollo y funcionalidad de los espermatozoides, por lo que consecuentemente han sido objeto de estudio de múltiples investigaciones.

En 2008 se realizó un estudio comparando ratones wildtype con ratones knockout para la expresión de delta-6-desaturasa (FADS2). Esta desaturasa es una enzima limitante que cataliza la desaturación inicial para la biosíntesis de los LC-PUFA; catalizando la formación de LC-PUFA de la serie n-3 a partir del 18:3n-3, y de LC-PUFA de la serie n-6 a partir del 18:2n-6. Los ratones FADS2-KO mostraron hipogonadismo, así como un fallo de la espermatogénesis. En estos ratones, la baja presencia de LC-PUFA, provocó modificaciones en la polaridad celular y una reducción en el número de uniones entre las espermátidas y las células de Sertoli, que son esenciales para el desarrollo de los espermatozoides. Esta situación de infertilidad fue fácilmente revertida mediante suplementación en la dieta de LC-PUFA, recuperándose la capacidad reproductiva y demostrándose la importancia de estos ácidos grasos en el tejido reproductivo (Stoffel et al., 2008).

La mayor parte de los estudios coinciden en la importancia de la serie n-3 por su actividad antioxidante. Por otro lado, existen múltiples estudios en humanos que relacionan la infertilidad con la abundancia de ácidos grasos de la serie n-6 y a valores reducidos de la relación n3/n6 (Shan et al., 2021). Sin embargo, existe cierta controversia en cuanto al ARA, mientras algunos estudios relacionan mayores concentraciones de este ácido graso con problemas de fertilidad (Safarinejad et al., 2009), otros afirman que existe una correlación positiva de su concentración con la fertilidad (Martínez-Soto et al., 2013).

En el caso de los ratones, como en otros mamíferos que muestran una mayor concentración de ácidos grasos de la serie n-6, parece ilógico pensar que la abundancia de estos esté relacionada con un efecto negativo en la calidad de sus espermatozoides.

Retomando los resultados obtenidos en el espermiograma, en el análisis de las clases lipídicas y en el estudio de algunos ácidos grasos como el DHA, podríamos decir que

entre las cepas de estudio no se observan diferencias en cuanto a la calidad y que por ende, no es posible encontrar un biomarcador lipídico en este sentido. Por otro lado, el ARA sí que podría constituir un biomarcador de interés para la fertilidad en ratones; no por su relación directa con la calidad del espermatozoide, si no en cuanto a su capacidad de interaccionar con el aparato reproductor femenino. A pesar de esto, debemos considerar que todavía no se comprende por completo el papel del ARA ni su metabolismo en los espermatozoides, por lo que resulta evidente que se necesitan más estudios para poder sacar conclusiones más firmes sobre su utilidad como biomarcador.

**Tabla 6.** Perfil de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) del esperma de las cepas CD-1 y C57BL/6.

Ácidos grasos	CD-1	C57BL/6
<b><math>\Sigma</math> SFA</b>	<b>40,2 ± 1,8</b>	<b>39,1 ± 1,5</b>
14:0	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,3
15:0	1,6 ± 0,5	0,9 ± 0,6
16:0	21,7 ± 1,1	22,0 ± 1,2
18:0 * ( $p = 0,03$ )	14,9 ± 0,7	13,9 ± 0,4
<b><math>\Sigma</math> MUFA</b>	<b>21,2 ± 1,8</b>	<b>22,3 ± 2,7</b>
16:1 (n-9, n-7)	1,4 ± 0,4	1,3 ± 0,4
18:1n-9	16,8 ± 1,2	18,5 ± 2,3
18:1n-7	1,9 ± 0,2	2,0 ± 0,2
20:1 (n-11, n-9)	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1
22:1 (n-11, n-9)	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,1
<b><math>\Sigma</math> n-6 PUFA * (<math>p = 0,046</math>)</b>	<b>26,7 ± 0,7</b>	<b>22,7 ± 3,7</b>
18:2n-6	5,8 ± 3,4	5,2 ± 0,4
18:3n-6	1,7 ± 3,7	0,0 ± 0,0
20:2n-6	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0
20:3n-6	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,2
20:4n-6 (ARA) * ( $p = 0,019$ )	3,9 ± 0,1	3,3 ± 0,5
22:5n-6	13,3 ± 1,4	12,3 ± 3,1
22:4n-6	1,4 ± 0,5	1,8 ± 1,2
<b><math>\Sigma</math> n-3 PUFA</b>	<b>9,4 ± 1,0</b>	<b>10,5 ± 1,2</b>
18:3n-3	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,2
18:4n-3 * ( $p = 0,045$ )	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,3
20:5n-3 (EPA)	0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,1
22:6n-3	8,1 ± 0,9	8,7 ± 1,6
<b><math>\Sigma</math> DMA</b>	<b>0,1 ± 0,1</b>	<b>1,4 ± 1,3</b>
16:0 DMA	0,0 ± 0,0	1,2 ± 1,1
18:0 DMA	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,3
Desconocidos * ( $p = 0,03$ )	2,5 ± 0,5	3,9 ± 1,1
<b><math>\Sigma</math> PUFA</b>	<b>36,1 ± 1,4</b>	<b>33,3 ± 4,8</b>
<b><math>\Sigma</math> n-3</b>	<b>9,4 ± 1,0</b>	<b>10,5 ± 1,2</b>
<b><math>\Sigma</math> n-6 * (<math>p = 0,046</math>)</b>	<b>26,7 ± 0,7</b>	<b>22,7 ± 3,7</b>
<b><math>\Sigma</math> n-3 LC PUFA</b>	<b>8,7 ± 1,0</b>	<b>9,5 ± 1,5</b>
<b>n-3/n-6* (<math>p = 0,01</math>)</b>	<b>0,3 ± 0,0</b>	<b>0,5 ± 0,0</b>
<b>ARA/EPA</b>	<b>10,0 ± 4,2</b>	<b>9,0 ± 4,7</b>
<b>DHA/EPA</b>	<b>21,1 ± 11,5</b>	<b>23,3 ± 13,9</b>

SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; DMA, dimetilacetales; LC PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ( $\geq C20$  y  $\geq 3$  dobles enlaces). Los valores son expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n = 5). (\*) Indica diferencias significativas entre cepas ( $p < 0,05$ );

Este es hasta la fecha el primer estudio que compara, desde la lipidómica, el esperma de distintas cepas de ratón. Los resultados obtenidos muestran que incluso entre cepas, y con animales sin ninguna patología previa, existen diferencias significativas en sus perfiles lipídicos. Aunque no se han podido extraer conclusiones definitivas sobre potenciales biomarcador lipídicos, este trabajo abre el camino a una gran cantidad de nuevos estudios aportando valores de referencia y una información fundamental sobre los mejores procedimientos para llevar a cabo estudios similares.

## 6. Conclusiones

- No existen diferencias significativas en los parámetros de movilidad, morfología, concentración, aglutinación y vitalidad entre el esperma de ratones CD-1 y C57BL/6.
- Entre las dos opciones de extracción evaluadas, la extracción alternativa (EA) constituye una mejor opción, al reducir la cantidad de restos celulares y de grasa en la muestra, que la extracción clásica (EC).
- La fijación de frotis semihúmedos es un método válido para el estudio del esperma al no provocar retracción de la zona acrosomal ni de la cabeza del espermatozoide.
- Entre las tinciones valoradas, la de hematoxilina-eritrosina y la de Papanicolau modificada, resultaron ser tinciones sencillas y rápidas que permiten ver todos los elementos básicos necesarios para el análisis morfológico de los espermatozoides, incluyendo el acrosoma.
- La composición de clases lipídicas de los espermatozoides de las dos grupos de estudio fue muy similar, mostrando diferencias significativas únicamente para el colesterol, que presentó mayor proporción en la línea CD-1.
- Existen diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos de CD-1 y C57BL/6 para los siguientes ácidos grasos: 18:0, 18:4n-3 y 20:4n-6.
- El ARA presentó una concentración más elevada en el grupo CD-1, poniendo de manifiesto que puede estar relacionado con el mayor éxito reproductivo de esta cepa.

## 7. Bibliografía

- Adada, M., Luberto, C., & Canals, D. (2016). Inhibitors of the sphingomyelin cycle: Sphingomyelin synthases and sphingomyelinases. *Chemistry and Physics of Lipids*, 197, 45–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.07.008>
- Bagchi, D. P., & MacDougald, O. A. (2019). Identification and Dissection of Diverse Mouse Adipose Depots. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 149, 10.3791/59499. <https://doi.org/10.3791/59499>
- Bianchi, E., & Wright, G. J. (2016). Sperm Meets Egg: The Genetics of Mammalian Fertilization. *Annual Review of Genetics*, 50(1), 93–111. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-121415-121834>
- Boerke, A., Tsai, P. S., Garcia-Gil, N., Brewis, I. A., & Gadella, B. M. (2008). Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: Functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology*, 70(8), 1188–1196. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.021>
- Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., & Nygren, K. G. (2009). Reply: International estimates on infertility prevalence and treatment seeking: Potential need and demand for medical care. *Human Reproduction*, 24(9), 2380–2383. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep218>
- Brill, J. A., Yildirim, S., & Fabian, L. (2016). Phosphoinositide signaling in sperm development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 59, 2–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.06.010>
- Bruner-tran, K. L., Ding, T., Yeoman, K. B., Archibong, A., & Arosh, J. A. (2014). *Developmental Exposure of Mice to Dioxin Promotes Transgenerational Testicular Inflammation and an Increased Risk of Preterm Birth in Unexposed Mating Partners*. 9(8), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105084>
- Cao, X. W., Lin, K., Li, C. Y., & Yuan, C. W. (2011). [A review of WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (5th edition)]. *Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology*, 17(12), 1059–1063.
- Christova, Y., James, P., Mackie, A., Cooper, T. G., & Jones, R. (2004). Molecular diffusion in sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216(1), 41–46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.075>
- Collodel, G., Castellini, C., Lee, J. C. Y., & Signorini, C. (2020). Relevance of Fatty Acids to Sperm Maturation and Quality. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/7038124>
- Companyó, M., Iborra, A., Villaverde, J., Martínez, P., & Morros, A. (2007). Membrane fluidity changes

- in goat sperm induced by cholesterol depletion using beta-cyclodextrin. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1768(9), 2246–2255. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.06.011>
- Corrales, J. J., Cordero, M., Galindo, P., Burgo, R. M., Hernández, J., & Manuel Miralles, J. (2011). Evolución de la calidad seminal en una población no industrializada procedente de Salamanca durante los últimos treinta años. *Medicina Clínica*, 136(7), 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2010.05.031>
- Craig, L. T. B., Brush, R. S., Sullivan, M. T., Zavy, M. T., Agbaga, M. P., & Anderson, R. E. (2019). Decreased very long chain polyunsaturated fatty acids in sperm correlates with sperm quantity and quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(7), 1379–1385. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01464-3>
- Cross, L. (1994). *the Acrosomal of Human*. 15(5).
- De Jonge, C. (2005). Biological basis for human capacitation. *Human Reproduction Update*, 11(3), 205–214. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi010>
- Esmaeili, V., Shahverdi, A. H., Moghadasian, M. H., & Alizadeh, A. R. (2015). Dietary fatty acids affect semen quality: A review. *Andrology*, 3(3), 450–461. <https://doi.org/10.1111/andr.12024>
- Espinoza-Navarro, O., & Sarabia, L. (2011). Evaluación y Estandarización de la Calidad del Espermiograma: Nuevos Límites Inferiores de Referencia. *International Journal of Morphology*, 29(3), 885–890. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022011000300036>
- Evans, R. W., Weaver, D. E., & Clegg, E. D. (1980). Diacyl, alkenyl, and alkyl ether phospholipids in ejaculated, in utero-, and in vitro-incubated porcine spermatozoa. *Journal of Lipid Research*, 21(2), 223–228. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)39828-x](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)39828-x)
- Evenson, D. P., Jost, L. K., Marshall, D., Zinaman, M. J., Clegg, E., Purvis, K., De Angelis, P., & Ciaussen, O. P. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*, 14(4), 1039–1049. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.4.1039>
- Fang, Y., Blair, H., Zhong, R., Sun, H., & Zhou, D. (2016). Optimizing the freezing rate for ovine semen cryopreservation: Phospholipid profiles and functions of the plasma membrane and quality and fertilization of spermatozoa. *Small Ruminant Research*, 139, 46–51. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.04.012>
- Flesch, F. M., & Gadella, B. M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1469(3), 197–235. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00018-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00018-6)
- Gangwar, D. K., & Atreja, S. K. (2015). Signalling Events and Associated Pathways Related to the Mammalian Sperm Capacitation. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(5), 705–711.

<https://doi.org/10.1111/rda.12541>

- Garner, D. L., & Hafez, E. S. E. (2000). Spermatozoa and Seminal Plasma. In *Reproduction in Farm Animals* (pp. 96–109). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch7>
- Gervasi, M. G., Rapanelli, M., Ribeiro, M. L., Farina, M., Billi, S., Franchi, A. M., & Martinez, S. P. (2009). The endocannabinoid system in bull sperm and bovine oviductal epithelium: Role of anandamide in sperm-oviduct interaction. *Reproduction*, *137*(3), 403–414. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0204>
- Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., Toppari, J., & Zoeller, R. T. (2015). EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*, *36*(6), 1–150. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>
- Gorgas, K., Teigler, A., Komljenovic, D., & Just, W. W. (2006). *The ether lipid-deficient mouse : Tracking down plasmalogen functions*. *1763*, 1511–1526. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.038>
- Henkel, R. R. (2011). Leukocytes and oxidative stress : dilemma for sperm function and male fertility. *Asian Journal of Andrology*, *13*(1), 43–52. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.76>
- Hichri, R., Amor, H., Khammari, M., Harzallah, M., El Fekih, S., Saad, A., Ajina, M., & Ben Ali, H. (2018). Apoptotic sperm biomarkers and the correlation between conventional sperm parameters and clinical characteristics. *Andrologia*, *50*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/and.12813>
- Kruger, T. F., Ackerman, S. B., Simmons, K. F., Swanson, R. J., Brugo, S. S., & Acosta, A. A. (1987). A QUICK , RELIABLE STAINING TECHNIQUE FOR HUMAN SPERM MORPHOLOGY. *277*, 275–277.
- Lam, S. M., Tian, H., & Shui, G. (2017). Lipidomics, en route to accurate quantitation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1862*(8), 752–761. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.02.008>
- Lucio, C. F., Brito, M. M., Angrimani, D. S. R., Belaz, K. R. A., Jda, D. Z., Meoa, L., Nichi, A. M., Eberlin, M. N., & Vannucchi, C. I. (2017). *Lipid composition of the canine sperm plasma membrane as markers of sperm motility*. *52*, 208–213. <https://doi.org/10.1111/rda.12860>
- Macías García, B., González Fernández, L., Ortega Ferrusola, C., Salazar-Sandoval, C., Morillo Rodríguez, A., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J. A., Morcuende, D., & Peña, F. J. (2011). Membrane Lipids of the Stallion Spermatozoon in Relation to Sperm Quality and Susceptibility to Lipid Peroxidation. *Reproduction in Domestic Animals*, *46*(1), 141–148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01609.x>
- Martínez-Soto, J. C., Landeras, J., & Gadea, J. (2013). Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology*, *1*(3), 365–375. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x>
- Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012). National,

- Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Medicine*, 9(12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>
- Mendiola, J., Jørgensen, N., Mínguez-Alarcón, L., Sarabia-Cos, L., López-Espín, J. J., Vivero-Salmerón, G., Ruiz-Ruiz, K. J., Fernández, M. F., Olea, N., Swan, S. H., & Torres-Cantero, A. M. (2013). Sperm counts may have declined in young university students in Southern Spain. *Andrology*, 1(3), 408–413. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2012.00058.x>
- Messias, M. C. F., Mecatti, G. C., Priolli, D. G., & De Oliveira Carvalho, P. (2018). Plasmalogen lipids: Functional mechanism and their involvement in gastrointestinal cancer. *Lipids in Health and Disease*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0685-9>
- Nomikos, M., Sanders, J. R., Parthimos, D., Buntwal, L., Calver, B. L., Stamatiadis, P., Smith, A., Clue, M., Sideratou, Z., Swann, K., & Lai, F. A. (2015). Essential role of the EF-hand domain in targeting sperm phospholipase C $\zeta$  to membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>). *Journal of Biological Chemistry*, 290(49), 29519–29530. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.658443>
- Oresti, G. M., Luquez, J. M., Furland, N. E., & Aveldaño, M. I. (2011). Uneven distribution of ceramides, sphingomyelins and glycerophospholipids between heads and tails of rat spermatozoa. *Lipids*, 46(12), 1081–1090. <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3601-x>
- Panahi, S., Abdollahifar, M., Aliaghaei, A., & Nazarian, H. (2017). *Application of stereological methods for unbiased estimation of sperm morphology in the mice induced by busulfan*. 301–305.
- Rangholia, N., Leisner, T. M., & Holly, S. P. (2021). *Bioactive Ether Lipids : Primordial Modulators of Cellular Signaling*.
- Roqueta-Rivera, M., Abbott, T. L., Sivaguru, M., Hess, R. A., & Nakamura, M. T. (2011). Deficiency in the omega-3 fatty acid pathway results in failure of acrosome biogenesis in mice. *Biology of Reproduction*, 85(4), 721–732. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.089524>
- Rose, N. R. (1976). *Techniques for detection of iso- and auto-antibodies to human spermatozoa Based on a Workshop held at the Institute of Medical Microbiology , University of Aarhus , Denmark , 15-19 July 1974 , and sponsored by the WHO Expanded Programme of Research , Deve. July 1974*, 175–199.
- Rutstein, S. O., & Shah, I. H. (2004). Infecundity, infertility, and childlessness in developing countries. DHS Comparative Reports 9. *DHS Comparative Reports*, 9, pages 13-50. <https://doi.org/PN-ADB-836>
- Safarinejad, M. R., Hosseini, S. Y., Dadkhah, F., & Asgari, M. A. (2009). Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: a comparison between fertile and infertile men. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 29(1), 100–105.

- Salazar, L., & Moreno, F. (2016). *Comparación de tres tipos de tinciones histoquímicas en secciones histológicas de paladar y lengua de rata Wistar*. 2(2), 12–23.
- Schulte, E. K. W. (1991). Standardization of biological dyes and stains: pitfalls and possibilities. *Histochemistry*, 95(4), 319–328. <https://doi.org/10.1007/BF00266958>
- Segal, T. R., & Giudice, L. C. (2019). Before the beginning: environmental exposures and reproductive and obstetrical outcomes. *Fertility and Sterility*, 112(4), 613–621. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.08.001>
- Serrano, R. T. (2012). *Artículo de revisión Una visión actual de la infertilidad masculina*. 4(3), 103–109.
- Shan, S., Xu, F., Hirschfeld, M., & Brenig, B. (2021). *Sperm Lipid Markers of Male Fertility in Mammals*.
- Sharpe, R. M. (2000). Lifestyle and environmental contribution to male infertility. *British Medical Bulletin*, 56(3), 630–642. <https://doi.org/10.1258/0007142001903436>
- Stoffel, W., Holz, B., Jenke, B., Binczek, E., Heinz, R., Kiss, C., Thevis, M., Weber, A., Arnhold, S., & Addicks, K. (2008). *of x 3- and x 6-polyunsaturated fatty acids*. 27(17), 2281–2292. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.156>
- Suhaiman, L., Blas, G. A. De, Obeid, L. M., Darszon, A., Mayorga, L. S., Belmonte, S. A., & Gene, D. De. (2010). Sphingosine 1-Phosphate and Sphingosine Kinase Are Involved in a Novel Signaling Pathway Leading to Acrosomal. *Journal of Biological Chemistry*, 285(21), 16302–16314. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.072439>
- Svetlichnyy, V., Müller, P., Pomorski, T. G., Schulze, M., Schiller, J., & Müller, K. (2014). Metabolic incorporation of unsaturated fatty acids into boar spermatozoa lipids and de novo formation of diacylglycerols. *Chemistry and Physics of Lipids*, 177, 41–50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.11.001>
- Tapia, J. A., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., Peña, F. J., & Aparicio, I. M. (2012). The Membrane of the Mammalian Spermatozoa: Much More Than an Inert Envelope. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(SUPPL.3), 65–75. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02046.x>
- Vailati-Riboni, M., Palombo, V., & Loor, J. J. (2017). *What Are Omics Sciences? BT - Periparturient Diseases of Dairy Cows: A Systems Biology Approach* (B. N. Ametaj (ed.); pp. 1–7). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-43033-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-43033-1_1)
- Vaquer, C. C., Suhaiman, L., Pavarotti, M. A., De Blas, G. A., & Belmonte, S. A. (2020). Ceramide induces a multicomponent intracellular calcium increase triggering the acrosome secretion in human sperm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(7), 118704. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118704>
- Vazquez, J. M., & Roldan, E. R. S. (1997). Phospholipid metabolism in boar spermatozoa and role of

- diacylglycerol species in the de novo formation of phosphatidylcholine. *Molecular Reproduction and Development*, 47(1), 105–112. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199705\)47:1<105::AID-MRD14>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<105::AID-MRD14>3.0.CO;2-0)
- Wang, R., Li, B., Lam, S. M., & Shui, G. (2020). Integration of lipidomics and metabolomics for in-depth understanding of cellular mechanism and disease progression. *Journal of Genetics and Genomics*, 47(2), 69–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jgg.2019.11.009>
- Watanabe, H., Takeo, T., Tojo, H., Sakoh, K., Berger, T., Nakagata, N., Mak, T. W., & Kondoh, G. (2014). Lipocalin 2 binds to membrane phosphatidylethanolamine to induce lipid raft movement in a PKA-dependent manner and modulates sperm maturation. *Development (Cambridge)*, 141(10), 2157–2164. <https://doi.org/10.1242/dev.105148>
- Whitlock, J. M., & Chernomordik, L. V. (2021). Flagging fusion: Phosphatidylserine signaling in cell–cell fusion. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100411. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100411>
- Zanetti, S. R., Monclus, M. de los Á., Rensetti, D. E., Fornés, M. W., & Aveldaño, M. I. (2010). Differential involvement of rat sperm choline glycerophospholipids and sphingomyelin in capacitation and the acrosomal reaction. *Biochimie*, 92(12), 1886–1894. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.08.015>
- Zárate, R., Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J. A., & Rodríguez, C. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and Translational Medicine*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0153-6>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., De Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., & 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>
- Zerbinati, C., Caponecchia, L., Rago, R., Leoncini, E., Bottaccioli, A. G., Ciacciarelli, M., Pacelli, A., Salacone, P., Sebastianelli, A., Pastore, A., Palleschi, G., Boccia, S., Carbone, A., & Iuliano, L. (2016). Fatty acids profiling reveals potential candidate markers of semen quality. *Andrology*, 4(6), 1094–1101. <https://doi.org/10.1111/andr.12236>
- Zigo, M., Maňásková-Postlerová, P., Zuidema, D., Kerns, K., Jonáková, V., Tůmová, L., Bubeníčková, F., & Sutovsky, P. (2020). Porcine model for the study of sperm capacitation, fertilization and male fertility. *Cell and Tissue Research*, 380(2), 237–262. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03181-1>

## Anexo: estudio lipídico del pienso

**Tabla 1.** Perfil de ácidos grasos, medido en % de área del pienso. Se incluyen los gramos de ácidos grasos totales y de lípido total (saponificable e insaponificable), por cada 100 gramos de pienso fresco y seco.

Ácidos grasos	
<b><math>\Sigma</math> SFA</b>	<b>18,72 ± 0,26</b>
14:0	0,13 ± 0,01
15:0	0,14 ± 0,02
16:0	15,34 ± 0,32
17:0	0,11 ± 0,00
18:0	2,07 ± 0,03
20:0	0,33 ± 0,07
<b><math>\Sigma</math> MUFA</b>	<b>22,01 ± 0,19</b>
16:1 n-9	0,13 ± 0,01
16:1 n-7	0,25 ± 0,01
18:1 n-9	19,29 ± 0,04
18:1 n-7	1,28 ± 0,09
20:1 n-9	0,50 ± 0,02
<b><math>\Sigma</math> n-6 PUFA</b>	<b>54,16 ± 0,77</b>
18:2 n-6	54,06 ± 0,77
18:3 n-6	nd
20:2 n-6	0,09 ± 0,01
20:3 n-6	nd
20:4 n-6	nd
22:4 n-6	nd
22:5 n-6	nd
<b><math>\Sigma</math> n-3 PUFA</b>	<b>3,95 ± 0,17</b>
18:3 n-3	3,71 ± 0,05
18:4 n-3	0,07 ± 0,02
20:3 n-3	0,02 ± 0,03
20:4 n-3	nd
20:5 n-3	0,09 ± 0,10
22:5 n-3	nd
22:6 n-3	0,05 ± 0,05
$\Sigma$ n-3 LC-PUFA	0,16 ± 0,12
$\Sigma$ n-6 LC-PUFA	0,00 ± 0,00
n3/n6	0,07 ± 0,00
C18:1 n-9/ C18:0	9,34 ± 0,17
MUFA/ SFA	3,10 ± 0,02
PUFA/ MUFA	2,64 ± 0,05
PUFA/ SFA	3,10 ± 0,02
<b>% Ácido graso total (g ac. graso/ 100 g de pienso fresco)</b>	<b>2,76 ± 0,51</b>
<b>% Lípido total en peso seco (g de lípido/ 100 g de pienso seco)</b>	<b>4,92 ± 0,21</b>

SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; LC PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ( $\geq$ C20 y  $\geq$ 3 dobles enlaces); nd, no detectado. Los valores son expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n = 3).

**Tabla 2.** Clases lipídicas medido en % de área del pienso.

Clases Lipídicas	
PC	1,42 ± 0,08
PS	0,16 ± 0,04
PI	0,59 ± 0,08
PG	0,81 ± 0,06
PE	1,88 ± 0,55
MAG	7,57 ± 0,92
DAG	8,13 ± 0,64
CHO	4,86 ± 0,34
FFA	42,29 ± 1,55
TAG	26,47 ± 2,45
SE	5,83 ± 0,44

SM, esfingomielina; PC, fosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; PI, fosfatidilinositol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; MAG, monoacilglicéridos; CHO, colesterol; FFA, ácidos grasos libres; TAG, triacilglicéridos; SE, ésteres de esterol. Los valores son expresados como medias  $\pm$  desviación estándar (n = 3).

