

BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ

VOLUM 9 2005



IX Jornades de la Secció de Biologia de la Reproducció



Societat Catalana de Biologia

Barcelona, 26 de maig de 2005

ACTES DE LA IX JORNADA
DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ

SOCIETAT CATALANA DE BIOLOGIA
FILIAL DE L'INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

ACTES DE LA IX JORNADA DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ

Amb la col·laboració de:

Consell Superior d'Investigacions Científiques
Institut d'Estudis Catalans
Xarxa Temàtica de la Biologia de la Reproducció
Red Temática Nacional de Reproducción Porcina

Barcelona
2005

Jornada de Biologia de la Reproducció (9a : 2005 : Barcelona)

Actes de la IX Jornada de Biologia de la Reproducció

Textos en català, castellà i anglès. — Bibliografia

ISBN 84-7283-791-2

I. Societat Catalana de Biologia II. Consejo Superior de Investigaciones Científicas III. Títol

1. Reproducció — Congressos

575(061.3)

Il·lustració de la coberta: Rodolfo Tur, 1983. *Reproducció*. Acrílic sobre paper. 50 × 65 cm.

© dels autors de les ponències

Editat per la Societat Catalana de Biologia,

filiat de l'Institut d'Estudis Catalans

Carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona

Primera edició: maig de 2005

Tiratge: 125 exemplars

Text revisat lingüísticament i compost per Ricard Roca

Imprès per fotocomposició gama, s. l.

Carrer d'Aristides Maillol, 9-11. 08028 Barcelona

ISBN: 84-7283-791-2

Dipòsit Legal: B. 24656-2005

Són rigorosament prohibides, sense l'autorització escrita dels titulars del *copyright*, la reproducció total o parcial d'aquesta obra per qualsevol procediment i suport, incloent-hi la reprografia i el tractament informàtic, la distribució d'exemplars mitjançant lloguer o préstec comercial, la inclusió total o parcial en bases de dades i la consulta a través de xarxa telemàtica o d'Internet. Les infraccions d'aquests drets estan sotmeses a les sancions establertes per les lleis.

TAULA

SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DURANTE LA EXOCITOSIS DEL ACROSOMA Y RELEVANCIA PARA LA EVALUACIÓN DE CAPACIDAD FECUNDANTE E. R. S. Roldan	9
EFICIÈNCIA DE LA ICSI SEGONS DIFERENTS MIDES D'OÒCITS DE CABRES PREPÚBERS A. R. Jiménez-Macedo, B. Anguita, D. Izquierdo, M. T. Paramio	13
DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI I EXPRESSIÓ DE p34 ^{cdc2} EN DIFERENTS GRANDÀRIES D'OÒCITS DE CABRES PREPÚBERS B. Anguita, A. Jiménez-Macedo, D. Izquierdo, M. T. Paramio	17
CONDENSACIÓ DE LA CROMATINA DINS EL NUCLI ESPERMÀTIC DEL CEFALÒPODE <i>Sepia officinalis</i> F. Martínez, K. Kurtz, M. Chiva, E. Ribes	23
CHANGES IN PROTEIN COMPOSITION IN THE SPERMATIC CHROMATIN OF THE CEPHOLOPOD <i>Sepia officinalis</i> K. Kurtz, F. Martínez, E. Ribes, J. Ausió, M. Chiva	29
AROMATASA EN PECES TELEÓSTEOS M. Blázquez, F. Piferrer	39
ALTERACIONS EN LA FUNCIO OVÀRICA DE LA TRUITA EN RESPOSTA AL LIPOPOLISACÀRID BACTERIÀ N. Montserrat, M. Mas, L. Acerete, L. Tort, S. MacKenzie, A. Krasnov, F. W. Goetz, J. V. Planas	45
EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE INTERLEUCINA 6 (IL-6), IL-8, IL-10, INF- γ Y ÓXIDO NÍTRICO EN EL PLASMA SEMINAL COMO POTENCIALES MARCADORES DE INFECCIÓN O INFLAMACIÓN DEL TRACTO GENITAL MASCULINO F. Puccio, M. Cabrera, M. I. Camejo	51
EFFECTE DE LA TEMPERATURA SOBRE LA PROPORCIÓ DE SEXES DEL LLOBARRO (<i>Dicentrarchus labrax</i>) L. Navarro-Martín, M. Blázquez, F. Piferrer	55
MECANISMES MOLECULARS DURANT LA HIDRATACIÓ DE L'OU DE PEIXOS MARINS: PAPER D'UNA NOVA SUBFAMÍLIA DE CANALS MOLECULARS D'AIGUA M. Fabra, A. Tingaud-Sequeira, J. Cerdà	59
EXPRESSIÓ DE LES PROTEÏNES ASSOCIADES A QUIMIORESISTÈNCIA, MRP-1 I LRP EN CÀNCER DE PRÒSTATA N. Bergés, J. E. Diestra, A. Vidal, E. Condom, J. F. Suárez, F. Aguiló, R. Pérez-Tomás, P. Giménez-Bonafé	67
AVALUACIÓ DE L'EFICIÈNCIA DEL COLCEMID, NOCODAZOLE I VINBLASTINA PER A L'ENUCLEACIÓ QUÍMICA-MENT ASSISTIDA D'OÒCITS DE RATOLÍ I DE CABRA N. Costa-Borges, M. T. Paramio, J. Santaló, E. Ibáñez	73
FREQÜÈNCIA DE LES MICRODELECCIONS GR/GR, B1/B3 I B2/B3 DE LA REGIÓ AZFC DEL CROMOSOMA Y HUMÀ C. Gázquez, J. Oriola, L. Mengual, J. L. Ballescà, R. Oliva	81

ANÀLISI PROTEÒMICA D'ESPERMATOZOIDES DE PACIENTS ASTENOZOOSPÈRMICS I NORMOZOOSPÈRMICS J. Martínez, N. Torregrosa, D. Domínguez, J. M. Estanyol, L. Mengual, J. L. Ballescà, R. Oliva	85
DETECCIÓ DE PRECURSORS DE LA PROTAMINA P2 EN CÈL·LULES D'ESPERMATOZOIDES DE PACIENTS INFÈRTILS N. Torregrosa, J. Martínez, J. L. Ballescà, M. Meistrich, R. Oliva	89
ESTANDARDITZACIÓ DE LA TÈCNICA DE TUNEL EN ESPERMATOZOIDES. ANÀLISI DE FACTORS QUE PUGUIN PROVOCAR VARIACIONS EN ELS RESULTATS D. Domínguez, M. I. Camejo, J. L. Ballescà, C. Mezquita, R. Oliva	93
EFFECTE DELS DIFERENTS XOCS OSMÒTICS EN LES EJACULACIONS DE MASCLES REPRODUCTORS PORCINS (<i>Sus domesticus</i>) M. Yeste, M. D. Briz, E. Pinart, S. Sancho, N. Garcia-Gil, E. Badia, A. Pruneda, E. Bussalleu, I. Casas, S. Bonet	99
CULTIU DE CÈL·LULES EPITELIALS EPIDIDIMÀRIES DE <i>Sus domesticus</i> J. Bassols, E. Kàdar, M. D. Briz, E. Pinart, S. Sancho, N. Garcia-Gil, E. Badia, A. Pruneda, E. Bussalleu, M. Yeste, I. Casas, S. Bonet	105
MILLORA DE LA QUALITAT ESPERMÀTICA DE DOSIS SEMINALS DE MASCLES ASTENOTERATONECROSPÈRMICS PER FILTRACIÓ EN COLUMNES DE SEPHADEX NEUTRE E. Bussalleu, E. Pinart, M. D. Briz, S. Sancho, N. Garcia-Gil, E. Badia, J. Bassols, A. Pruneda, M. Yeste, I. Casas, S. Bonet	109
EFFECTES D'UNA ELEVADA FREQUÈNCIA D'EJACULACIÓ EN LA QUALITAT DE L'ESPERMA EPIDIDIMARI DE MAS- CLES REPRODUCTORS PORCINS A. Pruneda, E. Pinart, M. D. Briz, S. Sancho, N. Garcia-Gil, E. Badia, J. Bassols, E. Bussalleu, M. Yeste, I. Casas, S. Bonet	115
CAPACITAT REDUÏDA DE FECUNDACIÓ I DE GESTACIÓ DELS OÒCITS MI QUE MADUREN A MII EL MATEIX DIA DE LA PUNCIÓ I. Solvas, M. Grossmann, M. C. Pons, I. Vanrell, E. Coloma, E. Castellanos, J. Nadal	121
AVALUACIÓ DEL RENDIMENT DE FECUNDACIÓ <i>IN VITRO</i> EN DONES MAJORS DE QUARANTA ANYS I. Saumell, A. Veiga, B. Coroleu, P. N. Barri	125
ECLOSIÓ ASSISTIDA I MONOZIGOCITAT B. Gornals, I. Belil, R. Aurell, A. Veiga, P. N. Barri	131
DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL PER CRIBRATGE D'ANEUPLOÏDIES. RESULTATS PER INDICACIONS C. Mangrané, M. Parriego, F. Vidal, M. Sánchez, M. Boada, A. Veiga, P. N. Barri	137
DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL EN PACIENTS AMB MEIOSI MASCULINA ALTERADA M. Sabaté, B. Aran, F. Vidal, M. Parriego, A. Veiga	141
VALORACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA Y LA IMPLANTACIÓN DE BLASTOCISTOS CONGELADOS EN FUNCIÓN DE SU MORFOLOGÍA EMBRIONARIA EN DÍA 3 L. Sarabia, M. J. Torelló, A. Veiga, P. N. Barri	147
LEGISLACIÓ SOBRE LES TÈCNiques DE REPRODUCCIÓ HUMANA ASSISTIDA : UNA NORMATIVA EN CANVI M. Boada	151

PRESENTACIÓ

El volum que teniu a les vostres mans intenta reflectir la recerca que s'està duent a terme actualment a Catalunya en l'àmbit de la biologia de la reproducció, i inclou les comunicacions presentades a la IX Jornada de Biologia de la Reproducció, celebrada a Barcelona el 26 de maig de 2005. L'objectiu principal d'aquesta jornada és donar a conèixer la recerca, els resultats obtinguts i les aplicacions que s'estan desenvolupant en aquesta interessant disciplina científica. Així, hi assisteixen fonamentalment biòlegs, metges i veterinaris que treballen en diferents àmbits de la biologia reproductiva, des d'aspectes de recerca bàsica fins a aspectes aplicats a la salut humana o animal. A part dels professors i investigadors assistents, és molt important la presència de becaris i estudiants, per als quals aquestes jornades representen, a més, una important oportunitat de familiaritzar-se amb l'exposició i debat públic dels resultats de la seva recerca en un ambient propici per a l'intercanvi d'informació.

En els més de quinze anys que han passat des que es va celebrar la primera d'aquestes jornades el 1989, aquestes han esdevingut el principal fòrum de trobada i divulgació científica dels grups que treballen en biologia de la reproducció a Catalunya. La divulgació del que cada grup està duent a terme ajuda a l'establiment de cooperacions, a conèixer noves tècniques que s'estan aplicant i, en definitiva, a intercanviar informació i apropar els diferents grups de recerca en el tema comú de la reproducció. Amb els grans avenços que s'estan produint en els darrers temps en aquest camp, és important i necessària la seva celebració continuada perquè els investigadors tinguin l'oportunitat de debatre conjuntament sobre la seva feina. Vagi per endavant, doncs, el meu agraïment a tots els que amb la seva resposta i decidida participació han fet possible aquesta novena edició de les Jornades de Biologia de la

Reproducció i, en particular, als Drs. Eduardo Roldán i Montserrat Boada per acceptar de fer les presentacions inaugurals i de cloenda, respectivament.

Aquesta novena Jornada de Biologia de la Reproducció i aquest llibre representen l'esforç de molta gent. Així, voldria agrair a la Dra. Mercè Durfort per la confiança dipositada en mi per organitzar aquesta jornada, així com pels seus consells i encoratjament. Per la part més feixuga de totes, la petició d'ajuts, la difusió, la recepció d'originals, etc., he comptat amb la inestimable col·laboració de Maite Sánchez i Mariàngels Gallego, les dues secretàries administratives de la SCB, que en tot moment, amb una excel·lent disposició i bon humor han ajudat amb tot el que ha calgut. També vull agrair l'ajuda de Ricard Roca que, com sempre, ha fet una tasca excel·lent de composició i correcció del text; i a la Sílvia Joly, del nostre grup de recerca, per la seva ajuda amb els índexs del volum.

Finalment, voldria agrair el patrocini del CSIC, on vull destacar l'ajuda proporcionada pel Dr. Lluís Calvo i la Mercè Álvarez, de la delegació a Catalunya. També vull agrair l'ajuda rebuda de la secció de Biologia de la Reproducció de la SCB i, en particular, a la Dra. Francesca Vidal, per seu suport i bons consells. Cal també agrair als Drs. Josep Egozcue i Sergi Bonet haver fet possible ajudes a través de la Xarxa Temàtica de Biologia de la Reproducció i de la Red Temática Nacional de Reproducción Porcina, respectivament. A tots, moltes gràcies.

Barcelona, maig de 2005

FRANCESC PIFERRER

Coordinador de la IX Jornada de Biologia de la Reproducció i editor d'aquest volum.

SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DURANTE LA EXOCITOSIS DEL ACROSOMA Y RELEVANCIA PARA LA EVALUACIÓN DE CAPACIDAD FECUNDANTE

Eduardo R. S. Roldan

Grupo de Ecología y Biología de la Reproducción, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC).
José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid. Correo electrónico: roldane@mncn.csic.es.

Resumen

La exocitosis del acrosoma del espermatozoide es un proceso esencial para la fecundación. Se han caracterizado varios eventos de señalización molecular que son importantes durante este proceso, teniendo especial relevancia aquellos que involucran a lípidos de membrana. La acción de los agonistas fisiológicos (progesterona y zona pelúcida) causan una activación de fosfolipasas (PLC y PLA₂) y la subsiguiente generación de lípidos mensajeros, substratos y metabolitos activos, los cuales participan en los procesos de fusión de la membrana plasmática y la membrana externa del acrosoma.

Palabras clave Espermatozoide, acrosoma, transducción de señal, progesterona, zona pelúcida.

Durante la interacción con el óvulo, los espermatozoides experimentan la exocitosis del acrosoma (la *reacción acrosómica*), un proceso que es esencial para la fecundación. Existen dos agonistas principales de la exocitosis que se encuentran en las cubiertas del óvulo: la progesterona, que está atrapada en la matriz del *cumulus oophorus* o que puede ser producida por las células del *cumulus*, y la glicoproteína ZP3 de la zona pelúcida. Ambos agonistas actúan en conjunto para iniciar y completar la exocitosis; se considera que la progesterona sensibiliza y estimula al espermatozoide para una estimulación subsiguiente de la zona (Roldan *et al.*, 1994a).

Se ha reconocido desde hace varios años que el influjo de calcio extracelular al interior del espermatozoide es un evento temprano y obligatorio durante la reacción acrosómica. Sin embargo, los mecanismos moleculares de la señalización durante la exocitosis del acrosoma son todavía poco conocidos. Esto se debe en gran medida al hecho de que existe aún limitada información sobre los receptores espermáticos que interactúan con la progesterona o con la zona. Sin embargo, se han producido avances considerables en relación a la señalización intracelular mediada por lípidos y que conduce a la fusión de la membrana plasmática con la membrana externa del acrosoma (Roldan, 1998).

La estimulación de los espermatozoides con pro-

gesterona, zona pelúcida u otras sondas moleculares (por ejemplo, ionóforos de Ca²⁺ tales como A23187 o ionomicina), conduce a la exocitosis del acrosoma, ocasiona activación de fosfolipasas y la subsiguiente producción de mensajeros lipídicos. Una de las primeras respuestas reconocidas después de esta estimulación es la activación de una fosfolipasa C específica de fosfoinosítidos (PIP₂ y PIP), seguida de una activación de una fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC) y la liberación de varias especies moleculares de diglicéridos (diacil- y alquilacilgliceroles) (Roldan y Murase, 1994; Murase y Roldan, 1996; Vazquez y Roldan, 1997a,b).

Los estudios realizados con un sistema modelo (espermatozoides de morueco) estimulados con la sonda molecular A23187, en presencia de Ca²⁺, han puesto en evidencia que la activación de una fosfolipasa A₂ (PLA₂) es también un evento importante que subyace a la exocitosis del acrosoma (Roldan y Fragio, 1993; Roldan *et al.*, 1994b). La activación de PLA₂ requiere la internalización de Ca²⁺ y conduce a la hidrólisis de varios fosfolípidos (siendo PC el más importante) y liberación de ácidos grasos y lisofosfolípidos que tienen papeles fundamentales en la fusión de membranas.

Con el fin de comprender cómo se produce la activación de PLA₂ en respuesta a agonistas fisiológicos, se ha empleado un modelo de espermatozoides de cobaya capacitados *in vitro*, marcados con precursores radiac-

tivos y estimulados con progesterona o zona pelúcida (Yuan *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2005). Se ha encontrado que ambos agonistas estimulan la liberación de ácido araquidónico y lisoPC y un descenso en los niveles de PC, cambios que son indicativos de activación de PLA₂. La inclusión de ácido aristolóquico (un inhibidor de PLA₂) conduce a una inhibición de estos cambios lipídicos, así como a una inhibición de la exocitosis del acrosoma, lo que sugiere que los cambios lipídicos son importantes para la exocitosis.

La acción de la progesterona parece estar mediada por un receptor similar a los receptores GABA_A de neuronas. La inclusión de bicuculina (un antagonista de los receptores GABA_A) bloquea la liberación de ácido araquidónico y la exocitosis (Shi y Roldan, 1995). Además, el tratamiento con GABA mimetiza el efecto de la progesterona estimulando la liberación de ácido araquidónico (indicativo de actividad PLA₂) y la exocitosis.

La acción de la zona pelúcida no involucra la activación de receptores de tipo GABA sino que parece estar mediada por proteínas G_i, ya que la inclusión de toxina *pertusis* bloquea la liberación de ácido araquidónico y la exocitosis. No está claro si la acción sobre PLA₂ es directa o si está involucrado algún mensajero como el diacilglicerol, ya que trabajos previos demostraron que este lípido estimula la actividad de la PLA₂ (Roldan y Fragio, 1994; Roldan *et al.*, 1994b). Este efecto del diacilglicerol podría ser directo sobre la PLA₂ o mediado por proteína quinasa C (O'Toole *et al.*, 1996a; 1996b). Es posible que exista una participación de la PKC, ya que la estimulación de la PLA₂ inducida por tratamiento con progesterona o zona pelúcida se encuentra inhibida por estaurosporina, un inhibidor de la PKC (Shi *et al.*, 2005).

La activación de la PLA₂ puede estar regulada también por otros sistemas de señalización intracelular tales como la vía que involucra AMP cíclico y proteína quinasa A (Garde y Roldan, 2000). Se ha encontrado evidencia a favor de esta hipótesis, ya que la inclusión de H-89, un inhibidor de PKA, conduce a una ausencia de liberación de ácido araquidónico y de exocitosis cuando los espermatozoides son estimulados con progesterona o zona pelúcida (Shi *et al.*, 2005). Otra vía que también puede modular la actividad de PLA₂ incluye la MAP quinasa. Se obtenido evidencia preliminar que indica que dicha vía es importante en la regulación de la PLA₂ ya que la actividad de la enzima (y la exocitosis) se encuentra inhibida cuando se tratan los espermatozoides con inhibidores de la vía de la MAP quinasa.

Los estudios moleculares de la exocitosis del acrosoma pueden servir de base para el diseño de pruebas de evaluación de capacidad fecundante de los esperma-

tozoides. Estudios recientes han mostrado la concordancia fenotípica de varios parámetros del eyaculado y la relación de algunos de ellos con la fertilidad (Malo *et al.*, 2005).

BIBLIOGRAFÍA

- GARDE, J.; ROLDAN, E. R. S. (2000). «Stimulation of Ca²⁺-dependent exocytosis of the sperm acrosome by cAMP acting downstream of phospholipase A₂». *Reprod. Fertil.*, 118:57-68.
- MALO, A. F.; GARDE, J. J.; SOLER, A. J.; GARCIA, A. J.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E. R. S. (2005). «Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa». *Biol. Reprod.*, 72:822-829.
- MURASE, T.; ROLDAN, E. R. S. (1996). «Progesterone and the zona pellucida activate different transducing pathways in the sequence of events leading to diacylglycerol generation during mouse sperm acrosomal exocytosis». *Biochem. J.*, 320:1017-1023.
- O'TOOLE, C. M.; ROLDAN, E. R. S.; FRASER, L. R. (1996a). «Protein kinase C activation during progesterone-stimulated acrosomal exocytosis in human spermatozoa». *Mol. Hum. Reprod.*, 2:921-927.
- O'TOOLE, C. M.; ROLDAN, E. R. S.; HAMPTON, P.; FRASER, L. R. (1996b). «A role for diacylglycerol in human sperm acrosomal exocytosis». *Mol. Hum. Reprod.*, 2:317-326.
- ROLDAN, E. R. S. (1998). «Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis». *Front. Biosci.*, 3:D1109-1119.
- ROLDAN, E. R. S.; FRAGIO, C. (1993). «Phospholipase A₂ activation and subsequent exocytosis in the Ca²⁺/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa». *J. Biol. Chem.*, 268:13 962-13 970.
- (1994). «Diacylglycerols stimulate phospholipase A₂ and subsequent exocytosis in ram spermatozoa. Evidence that the effect is not mediated via protein kinase C». *Biochem. J.*, 297:225-232.
- ROLDAN, E. R. S.; MARTINEZ-DALMAU, R.; MOLLINEDO, F. (1994a). «Diacylglycerol and alkylacylglycerol stimulate ram sperm phospholipase A₂». *Int. J. Biochem.*, 26:951-958.
- ROLDAN, E. R. S.; MURASE, T. (1994). «Polyphosphoinositide-derived diacylglycerol stimulates the hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase C during exocytosis of the ram sperm acrosome. Effect is not mediated by protein kinase C». *J. Biol. Chem.*, 269:23 583-23 589.
- ROLDAN, E. R. S.; MURASE, T.; SHI, Q. X. (1994b). «Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida». *Science*, 266:1578-1581.
- SHI, Q. X.; CHEN, W. Y.; YUAN, Y. Y.; MAO, L. Z.; YU, S. Q.; ROLDAN, E. R. S. (2005). «Progesterone primes zona pellucida-induced activation of phospholipase A₂ during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa». *J. Cell. Physiol.* [En prensa]
- SHI, Q. X.; ROLDAN, E. R. S. (1995). «Evidence that

- a GABA_A-like receptor is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa». *Biol. Reprod.*, 52:373-381.
- VAZQUEZ, J. M.; ROLDAN, E. R. S. (1997a). «Diacylglycerol species as messengers and substrates for phosphatidylcholine re-synthesis during Ca²⁺-dependent exocytosis in boar spermatozoa». *Mol. Reprod. Dev.*, 48:95-105.
- (1997b). «Phospholipid metabolism in boar spermatozoa and role of diacylglycerol species in the de novo formation of phosphatidylcholine». *Mol. Reprod. Dev.*, 47:105-112.
- YUAN, Y. Y.; CHEN, W. Y.; SHI, Q. X.; MAO, L. Z.; YU, S. Q.; FANG, X.; ROLDAN, E. R. S. (2003). «Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa». *Biol. Reprod.*, 68:904-913.

EFICIÈNCIA DE LA ICSI SEGONS DIFERENTS MIDES D'OÒCITS DE CABRES PREPÚBERS

A. R. Jiménez-Macedo, B. Anguita, D. Izquierdo, M. T. Paramio

Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona.
08193 Bellaterra. Barcelona.

Resum

Els objectius d'aquest treball van ser l'avaluació de la competència meiótica dels oòcits de cabres prepúbers i la millora de les taxes de desenvolupament embrionari. Per això, es van dividir els oòcits madurats *in vitro* en quatre grups segons els seus diàmetres (grup *a*: < 110 µm Ø; grup *b*: 110-125 µm Ø; grup *c*: 125-135 µm Ø i grup *d*: > 135 µm Ø). Es van fecundar mitjançant la tècnica d'ICSI i es van cultivar en SOF durant cent noranta-dues hores més. També es fecundaren per FIV convencional un grup d'oòcits com a control de la ICSI. Els percentatges de blastocists obtinguts als grups *c* i *d* van ser de 15,9 i 11,8%, respectivament, i van ser estadísticament majors que en la resta de grups. Segons aquest resultat, els oòcits de cabres prepúbers amb diàmetres superiors (*c* i *d*) estan millor preparats per a la fecundació i el posterior desenvolupament embrionari que els de mida inferior. També s'ha aconseguit millorar els resultats de blastocists respecte als fecundats per FIV convencional (4%). Per tant, amb la ICSI s'han aconseguit millorar els resultats de desenvolupament embrionari respecte de la FIV. En conclusió, segons aquest treball, existeix una correlació positiva entre la grandària de l'oòcit i la seva competència citoplasmàtica, que es tradueix en un augment de les taxes de blastocists obtinguts.

Paraules clau Cabres, oòcits, ICSI.

Abstract

The objectives of this study were to evaluate the meiotic competence of prepubertal goat oocytes and the improvement of the embryo development. To achieve this, *in vitro* matured oocytes were divided in four groups according to diameter criteria (group *a*: < 110 µm Ø; group *b*: 110-125 µm Ø; group *c*: 125-135 µm Ø and group *d*: > 135 µm Ø). After that, they were fertilized by ICSI and cultured in SOF medium for 192 hours. There was also a control group of ICSI technique fertilized by conventional FIV. The blastocyst percentages obtained in groups *c* and *d* were 15.9 and 11.8%, respectively and they were statistically higher than the rest of groups. According to these results, prepubertal goat oocytes with higher diameter (*c* and *d*) were more prepared to fertilisation and embryo development than the smallest ones. There was also improved the result of blastocysts obtained by ICSI compared to IVF (4%). Thus, ICSI fertilisation has improved embryo development in relation to IVF. In conclusion, according to this work, there is a positive correlation between the diameter of the oocyte and its cytoplasmic competence improving the blastocyst rates.

Key words Goats, oocytes, ICSI.

INTRODUCCIÓ

Des que Uehara i Yanagimachi (1997) van obtenir naixements d'hàmsster a partir d'oòcits fecundats per ICSI, aquesta tècnica s'ha incorporat com una alternativa a la FIV convencional i actualment té molt d'èxit tant en casos d'infertilitat masculina (Palermo *et al.*, 1992) com en experimentació amb animals —vedella (Kefer *et al.*, 1990), truja (Kolbe i Holtz, 1999), ovella

(Gómez *et al.*, 1998), euga (Alm *et al.*, 2001) i cabra (Wang *et al.*, 2003).

Per a obtenir embrions produïts per ICSI és necessari que, un cop injectat l'espermatozoide, l'oòcit s'activi i iniciï la mitosi. Els oòcits de mamífer poden ser activats per nombrosos estímuls, tant químics com físics. Encara que en condicions normals és necessària la intervenció d'un espermatozoide per a activar l'oòcit, en espècies com l'hàmsster o el porc, l'esti-

Taula 1 Resultats de desenvolupament embrionari a les quaranta-vuit i cent noranta-dues hores postfecundació d'òcits de cabres prepúbbers separats segons mida i fecundats per ICSI i del grup control (FIV).

	total	48 h	< 16 cèHules	mòrules	blastocists
Grup a	3	1b (33,3)	1 (100) ^a	—	—
Grup b	53	32 ^a (60,3)	30 (93,7) ^a	2 (6,2) ^c	—
Grup c	103	69 ^a (66,9)	37 (53,6) ^c	21 (30,4) ^a	11 (15,9) ^a
Grup d	48	34 ^a (70,8)	24 (70,6) ^b	8 (23,5) ^{ab}	4 (11,8) ^{ab}
FIV	169	75 ^b (44,4)	61 (81,3) ^{ab}	10 (13,3) ^{bc}	3 (4,0) ^b

^{a,b,c,d} Valors amb diferent lletra tenen diferències estadístiques ($P < 0,05$)

mulació mecànica que s'exerceix amb la pipeta de microinjecció és suficient per a activar l'òcít partenogènèticament (Kim *et al.*, 1999). En canvi, per a altres espècies com la bovina, és necessària una estimulació química addicional a la ICSI convencional (Keefer *et al.*, 1990), encara que Katayose *et al.* (1999) utilitzant *piezo-drill* ICSI van aconseguir blastocists sense aquesta activació química.

En el cabrum s'han obtingut blastocists mitjançant ICSI utilitzant semen congelat i sense activació química (Keskin-tepe *et al.*, 1997). Wang *et al.* (2003), van aconseguir el naixement de cabrits utilitzant *piezo-drill* ICSI. En ambdós grups s'utilitzaren oòcits de cabres adultes. Jiménez-Macedo *et al.* (2005) van aconseguir embrions provinents de cabres prepúbbers activant els oòcits químicament després de la ICSI, encara que no van obtenir blastocists.

S'ha vist que els oòcits d'animals prepúbbers tenen taxes de fecundació inferiors que els d'adults. Es creu que és degut a deficiències en la seva maduració citoplasmàtica. Martino *et al.* (1994) van veure una correlació positiva entre el diàmetre dels oòcits i la seva competència per completar la maduració *in vitro*. A més, en estudis fets al nostre laboratori, hem vist una correlació positiva entre la mida de l'òcít i la fecundació *in vitro*.

A causa de les baixes taxes de fecundació i desenvolupament embrionari que s'obtenen amb cabres prepúbbers, en aquest treball es proposa fer un estudi de la competència citoplasmàtica dels oòcits de cabres prepúbbers, separant els oòcits en quatre grups diferents segons el seu diàmetre i fecundant-los posteriorment amb ICSI.

MATERIAL I MÈTODES

Es van obtenir ovaris de cabres prepúbbers d'un escorador i van ser transportats fins al laboratori a 38,5° C.

Els oòcits es van obtenir realitzant *slicing* dels ovaris

en medi TCM 199 (M-2520, Sigma) suplementat amb 2,2 mg/ml NaHCO₃, 2% (v/v) DBS (*donor bovine serum*, Cansera, Canadà) i 50 µg/ml de gentamicina a 37° C. Únicament van ser seleccionats els oòcits envoltats totalment de, com a mínim, quatre capes de cèl·lules del cúmulus, i amb el citoplasma homogeni. Es van fer grups de vint a vint-i-cinc complexos oòcít-cúmulus (COC) i es van posar en microgotetes de 100 µl de medi de maduració (MIV) (Urdaneta *et al.*, 2003) cobertes d'oli mineral (Rodríguez *et al.*, 2000). Els oòcits s'incubaren 27 h a 38,5° C en una atmosfera del 5% CO₂ en aire.

La fecundació es va realitzar amb semen fresc, seleccionant els espermatozoides més mòtils per *swim-up* durant una hora en medi mDM (Bracckett i Oliphant, 1975, modificat per Younis *et al.*, 1991). El sobrenadant es va centrifugar a 500 rpm durant vuit minuts per a concentrar el espermatozoides. El *pellet* es va diluir 1:1 en mDM i es va capacitar amb 200 nM de ionomicina i 10 µg/ml d'heparina, i es va incubar durant quinze minuts (Wang *et al.*, 2002). Es va separar un grup d'oòcits i es va col·locar en medi de FIV (Parish *et al.*, 1986). Aquest servirà com a grup control de fecundació per a la tècnica d'ICSI. Immediatament després es van inseminar amb una concentració de 4,10⁶ espermatozoides/ml i es van deixar en cocultiu durant vint-i-quatre hores. La resta d'oòcits es van desnudar i es van seleccionar únicament els que tenien el primer corpuscle polar visible i es van separar en quatre grups segons el diàmetre del seu citoplasma. Grup a: <110 µm Ø; grup b: 110-125 µm Ø; grup c: 125-135 µm Ø i grup d: > 135 µm Ø.

La ICSI es va realitzar seguint el protocol de Keskin-tepe *et al.* (1997) amb espermatozoides mòtils, i es va col·locar el corpuscle polar a les dotze o a les sis, indistintament (Stoddart *et al.*, 2000). Després de la injecció, els oòcits es van incubar durant vint-i-quatre hores en medi de FIV. Els embrions es van cultivar durant cent noranta-dues hores més en medi SOF en una atmosfera amb un 5% CO₂, 5% O₂ i 90% N₂, afegint

també sèrum fetal boví a l'1 % a les vint-i-quatre hores d'haver iniciat el cultiu dels embrions.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

A la taula es mostren els resultats del desenvolupament embrionari dels oòcits fecundats mitjançant ICSI i separats en diferents grups segons les grandàries del seu citoplasma i també dels fecundats per FIV.

Els percentatges dels embrions s'han donat sobre el total d'embrions observats a les quaranta-vuit hores postfecundació.

Del grup *a* es van aconseguir tres oòcits aptes per a ser fecundats per ICSI, és a dir, amb el 1r corpuscle polar visible, i només un es va dividir encara que no va superar l'estadi de dues cèl·lules. Als grups *b*, *c*, i *d* no es va trobar cap diferència significativa pel que fa a la divisió a les quaranta-vuit hores entre si, però sí amb respecte al grup de FIV, el qual va ser significativament inferior (60,3, 66,9, 70,8 vs. 44,4 %, respectivament). Aquests resultats podrien indicar que, inicialment, els grups *b*, *c* i *d* tenen tots els factors citoplasmàtics necessaris per a iniciar la mitosi sense que hi hagi diferències a causa de la seva mida. El fet que el grup control tingui resultats inferiors pot ser degut al fet que sobre aquest intervenen molts factors durant la fecundació que poden comprometre-la; en canvi, en els grups d'ICSI injectem directament l'espermatozoide i ens saltem tots els passos previs a la unió dels nuclis. Pel que fa als resultats del grup *a*, concorden amb els estudis previs realitzats al nostre laboratori amb FIV, on no s'han obtingut resultats de fecundació ni divisió embrionària. En els grups *a*, *b* i FIV es van trobar els majors percentatges d'embrions aturats amb menys de setze cèl·lules als vuit dies postfecundació. Respecte als estadis embrionaris avançats, trobem que els grups *c* i *d* tenen els millors percentatges tant de mòrules com de blastocists (mòrules: 30,4 i 23,5 %; blastocists: 15,9 i 11,8 %, respectivament). Al grup control (FIV), trobem valors més baixos, tot i que no es diferencien significativament dels percentatges del grup *d* (mòrules, 13,3 % i blastocists, 4 %). Respecte al grup *b*, aquest va proporcionar els valors més baixos de desenvolupament embrionari avançat i només vàrem obtenir mòrules (6,2 %).

Segons els resultats obtinguts en aquest treball, podríem dir que els oòcits dels grups *c* i *d* (els que tenen un major diàmetre) tenen major competència meiótica respecte als de grandària inferior, fet que concorda amb els resultats de maduració obtinguts per Martino *et al.* (1994) i el nostre grup (resultats no publicats).

En estudis anteriors fets en cabres prepúbers, no es van obtenir blastocists ni quan es van activar els oòcits

després de fer la ICSI ni quan es va aplicar la ICSI convencional i es van capacitar els espermatozoides amb heparina (Jimenez-Macedo *et al.*, 2005). En aquest estudi aconseguim obtenir blastocists aplicant la ICSI convencional sense activació química i capacitant els espermatozoides amb ionomicina.

En conclusió, oòcits de cabres prepúbers amb un diàmetre superior a 125 µm són més competents citoplasmàticament i estan millor preparats per la divisió embrionària que els de mida inferior. Amb aquests oòcits i fecundació per ICSI s'ha aconseguit obtenir blastocists en un percentatge superior a l'obtingut per FIV.

BIBLIOGRAFIA

- ALM, H.; TORNER, H.; BLOTTNER, S.; NÜRNBERG, G.; KANITZ, W. (2001). «Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes». *Theriogenology*, 56:817-829.
- GÓMEZ, M. C.; CATT, J. W.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. (1998). «Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization». *Theriogenology*, 49:1143-1154.
- JIMÉNEZ-MACEDO, A. R.; IZQUIERDO, D.; ANGUITA, B.; PARAMIO, M. T. (2005). «Comparison between intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilisation employing oocytes derived from prepubertal goat». *Theriogenology*. [En premsa]
- KATAYOSE, H.; YANAGIDA, K.; SHINOKI, T.; KAWAHARA, T.; HORIUCHI, T.; SATO, A. (1999). «Efficient injection of bull spermatozoa into oocytes using a piezo-driven pipette». *Theriogenology*, 52:1215-1224.
- KEEFER, C. L.; YOUNIS, A. I.; BRACKETT, B. G. (1990). «Cleavage development of bovine oocytes fertilized by sperm injection». *Mol. Reprod. Dev.*, 25:265-276.
- KESKINTEPE, L.; MORTON, P. C.; SMITH, S. E.; TUCKER, M. J.; SIMPLICIO, A. A.; BRACKETT, B. G. (1997). «Caprine blastocyst formation following intracytoplasmic sperm injection and defined culture». *Zygote*, 5:261-265.
- KIM, N.; JUN, S.; DO, J.; UHM, S.; LEE, H.; CHUNG, K. (1999). «Intracytoplasmic injection of porcine, bovine, mouse or human spermatozoon into porcine oocytes». *Mol. Repr. Dev.*, 53:84-91.
- KOLBE, T.; HOLTZ, W. (1999). «Intraytoplasmic injection (ICSI) of *in vivo* or *in vitro* matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawed epididimal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation in the pig». *Theriogenology*, 52:671-682.
- MARTINO, A.; MOGAS, T.; PALOMO, M. J.; PARAMIO, M. T. (1994). «Meiotic competence of prepubertal goat oocytes». *Theriogenology*, 41:969-980.
- PALERMO, G.; JORIS, H.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM,

- A. C. (1992). «Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of a single spermatozoon into an oocyte». *Lancet*, 340:17-18.
- PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRISTER, E. S.; EYESTON, W. H.; FIRST, N. L. (1986). «Bovine in vitro fertilization with frozen thawed semen». *Theriogenology*, 25:591-600.
- STODDART, N. R.; FLEMING, S. D. (2000). «Orientation of the first polar body of the oocyte at 6 or 12 o'clock during ICSI does not affect clinical outcome». *Hum. Reprod.*, 15:1580-1585.
- UEHARA, T.; YANAGIMACHI, R. (1977). «Behavior of nuclei of testicular, caput and cauda epididimal spermatozoa injected into hamster egg». *Biol. Reprod.*, 16:315-321.
- URDANETA, A.; JIMENEZ-MACEDO, A. R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T. (2003). «Supplementation with cysteamine during maturation and embryo culture on embryo development of prepubertal goat oocytes selected by the brilliant cresyl blue test (BCB)». *Zygote*, 11:347-354.
- WANG, B.; BALDASSARRE, H.; PIERSON, J.; COTE, F.; RAO, K. M.; KARATZAS, C. N. (2003). «The *in vitro* and *in vivo* development of goat embryos produced by intracytoplasmic sperm injection using tail-cut spermatozoa». *Zygote*, 11(3):219-227.
- WANG, B.; BALDASSARRE, H.; TAO, T.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; ZHOU, J. F.; LEDUC, M.; DUGUAY, F.; BILODEAU, A. S.; LAZARIS, A.; KEEFER, C.; KARATZAS, C. N. (2002). «Transgenic goats by DNA pronuclear microinjection of in vitro derived zygotes». *Molecular reproduction and development*, 63:437-443.
- YOUNIS, A. I.; ZUELKE, K. A.; HARPER, K. M.; OLIVEIRA, M. A.; BRACKETT, B. G. (1991). «*In vitro* fertilization of goat oocytes». *Biol. Reprod.*, 44:1177-1182.

DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI I EXPRESSIÓ DE P34^{cdc2} EN DIFERENTS GRANDÀRIES D'OÒCITS DE CABRES PREPÚBERS

Begoña Anguita, Ana Jiménez-Macedo, Dolors Izquierdo, Maria Teresa Paramio*

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona.
08193 Bellaterra. Tel. 935 811 456. Fax 935811494. Adreça electrònica: teresa.paramio@uab.es.

Resum

L'heterogeneïtat de la població oocitària d'ovaris recollits en escorxadors és molt gran, cosa que fa necessari un procés de selecció molt acurat que ens permeti detectar i seleccionar només aquella que pugui donar lloc a embrions viables. Fins ara, la producció *in vitro* de blastocists a partir d'oòcits de cabres prepúbères havia estat baixa, possiblement perquè els criteris de selecció utilitzats no eren prou eficients. Per tant, es va fer necessari trobar marcadors indicadors de la competència dels oòcits. Com a possible candidat es va analitzar l'expressió de la proteïna p34^{cdc2}, la subunitat catalítica del *maturation promoting factor* (MPF). Aquest complex és el principal regulador de la progressió meiòtica i un candidat a regular la maduració citoplasmàtica. Els resultats que es van obtenir indiquen que, efectivament, la capacitat dels oòcits per a donar lloc a blastocists es relaciona amb la quantitat de p34^{cdc2} detectada, de manera que es podria plantejar el seu ús com a possible marcador molecular de competència per al desenvolupament embrionari.

Paraules clau MPF, p34^{cdc2}, oòcit, cabra.

Abstract

Embryonic development and p34^{cdc2} expression in different sizes of prepubertal goat oocytes Oocytes from ovaries collected at the slaughterhouse present high heterogeneous characteristics, and as a consequence, an accurate oocyte selection is necessary to detect and select only oocytes capables to produce viable embryos. So far, *in vitro* blastocysts production from prepubertal goat oocytes has been low, possibly due to an inefficient oocyte selection. The search of new oocyte competence markers is needed. As a possible marker, we have analysed p34cdc2 protein expression, the catalytic subunit of Maturation Promoting Factor (MPF). This complex is the main meiotic regulator, and it is also thought to be a possible cytoplasmic maturation regulator. The results obtained show that oocyte competence to produce blastocysts is related to p34^{cdc2} protein detected, and therefore, its use as a possible molecular marker of embryonic development could be posed.

Key words MPF, p34cdc2, oocyte, goat.

INTRODUCCIÓ

Els oòcits que s'utilitzen en estudis de maduració *in vitro* (MIV), fecundació *in vitro* (FIV) i cultiu *in vitro* (CIV) són prèviament seleccionats per utilitzar només aquells que siguin capaços de donar lloc a embrions viables. Aquesta selecció se sol realitzar seguint criteris basats en la morfologia dels complexos cúmulus-oòcits (COC), de manera que només se seleccionen aquells que presenten citoplasma homogeni, estan envoltats per diverses capes de cèl·lules de cúmulus i, a més, tenen una mida gran. Tanmateix, el

percentatge de blastocists que s'ha aconseguit a partir d'oòcits de cabres prepúbères seleccionats seguint aquests criteris ha estat baix.

Els oòcits que s'utilitzen al nostre laboratori per a la MIV, FIV i CIV provenen d'ovaris recollits a l'escorxador. Això implica que la població oocitària que es recuperi d'aquests ovaris és molt heterogènia, i hi podem trobar diferents graus de desenvolupament i d'atrèsia. Per tant, és possible que criteris de selecció únicament basats en característiques morfològiques no siguin prou eficients per a seleccionar només els oòcits

Taula 1 Estadi nuclear de diferents mides d'oòcits de cabres prepúbbers en el moment de ser alliberats dels fol·licles.

Diàmetre	N	GV	GVBD	MI	A-T	MII	DEG
< 110 µm	75	62 <i>a</i> (82,66)	4 <i>a</i> (5,33)	2 (2,66)	0 (0)	0 (0)	7 <i>a,b</i> (9,33)
110-125 µm	105	51 <i>b</i> (48,57)	28 <i>b</i> (26,66)	5 (4,76)	0 (0)	0 (0)	21 <i>a</i> (20)
125-135 µm	250	34 <i>c</i> (13,6)	161 <i>c</i> (64,4)	20 (8)	1 (0,4)	4 (1,6)	30 <i>a,b</i> (12)
> 135 µm	198	3 <i>d</i> (1,51)	159 <i>d</i> (80,3)	15 (7,57)	0 (0)	4 (2,02)	17 <i>b</i> (8,58)

Taula 2 Estadi nuclear de diferents mides d'oòcits de cabres prepúbbers després de la MIV.

Diàmetre	N	GV	GVBD	MI	A-T	MII	DEG
< 110 µm	40	38 <i>a</i> (95)	1 <i>a,b</i> (25)	0 <i>a</i> (0)	0 (0)	0 <i>a</i> (0)	1 (2,5)
110-125 µm	145	38 <i>b</i> (26,21)	11 <i>a</i> (7,58)	64 <i>b</i> (44,14)	0 (0)	30 <i>b</i> (20,69)	2 (1,38)
125-135 µm	326	3 <i>c</i> (0,92)	8 <i>b</i> (2,45)	124 <i>b</i> (28,03)	0 (0)	189 <i>c</i> (57,97)	3 (0,92)
> 135 µm	91	0 <i>c</i> (0)	1 <i>b</i> (1,1)	17 <i>c</i> (18,68)	1 (1,1)	71 <i>d</i> (78,02)	1 (1,1)

Taula 3 Estadi pronuclear de diferents mides d'oòcits de cabres prepúbbers a les disset hores després de la FIV.

Diàmetre	N	No fec.	Fecundats			DEG
			1 PN	2 PN	POLISP	
< 110 µm	24	24 <i>a</i> (100)	0 (0)	0 <i>a</i> (0)	0 <i>a</i> (0)	0 (0)
110-125 µm	59	31 <i>b</i> (52,54)	2 (3,39)	17 <i>b</i> (28,81)	7 <i>a,b</i> (11,86)	2 (3,39)
125-135 µm	95	38 <i>b,c</i> (40)	2 (2,10)	33 <i>b</i> (34,74)	18 <i>b</i> (18,95)	2 (2,10)
> 135 µm	82	26 <i>c</i> (31,71)	3 (3,66)	34 <i>b</i> (41,46)	16 <i>b</i> (19,51)	3 (3,66)

Taula 4 Desenvolupament embrionari de diferents mides d'oòcits de cabres prepúbbers.

Diàmetre	<i>n</i>	Total DIV	Dividits			DEG	
			2-7 cèl.	8-16 cèl.	Mòrules Blastocists		
< 110 µm	30	0 <i>a</i> (0)	0 <i>a</i> (0)	0 (0)	0 (0)	0 <i>a</i> (0)	9 <i>a</i> (30)
110-125 µm	74	12 <i>b</i> (16,21)	10 <i>a</i> (13,51)	2 (2,70)	0 (0)	0 <i>a</i> (0)	29 <i>a</i> (39,19)
125-135 µm	154	61 <i>c</i> (40,13)	54 <i>b</i> (35,06)	3 (1,95)	1 (0,65)	3 <i>a</i> (1,95)	41 <i>a</i> (26,62)
> 135 µm	72	44 <i>d</i> (61,11)	31 <i>b</i> (43,05)	2 (2,78)	2 (2,78)	9 <i>b</i> (12,5)	10 <i>b</i> (13,89)

competents, i s'haurien de trobar altres marcadors de competència oocitària.

S'ha especulat que la incompetència oocitària pugui donar-se per una incompleta maduració nuclear o citoplasmàtica. El principal regulador de la maduració nuclear és el *maturation promoting factor* (MPF), complex format per una subunitat catalítica (p34^{cdc2}) i una subunitat reguladora (ciclina B1) (Labbé *et al.*, 1989). És necessària la unió d'aquestes dues subunitats i la fosforilació dels residus Thr 161, Thr 14 i Tyr 15 perquè el complex pugui activar-se. Aquesta activació només es donarà quan es produeixi la desfosforilació dels residus Thr 14 i Tyr 15 (Gautier *et al.*, 1991), procés catalitzat per la Cdc25 fosfatasa. L'activació del complex MPF donarà lloc a la represa de la meiosi en els oòcits. Per altra banda, el MPF també es considera un possible regulador de la maduració citoplasmàtica oocitària (Naito *et al.*, 1992).

La incompetència de l'oòcit pot estar relacionat

amb una deficiència en la síntesi o activació del complex MPF o alguna de les seves subunitats. D'aquesta manera, s'ha relacionat l'adquisició de competència meiótica amb la síntesi de p34^{cdc2} en ratolins (Chesnel i Eppig, 1995) i cabres adultes (Dedieu *et al.*, 1998). En canvi, la ciclina B1 es considera el factor responsable de la represa de la meiosi en vaques (Dedieu *et al.*, 1998) i truges (Sun *et al.*, 2001).

La nostra hipòtesi de treball és que la falta de competència en els oòcits de cabres prepúbbers es podria explicar per una falta en la síntesi de la subunitat catalítica del MPF, la p34^{cdc2}. Per tant, el nostre objectiu va ser l'estudi de l'expressió de la p34^{cdc2} i la capacitat per al desenvolupament embrionari de diferents grandàries d'oòcits, per estudiar la possibilitat de fer servir aquesta expressió com a indicador molecular de la competència oocitària.

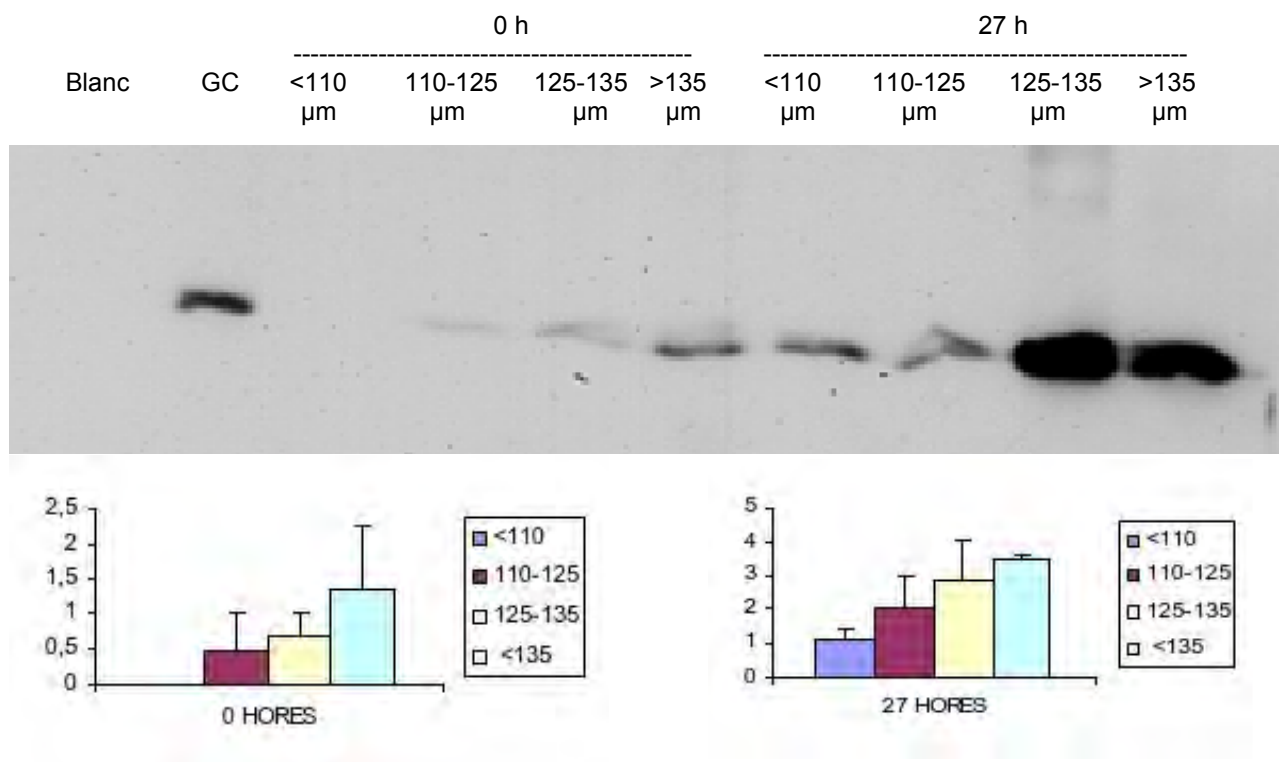


Figura 1 Expressió de la proteïna p34^{cdc2} en diferents mides d'oòcits de cabres prepúbères en el moment d'alliberament dels fol·licles i després de la MIV.

MATERIAL I MÈTODES

Els ovaris van ser recollits en un escorxador comercial, i van ser transportats al laboratori en PBS a 38,5° C en un temps màxim de dues hores. Els COC van ser alliberats dels fol·licles mitjançant *slicing*. Una part d'aquests COC van ser denudats en el moment de la recollecció, mesurats i es van classificar en grups segons el seu diàmetre: < 110 μm, 110-125 μm, 125-135 μm, > 135 μm. La resta de COC es van utilitzar per a la MIV, amb medi TCM199 suplementat amb hormones, 400 μM de cisteamina i 10% de sèrum boví. La MIV es va dur a terme en una atmosfera amb un 5% de CO₂ en aire i a 38,5° C durant vint-i-set hores. Després d'aquest període, una part dels COC madurats també van ser denudats i classificats en els grups de grandària abans especificats. La resta es van utilitzar per a la FIV.

Per a la FIV es va utilitzar semen fresc de mascles de fertilitat provada. Els espermatozoides mòbils es van seleccionar mitjançant *swim-up* durant una hora, i després es van capacitar amb 200 nM de ionomicina + 10 μg/ml d'heparina. El cocultiu d'oòcits i espermatozoides es va realitzar durant vint-i-quatre hores en unes condicions del 5% CO₂ en aire i 38,5° C. Després d'aquest període, els presumptes zigots es van

cultivar en medi SOF durant set dies més. El desenvolupament embrionari es va avaluar mitjançant tinció amb Hoechst.

Una part dels oòcits classificats per diàmetres en el moment de la recollecció i després de la MIV es van congelar en N₂ líquid i van ser emmagatzemats a -80° C, fins a la seva utilització per a l'extracció de proteïnes i posterior detecció de la proteïna p34^{cdc2} mitjançant *Western blot*.

L'extracció de proteïnes es va realitzar amb TriReagent® (T-9424, Sigma), seguint les instruccions del producte. El *pellet* de proteïnes corresponent a vint oòcits va ser resuspès en SDS 1%, i va ser utilitzat per a realitzar el *Western blot*. Breument, es va realitzar l'electroforesi de les proteïnes corresponent a vint oòcits en un gel d'acrilamida 10% a 25 mA constants. La transferència de les proteïnes a la membrana de nitrocellulosa es va realitzar durant una hora a unes condicions de 100 V constants. Després de la transferència, la membrana va ser bloquejada amb TBS+ 0,05 Tween20 + 1% de llet desnatada durant tota la nit. Es va incubar amb anticòs primari durant una hora. La incubació amb l'anticòs secundari es va realitzar durant trenta minuts. La detecció de la proteïna es va realitzar amb l'ECL-Plus Western Blotting Detection Kit (RPN2132, Amersham Biosciences).

El programa estadístic utilitzat per a l'anàlisi dels resultats va ser el GraphPad InStat 3.01 (Graph-Pad software). El test de Fisher va ser utilitzat per a determinar les diferències en els resultats de MIV, FIV i CIV dels diferents grups de diàmetres d'oòcits. Els resultats de l'expressió de proteïna p34^{cdc2} mitjançant *Western blot* van ser analitzats mitjançant el test ANOVA. Per a cada grandària, cada experiment va ser realitzat un mínim de tres vegades. Tots els valors amb valors amb una $P < 0,05$ es van considerar estadísticament significatius.

RESULTATS

La taula 1 mostra l'estadi nuclear dels diferents grups d'oòcits segons la seva grandària en el moment de ser alliberats del fol·licle. Es pot observar que la mida del diàmetre és més gran, el percentatge d'oòcits que han reprès la meiosi és significativament major (GV: $< 110 \mu\text{m}$: 82,66 %; $110\text{-}125 \mu\text{m}$: 48,57 %; $125\text{-}135 \mu\text{m}$: 13,6 %; $> 135 \mu\text{m}$: 1,51 %).

L'estadi nuclear en què es trobaven els oòcits després de la MIV es representa a la taula 2. Hi podem observar que la capacitat dels oòcits per a arribar a l'estadi de metafase II (MII) es relaciona amb la seva grandària ($< 110 \mu\text{m}$: 0 %; $110\text{-}125 \mu\text{m}$: 20,69 %; $125\text{-}135 \mu\text{m}$: 57,97 %; $> 135 \mu\text{m}$: 78,02 %).

La taula 3 reflecteix l'estadi pronuclear dels zigots a les disset hores de la FIV. Podem observar que el percentatge d'oòcits fecundats també augmenta amb la grandària de l'oòcit ($< 110 \mu\text{m}$: 0 %; $110\text{-}125 \mu\text{m}$: 47,46 %; $125\text{-}135 \mu\text{m}$: 60 %; $> 135 \mu\text{m}$: 68,29 %). Tanmateix, aquestes diferències en el nombre de fecundats totals no es reflecteixen estadísticament en el nombre de fecundats normals (2PN) si comparem els tres grups de major grandària, encara que sí que podem apreciar una tendència a augmentar a mesura que augmenta la grandària dels oòcits ($110\text{-}125 \mu\text{m}$: 28,81 %; $125\text{-}135 \mu\text{m}$: 34,74 %; $> 135 \mu\text{m}$: 41,46 %).

La taula 4 mostra el nombre de cèl·lules dels embrions després de set dies de cultiu *in vitro* segons la seva grandària. El nombre d'embrions totals que hi trobem també es relaciona amb el diàmetre dels oòcits ($< 110 \mu\text{m}$: 0 %; $110\text{-}125 \mu\text{m}$: 16,21 %; $125\text{-}135 \mu\text{m}$: 40,13 %; $> 135 \mu\text{m}$: 61,11 %). A més, es pot apreciar que el nombre de blastocists obtinguts és significativament superior en els oòcits de major grandària respecte als altres tres grups ($< 110 \mu\text{m}$: 0 %; $110\text{-}125 \mu\text{m}$: 0 %; $125\text{-}135 \mu\text{m}$: 1,95 %; $> 135 \mu\text{m}$: 12,5 %).

La figura 1 representa els resultats obtinguts en la detecció de la proteïna p34^{cdc2} mitjançant *Western blot*. Hi podem observar una tendència que la quantitat de proteïna detectada sigui més gran a mesura

que el diàmetre de l'oòcit també ho és en el moment d'alliberar-los dels fol·licles, encara que no és significativa ($< 110 \mu\text{m}$: 0; $110\text{-}125 \mu\text{m}$: $0,47 \pm 0,54$; $125\text{-}135 \mu\text{m}$: $0,69 \pm 0,33$; $> 135 \mu\text{m}$: $1,35 \pm 0,90$). Després de la maduració, observem un augment de la quantitat de p34^{cdc2} relacionat amb la mida dels oòcits ($< 110 \mu\text{m}$: $1,15 \pm 0,24$; $110\text{-}125 \mu\text{m}$: $2,02 \pm 0,94$; $125\text{-}135 \mu\text{m}$: $2,81 \pm 1,21$; $> 135 \mu\text{m}$: $3,43 \pm 0,18$).

DISCUSSIÓ

La capacitat d'un oòcit per a completar tant la maduració nuclear com la citoplasmàtica està directament relacionada amb el seu diàmetre, com hem pogut observar en els resultats de MIV, FIV i CIV. Aquesta relació s'ha establert també en altres espècies, en les quals es va relacionar la grandària dels fol·licles i, en conseqüència, la grandària d'un oòcit, amb la seva capacitat per a madurar (ratolí, Sorensen i Wassarman, 1976; rata, Bar Ami i Tsafiriri, 1981; truja, Motlik *et al.*, 1984; ovella, Moor i Gandolfi, 1987; vaca, Furher *et al.*, 1989; cabra, Martino *et al.*, 1994). El percentatge de blastocists obtinguts en cabres prepúbères ens ha permès observar, en el nostre cas, que ens interessa seleccionar aquells oòcits que presenten un diàmetre igual o superior a $135 \mu\text{m}$.

Hem trobat una clara relació entre la capacitat d'un oòcit per a mantenir el desenvolupament embrionari i la quantitat de proteïna p34^{cdc2} que expressa. Aquesta relació s'ha trobat tant en el moment d'alliberament dels oòcits dels seus fol·licles com després de la MIV. Això confirmaria, per tant, la hipòtesi que el MPF té un paper important en la maduració citoplasmàtica, a més de la maduració nuclear. Tanmateix, seria necessari realitzar un estudi de l'activitat del complex per veure si l'augment de proteïna p34^{cdc2} detectat en els oòcits de diàmetre més gran també es correspon amb un augment d'activitat del complex en aquests oòcits.

Per altra banda, s'ha observat que els oòcits més grans ja havien reprès la meiosi en el moment de la recollecció. Aquesta situació ens podria indicar que aquests oòcits provenen de fol·licles que han iniciat un procés d'atrèsia. Tanmateix, sembla que aquesta situació no afecta la capacitat d'aquests oòcits per a donar lloc a blastocists. De fet, Hendriksen *et al.* (2000) van suggerir que una situació moderada d'atrèsia en els fol·licles podria mantenir o induir en l'oòcit canvis similars a la premaduració que té lloc en el desenvolupament preovulatori *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

- CHESNEL, F.; EPPIG, J. J. (1995). «Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis». *Mol. Reprod. Dev.*, 40:503-508.
- DEDIEU, T.; GALL, L.; HUE, E.; LEDAN, E.; CROZET, N.; RUFFINI, S.; SEVELLEC, C. (1998). «p34 cdc2 expression and meiotic competence in growing goat oocytes». *Mol. Reprod. Dev.*, 50:251-262.
- GAUTIER, J.; SOLOMON, M. J.; BOOHER, R. N.; BAZAN, J. F.; KIRSCHNER, M. J. (1991). «Cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activate p34cdc2». *Cell*, 67:197-211.
- LABBÉ, J. C.; PICARD, A.; PEAUCELLIER, G.; CAVADORE, J. C.; NURSE, P.; DORÉE, M. (1989). «Purification of MPF from starfish: Identification as the H1 histone kinase p34cdc2 and a possible mechanism for its periodic activation». *Cell*, 57:253-263.
- NAITO, K.; DAEN, F. P.; TOYODA, Y. (1992). «Comparison of histone H1 kinase activity during meiotic maturation between two types of porcine oocytes matured in different media *in vitro*». *Biol. Reprod.*, 47:43-47.
- SUN, Q. Y.; LAI, L.; BONK, A.; PRATHER, R. S.; SCHATTEN, H. (2001). «Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: Effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition». *Mol. Reprod. Dev.*, 59:192-198.
- SORENSEN, R. A.; WASSARMAN, P. M. (1976). «Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte». *Dev. Biol.*, 50:531-536.
- BAR AMI, S.; TSAFRIRI, A. (1981). «Acquisition of meiotic competence in the rat: Role of gonadotropin and estrogen». *Gamete. Res.*, 4:463-472.
- MOTLIK, J.; CROZET, N.; FULKA, J. (1984). «Meiotic competence of pig oocytes isolated from early antral follicles». *J. Reprod. Fertil.*, 72:323-328.
- MOOR, R. M.; GANDOLFI, F. (1987). «Molecular and cellular changes associated with maturation and early development in early sheep eggs». *J. Reprod. Fertil.*, 34:55-69.
- FURHER, F.; MATR, B.; SCHELLANDER, K.; KALAT, M.; SCHLEGER, W. (1989). «Maturation competence and chromatin behaviour in growing and fully grown cattle oocytes». *J. Vet. Med.*, 36:285-291.
- MARTINO, A.; MOGAS, T.; PALOMO, M. J.; PARAMIO, M. T. (1994). «Meiotic competence of prepubertal goat oocytes». *Theriogenology*, 41:969-980.
- HENDRIKSEN, P. J. M.; VOS PLAM, STEENWEG, W. N. M.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J. (2000). «Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes». *Theriogenology*, 53:11-20.

CONDENSACIÓ DE LA CROMATINA DINS EL NUCLI ESPERMÀTIC DEL CEFALÒPODE *Sepia officinalis*

Fina Martínez,¹ Kathryn Kurtz,¹ Manel Chiva,¹ Enric Ribes²

Departament de Ciències Fisiològiques II. Facultat de Medicina.

Campus de Bellvitge. Feixa Llarga, s/n. 08907 Hospitalet de Llobregat. Tel. 934 035 824. Fax 934 024 268. Adreces electròniques: finamartinez@ub.edu, klurt00@smumn.edu, mchiva@ub.edu.

Departament de Biologia Cel·lular. Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

Av. Diagonal, 465 (1a planta). 08071 Barcelona. Adreça electrònica: eribes@ub.edu.

Resum

Durant l'espermioquèsi del cefalòpode decàpode *Sepia officinalis* el nucli espermàtic sofreix una lleugera elongació. La cromatina de tipus somàtic es condensa gradualment en grànuls de 18-20 nm. Els grànuls alhora s'organitzen en fibres de 20 a 25 nm i progressivament aquestes fibres es fusionen entre si per a donar lloc a fibres més gruixudes de 40-60-80 nm, fins a esdevenir la cromatina altament compacta del nucli espermàtic madur. Existeix una estreta relació entre la cromatina condensant, l'embolcall nuclear i la distribució dels microtúbuls perinuclears: les fibres de cromatina s'acumulen al llarg de l'eix acrosoma-centríol d'un dels laterals de l'espermàtida en elongació, lateral on hi ha els microtúbuls en la mateixa orientació; en el lateral oposat té lloc sobretot l'eliminació de nucleoplasma sobrer en forma de vesícules a causa de la compressió dels microtúbuls. En l'última etapa de la nucleomorfoquèsi, els microtúbuls es despolimeritzen i se separen del nucli.

Paraules clau Espermioquèsi, microtúbuls, nucleomorfoquèsi, cefalòpode.

Abstract

During spermiogenesis of the cephalopod decapod *Sepia officinalis*, the spermatid nucleus is slightly elongated. Somatic-like chromatin is gradually condensed in 18-20 nm thick granules, which will be organized in 20 to 25 nm thick fibers. These fibers are progressively fused with each other to form thicker ones 40-60-80 nm until the chromatin is highly packed in the ripe sperm nucleus. There is a close relationship between condensing chromatin, the nuclear envelope and perinuclear microtubules: chromatin fibers lay along the acrosome-centriole axis of one of the two sides of the elongating spermatid, side in which the microtubules are disposed in the same orientation; on the opposite side, is where the exclusion of the superfluous nucleoplasm takes place, due to the pressure of the microtubules. Finally, in the last step of spermiogenesis, the microtubules are eliminated from the nuclei.

Key words Spermiogenesis, microtubules, nucleomorphogenesis, Cephalopoda.

INTRODUCCIÓ

L'espermioquèsi és el procés de divisió i diferenciació cel·lular que té lloc en la gònada masculina, i que condueix a la formació dels espermatozoides madurs. L'última etapa d'aquest procés és coneguda com a *espermioquèsi*, en la qual les espermàtides haploides sofreixen una sèrie de canvis molt importants fins a esdevenir l'espermatozoide madur.

L'espermioquèsi dels mamífers és la millor estudiada (Fawcett, 1975), però cal tenir present que aquest

és un procés molt variable entre les diferents espècies animals i que, per tant, no es pot generalitzar i és necessari estudiar-la dins de cada grup d'animals. Un dels grans canvis que experimenta el genoma haploide de l'espermàtida és la condensació de la cromatina i la consegüent reducció del volum nuclear. Aquesta reducció de volum és deguda a un canvi més o menys important en la composició de la cromatina: generalment, les histones somàtiques són substituïdes per unes proteïnes específiques riques en aminoàcids bàsics, conegudes sota el terme genèric *sperm nuclear*

basic proteins (SNBP) (Kasinsky, 1989). La interacció d'aquestes proteïnes amb el DNA provoca la condensació de la cromatina. La diversitat de les SNBP és extraordinàriament elevada i, en conseqüència, la manera com la cromatina espermiogènica es condensa dins el nucli també és molt diversa. (Del Valle *et al.*, 1998).

Dins dels invertebrats els cefalòpodes són un grup interessant per a estudiar-ne l'espermiogènesi. Les primeres observacions morfològiques fetes al microscopi òptic daten de 1967 (Franzén, 1967); més endavant s'han realitzat també estudis ultraestructurals amb microscòpia electrònica (Maxwell, 1975). Recentment, hem estudiat amb profunditat la condensació de la cromatina espermiogènica en els octòpodes *Octopus vulgaris* i *Eledone Cirrhosa* i les seqüències de les protamines que produeixen aquests patrons de condensació.

En aquest treball hem estudiat aquest procés de condensació de la cromatina del cefalòpode decàpode *Sepia officinalis* al microscopi electrònic, per tal de tenir un estudi més complet d'aquest procés dins el grup dels cefalòpodes. Descriuim el patró de condensació que té lloc a causa de la interacció de les protamines de la sèpia (Martin-Ponthieu *et al.*, 1991; Schindler *et al.*, 1991) amb el DNA. També discutim el paper dels microtúbuls i la membrana nuclear en l'espermiogènesi.

MATERIAL I MÈTODES

Es va fer una recollecció de mascles de *Sepia officinalis* al mes de juliol (època de l'any en què aquestes espècies estan en reproducció), i es varen transportar en gel immediatament al laboratori per a fer-ne la dissecció i processar les mostres.

Es varen fixar porcions de gònades en 2,5 % glutaralhid, 3 % paraformalhid en tampó cacodilat 0,1 M pH 7,4 i es varen incloure en Spurr per a l'observació al TEM. Aquestes mostres varen ser observades en un microscopi electrònic de transmissió Hitachi 4-600 (Hitachi Ltd., Tòquio, Japó).

RESULTATS

El nucli de l'espermàtida més primerenca (just després de la meiosi) presenta un aspecte de la cromatina de tipus somàtic on s'aprecia la heterocromatina i l'eucromatina (vegeu la figura 1a). Immediatament després, la cromatina adquireix un aspecte homogeni en forma de grànuls (vegeu la figura 1b). En la mateixa figura s'observa l'inici de la polarització de la cèl·lula: es dona un acúmulo de mitocondris allí on s'iniciarà la

invaginació flagellar (base) i una aglutinació de vesícules (procedents del Golgi), que formaran l'acrosoma (àpex). En aquestes zones on hi ha contacte entre la vesícula acrosòmica per l'àpex i els mitocondris i la invaginació per la base, s'observa una clara electrodensificació de l'embolcall nuclear. Aquesta cèl·lula espermiogènica inicial té una secció de 4 µm. En un estadi una mica posterior (vegeu la figura 1c), ja són evidents tant la invaginació centriolar (vegeu la figura 1e), com la vesícula acrosòmica (vegeu el detall de la figura 1d). En aquesta fase, la cromatina es troba distribuïda homogèniament dins el nucli, organitzada en forma de grànuls de 18-20 nm (vegeu el detall de la figura 1e). En aquest detall veiem també com, per una banda, s'intueix l'ancoratge d'aquesta cromatina en grànuls a la membrana interna de l'embolcall nuclear de la invaginació i que aquesta s'electrodensifica; per altra banda, també s'aprecien els microtúbuls que comencen a formar-se a partir de la part basal (vegeu les fletxes de la figura 1e). Aquest estadi és l'estadi més primerenc en què hem pogut observar els microtúbuls, i es pot veure que l'orientació d'aquests no és la mateixa en un lateral de l'espermàtida que en l'altre: en el costat esquerre de la fotografia es diferencien molt millor que no pas en el costat dret, a causa de la diferent disposició en l'espai.

La condensació de la cromatina avança, i els grànuls passen a organitzar-se en fibres de 20 a 25 nm de diàmetre (vegeu la figura 1f). Aquestes fibres no solament estan ancorades en la membrana de l'àpex, sinó que també s'ancoren a la membrana lateral (vegeu el detall i les fletxes de la figura 1h). En aquest mateix estadi, hi ha hagut també una elongació del nucli: l'eix acrosoma-centríol mesura 5,2 µm. Aquí els microtúbuls perinuclears apareixen ja del tot formats, ja que es poden observar en talls a diferents nivells de l'espermàtida en elongació (vegeu el detall i les fletxes de la figura 1h).

Progressivament, aquestes fibres es fusionen entre si i donen lloc a fibres de cromatina més gruixudes de 40 a 50 nm (vegeu la figura 1i). De fet, aquest és el canvi més important que hi ha hagut en aquest estadi respecte l'anterior, ja que la forma i mida del nucli es mantenen molt similars (compareu les figures 1f i i). La figura 1j mostra un detall de la zona apical (acrosoma), on es veu que la unió de les fibres de 40 nm a l'embolcall nuclear és similar a les fibres de 20 nm: es troben unides a la base, a l'àpex i també a la membrana lateral. La figura 1k mostra un tall transversal d'aquest estadi on es veu que no totes les fibres es troben en la mateixa direcció, sinó que hi ha fibres que estan tallades transversalment i, en canvi, en el lateral oposat, hi ha fibres ancorades perpendicularment a la membrana. Quan en aquest estadi observem la distribució dels mi-

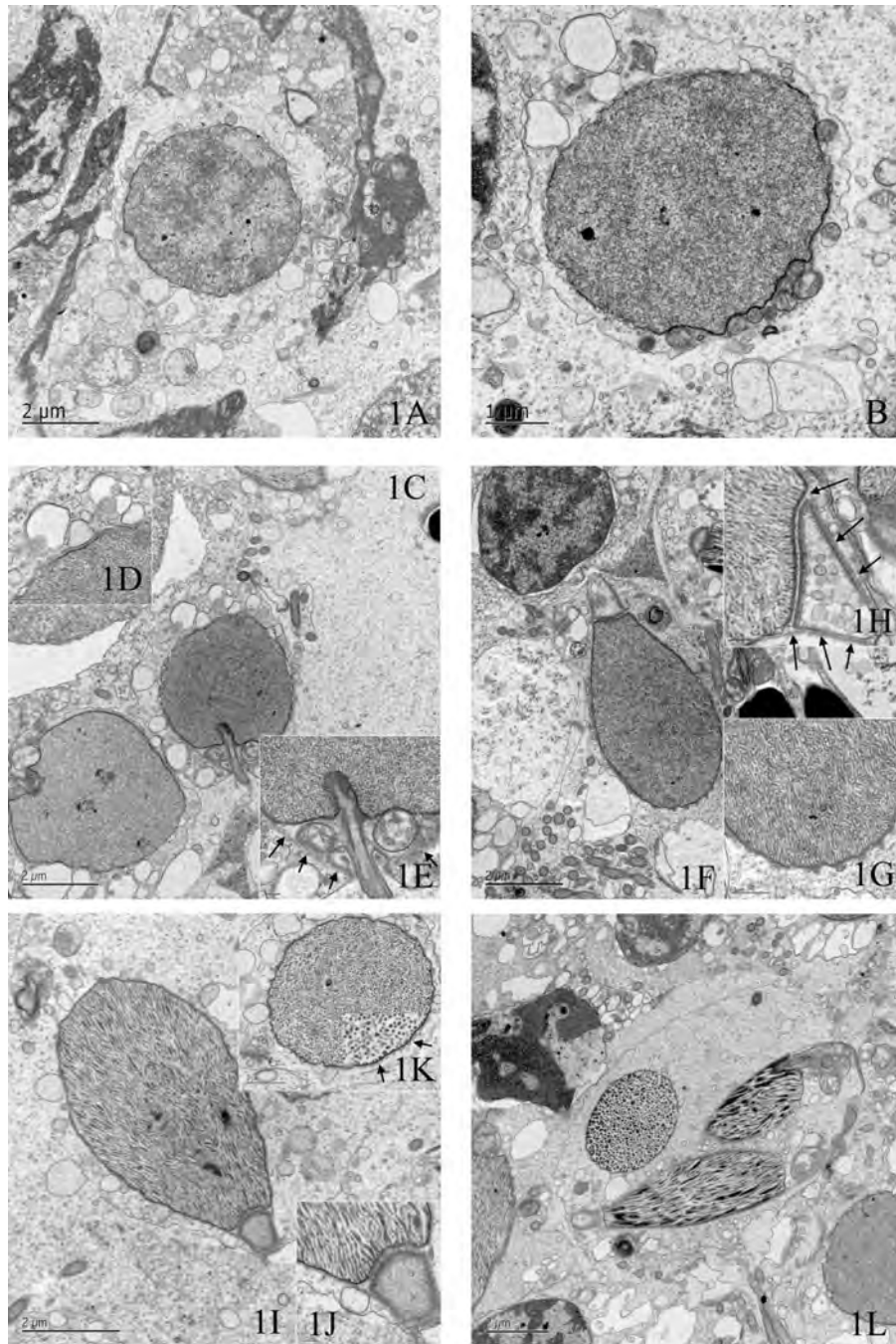


Figura 1 **A:** Espermàtida temprana just després de la meiosi, en la qual es pot diferenciar l'heterocromatina i l'eucromatina. **B:** Espermàtida rodona en els seus inicis de polarització: la cromatina és homogènia, pas previ a l'organització en grànuls. El nucli té una secció de 4 μm de diàmetre. **C:** Imatge panoràmica d'una espermàtida en la qual la cromatina està organitzada en grànuls de 18-20 nm. **D:** Detall de la zona apical on es veu l'acrosoma en formació (rebut vesícules del Golgi) i l'electrodensificació de la membrana de contacte. **E:** Detall de la base on s'inicia la invaginació: aquí es poden veure els microtúbuls (fletxes) orientats de manera diferent en un lateral que en l'altre; els mitocondris a la base de la invaginació, i l'electrodensificació de la membrana nuclear en la zona de la invaginació. **F:** Visió panoràmica d'una espermàtida en la qual les fibres mesuren 20-25 nm. **G:** Detall de l'estadi de les fibres. **H:** Detall de la zona apical on es veuen els microtúbuls (fletxes). **I:** Espermàtida més avançada. **J:** Detall de les fibres de cromatina de 40 nm. Noteu també l'ancoratge d'aquestes a la membrana. **K:** Secció transversal on es veu la diferent distribució de les fibres i microtúbuls; en el detall els microtúbuls i la membrana estan a major augment. **L:** Secció longitudinal i transversal d'una espermàtida en l'inici de la distribució asimètrica de la cromatina.

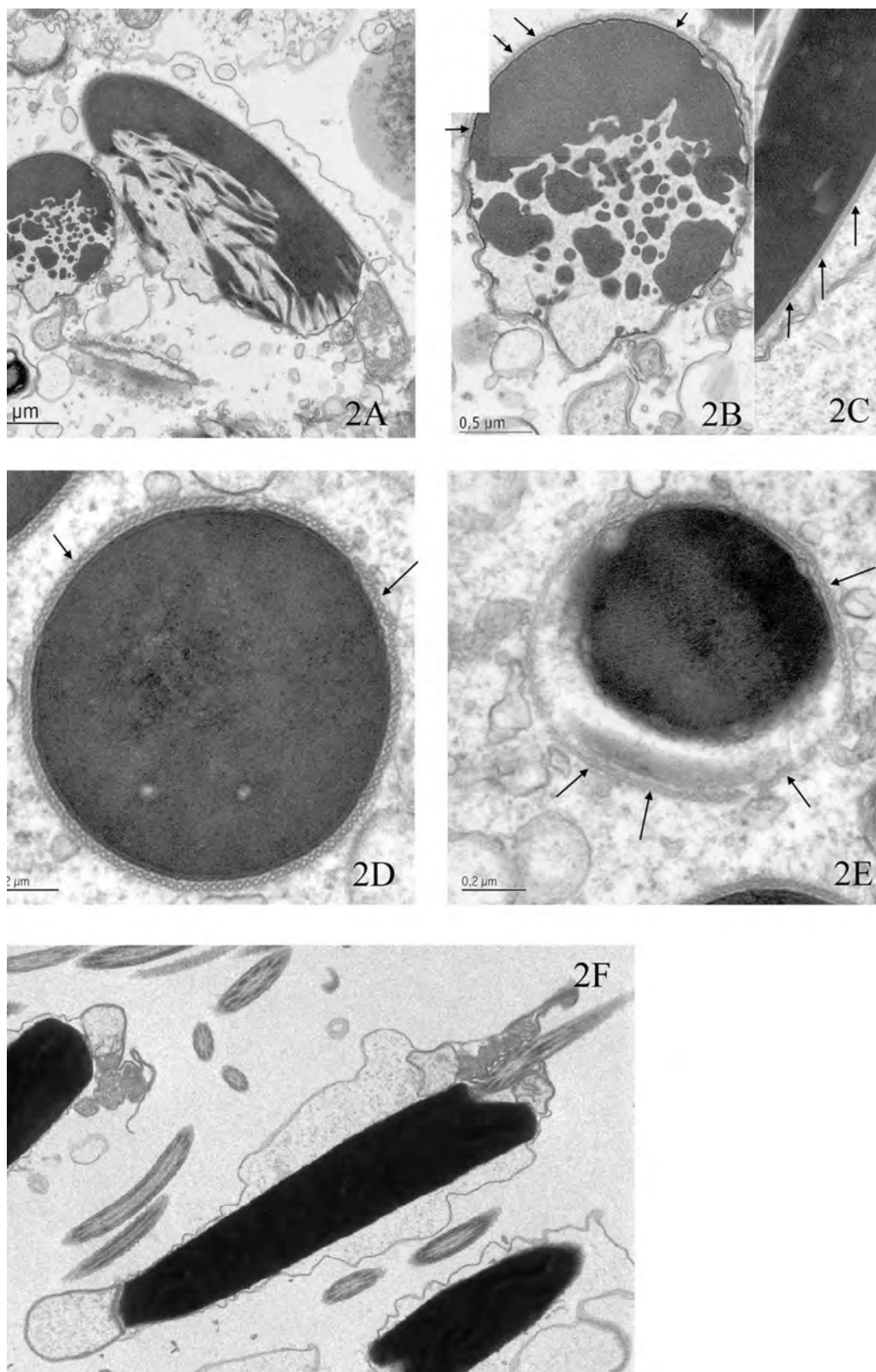


Figura 2 **A:** Imatge panoràmica on es pot veure la distribució de la cromatina en un dels laterals de l'espermàtida. **B:** Detall de la secció transversal (noteu els microtúbuls). **C:** Detall de la secció longitudinal. **D:** Nucli espermàtic amb la cromatina ja condensada. Noteu els microtúbuls perinuclears. **E:** Pèrdua de microtúbuls al final de l'espermiogènesi.

crotúbuls, veiem que hi ha una estreta relació: allí on les fibres estan tallades transversalment, els microtúbuls també es troben tallats transversalment i, de fet, la zona de contacte entre microtúbuls i la cromatina condensant amb la membrana és la mateixa (vegeu el detall ampliat de la figura 1k); en canvi, en el lateral oposat, on les fibres estan ancorades perpendicularment a la membrana, els microtúbuls en aquest costat tenen una orientació diferent i no es poden veure amb claredat.

Les fibres de 40 nm s'associen entre si, i formen fibres de 70-80 nm de gruix distribuïdes homogèniament al llarg de l'eix acrosoma-centríol. La figura 1l mostra un estadi immediatament posterior, on s'inicia el que més endavant es fa evident: una distribució asimètrica de la cromatina condensant. Tant en els dos talls longitudinals com transversals (que estan en el mateix estadi), s'aprecia l'inici de com la cromatina tendeix a disposar-se en el lateral on hi ha la invaginació. Aquesta distribució de la cromatina és conseqüència, en part, de la unió de les fibres en condensació que es troben unides a la membrana lateral (com ja hem vist en els estadis anteriors) i, en part, a la distribució dels microtúbuls perinuclears. La següent figura (2a) ho demostra: en aquest tall transversal, veiem com la cromatina s'aglutina en un lateral, i com hi ha una estreta relació entre aquest fet i els microtúbuls: els detalls demostren clarament com els microtúbuls estan posats en els laterals on s'acumula la cromatina i els podem veure tant transversalment (vegeu la figura 2b) com longitudinalment (vegeu la figura 2c).

Paral·lelament a aquest procés de condensació també es dona una compressió del nucli i una reducció del volum nuclear. En la figura 2b es veu com l'empaquetament i reclutament de la cromatina en un lateral comporta que hi hagi altres zones de la membrana del lateral oposat «lliures», que seran eliminades en forma de vesícula, amb el nucleoplasma sobrer.

La figura 2d mostra el resultat d'aquest procés de condensació de la cromatina i reducció de volum nuclear, en què els microtúbuls envolten completament el perímetre del nucli i la cromatina està totalment condensada. Posteriorment, i abans que l'espermàtida passi a l'epidídim, els microtúbuls són eliminats i degradats (vegeu la figura 2e).

En els primers trams de l'epidídim, els espermatozoides han perdut els microtúbuls (vegeu la figura 2f). L'espermatozoide mesura 6 µm de llarg i té una secció de 4 µm.

DISCUSSIÓ

Les observacions realitzades en aquest treball indiquen que en l'espermioogènesi del cefalòpode *Sepia officinalis* hi ha diversos aspectes a tenir en compte per a poder entendre en procés.

En primer lloc, cal esmentar que el procés de condensació de la cromatina en el decurs de l'espermioogènesi és el resultat d'un canvi progressiu de les proteïnes que interaccionen amb el DNA. El cas de la sèpia es caracteritza per una doble transició en la composició proteica del nucli, on les histones són primer reemplaçades per una proteïna precursora de la protamina (microheterogènia) i, posteriorment, aquesta serà substituïda per la protamina (Martin-Ponthieu *et al.*, 1991; Schindler *et al.*, 1991). El punt de partida és l'espermàtida rodona amb un aspecte i composició de la cromatina similar a la d'un nucli somàtic, on es diferencia l'heterocromatina i l'eucromatina, i el DNA s'organitza en nucleosomes (cosa que coneixem com a *somatic-like chromatin*). A partir d'aquí, la cromatina s'organitza en grànuls de 18-20 nm; després en fibres de 20-25 nm i posteriorment aquestes fibres es fusionen entre si i formen fibres més gruixudes (40-60-70 nm) fins a formar la cromatina altament compacta del nucli madur. Els motius concrets pels quals es donen aquests canvis en la condensació de la cromatina encara no s'entenen del tot bé, però estan estretament lligats amb els canvis de composició de les proteïnes del nucli.

Un altre aspecte molt important a tenir en compte per a entendre el procés de diferenciació del nucli espermàtic de sèpia és l'estreta relació que mantenen l'embolcall nuclear, els microtúbuls i la cromatina condensant durant l'espermioogènesi.

En estadis primerencs, quan l'espermàtida rodona comença a polaritzar-se, l'embolcall nuclear s'electrodensifica per les zones de contacte amb l'acrosoma (àpex) i la invaginació i mitocondris (base) (vegeu la figura 1b). Posteriorment, tant en les fibres de 20-25 nm com en les de 40-45 nm s'ancoren a l'àpex, a la base i, diferentment del que hem observat en *Octopus*, també s'uneixen en un dels laterals (vegeu les figures 1h i k). En aquest estadi també hi ha hagut una lleugera elongació del nucli respecte l'estadi anterior, possiblement a causa de la formació dels microtúbuls perinuclears, ja que és en aquesta fase on els podem observar tot al llarg de la perifèria nuclear. En els següents passos és quan es veu clarament una relació directa entre la manera com es disposa la cromatina condensant, els microtúbuls i la membrana nuclear: la membrana nuclear del lateral on s'acumula la cromatina és més electrodensa, i els microtúbuls estan disposats en la mateixa orientació que la cromatina (vegeu el detall de

la figura 2b); per altra banda, la membrana del lateral oposat és més laxa i és principalment per on tindrà lloc la pèrdua de nucleoplasma sobrer; aquí és més difícil diferenciar el microtúbuls, atès que es troben en una orientació diferent (vegeu la figura 2a i el detall de la 2b).

Quan la cromatina condensada ocupa la totalitat del volum del nucli, veiem que els microtúbuls es troben disposats un al costat de l'altre, tot al llarg del perímetre nuclear i que, finalment, abans de deixar la gònada són eliminats (vegeu la figura 2d), i ens trobem a l'epidídim els espermatozoides sense microtúbuls. Ja el 1975, Maxwell havia observat la presència dels microtúbuls perinuclears en els decàpodes i octòpodes (Maxwell, 1975, 1974, respectivament), i fa esment que es tracta d'estructures transitòries que acaben sent eliminades en ambdós grups. En l'estudi de l'espermioogènesi d'*Eusepia officinalis* (ref. 7), Maxwell descriu la nucleomorfogènesi com un procés de canvi de forma, en què el nucli de l'espermàtida rodona inicial sofreix una compressió lateral. En aquest treball, no obstant això, hem observat que l'espermàtida rodona (de 4 µm de diàmetre) sofreix una lleugera elongació, ja que hem observat estadis intermedis on la llargada és de 5,4 µm (vegeu la figura 1i). I en l'epidídim l'espermatozoide madur de *Sepia officinalis* mesura 7 µm de llarg i 1,17 µm d'ample (vegeu la figura 2f).

Aquest treball ha estat finançat pel projecte BMC 2002-04081-C02-02.

AGRAÏMENTS

Voldríem agrair a la Dra. N. Cortadellas i a A. García els seus consells i el seu interès en aquest treball.

BIBLIOGRAFIA

- DEL VALLE, L. [*et al.*] (1998). «Empaquetament del DNA en els espermatozoides». *Treballs de la SCB*, 48:199-224.
- FAWCETT, D.W. (1975). *Develop. Biol.*, 44:394-436.
- FRANZÉN, A. (1967). «Spermiogenesis and spermatozoa of the Cephalopoda». *Ark. Zool.*, 19:320-334.
- KASINSKY, H. E. (1989). «Specificity and distribution of sperm basic proteins». Dins: HNILICA, L. S.; STEIN, G.; STEIN, J. (ed.), *Histones and other basic nuclear proteins*, Boca Raton, Florida: CRC Press.
- MARTIN-PONTHIEU [*et al.*] (1991). «Cuttlefish sperm protamines. I: aa sequences of two distinct variants». *Eur. J. Biochem.*, 195:611-619.
- MAXWELL (1974). «Spermiogenesis of *Eledone cirrhosa*». *Proc. R. Soc. Lond.*, 186:181-190.
- (1975). «Spermiogenesis of *Eusepia officinalis*, *Loligo forbesi* and *Allotheuthis subulata*». *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 191:527-535.
- SCHINDLER, P. [*et al.*] (1991). «Cuttlefish sperm protamines. II: Mass spectrometry of protamines and related peptides». *Eur. J. Biochem.*, 195:621-629.

CHANGES IN PROTEIN COMPOSITION IN THE SPERMATIC CHROMATIN OF THE CEPHOLOPOD *Sepia officinalis*

Kathryn Kurtz,¹ Fina Martínez,¹ Enric Ribes,² Juan Ausió,³ Manel Chiva¹

¹ Departament de Ciències Fisiològiques II. Facultat de Medicina, Campus Bellvitge. Feixa Llarga, s/n. L'Hospitalet de Llobregat 08907. Tel. 934 035 824. Fax 394 024 268. E-mail: kkurt00@smumn.edu, finamartinez@ub.edu, mchiva@ub.edu.

² Departament de Biologia Cel·lular. Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. E-mail: eribes@ub.edu.

³ Department of Biochemistry and Microbiology, University of Victoria. Victoria, British Columbia, Canada V8W 3 P6. E-mail: jausio@uvic.ca.

Abstract

Much variation has been characterized among species at different levels in the maturation process of male haploid germ cells known as spermiogenesis. In the cuttle-fish, two protein transitions occur to displace histones causing morphological changes in the nucleus, from a round nuclear form with granular chromatin to an elongated nucleus with fibrillar chromatin, which eventually merges to a condensed, homogeneous mass. A basic nuclear protein called precursor protamine, which later converts into protamine, displaces histones playing a role in the morphological changes in nuclear form and chromatin condensation that occur in the male germ cells of *Sepia officinalis*. By using immunolocalization techniques observed in the Transition Electron Microscope, it appears that amounts of histone H4 begin to diminish once fine fibers form, around stage three of spermiogenesis. Precursor protamine appears significantly from the second phase of spermiogenesis, playing an important role in the formation of fine chromatin fibers from granular chromatin. In this investigation, results show that in the phases of chromatin maturation in spermatogenesis, histone H4 is present from the initial stages until thick fibers are formed; precursor protamine is present in the transition from granular to fine fibers of chromatin, and its presence increases greatly once clearly defined fibers are formed in the process of spermiogenesis in *Sepia officinalis*.

Key words Spermiogenesis, protamine, histone, immunolocalization.

INTRODUCTION

In spermiogenesis, morphological changes have been observed in the male haploid gamete, leading to an elongated and chromatin dense nucleus reduced in volume. The granular chromatin from the round nucleus converts into long, dense fibers in an elongated nucleus, which later changes into a pole shaped nucleus which has completely dense and compacted homogeneous chromatin (Ribes *et al.*, 2001). These changes in nuclear form and chromatin condensation can be attributed to a progressive change in the composition of the proteins which interact with the DNA in the sperm nucleus (Ribes *et al.*, 2004). Among organisms, there is a great variability in nuclear protein transitions during spermiogenesis. The general case is that his-

tones are substituted by sperm nuclear basic proteins, or SNBP (Ribes *et al.*, 2004). Many forms of SNBP's exist. For example, a direct replacement of histones by protamines occurs in the spermatid chromatin of vertebrates such as trout (Iatrou and Dixon, 1978). In other species of invertebrates, both histone and histone-like proteins are present in the sperm chromatin, such as that of some echinoderms like sea urchin (Sellows and Kmeicik, 1985). Cases of multiple protamine variants also exist, as in octopus spermatid chromatin (Giménez-Bonafé *et al.*, 2004) while in other organisms protamine-like proteins exist in chromatin of late spermatozoa, increasing in quantity throughout the stages of spermatozoan chromatin development, such is the case in *Haliotis asinina* (Suphamungmee *et al.*, 2005). Cases also exist of linker histone vari-

ants replacing similar linker histones during spermatid differentiation (Manochanter *et al.*, 2005).

Two major protein transitions occur in the chromatin composition during spermiogenesis in *Sepia officinalis* (Wouters-Tyrou *et al.*, 1991), acting to replace the presence of the histones in the nucleosome. First, a protamine precursor, existing of two protein variants and comprised of highly basic amino acids and rich in arginines appears to promote a progressive condensation of chromatin (Wouters-Tyrou *et al.*, 1991). In its initial stages, the precursor is tri-phosphorylated at serine and threonine residues, as well the carboxy-terminal domain which, following cleavage of the amino terminal domain, comprises the protamines derivative of the corresponding precursor form. This second protein transition occurs at the end of elongation of the nucleus (Rousseaux-Prévost *et al.*, 1988) and is found in only the most mature and compact spermatozoid chromatin (Wouters-Tyrou *et al.*, 1991).

Our intent in this investigation is to study the stage of chromatin maturation associated with these protein transitions, which seem to function in causing the morphological changes and chromatin condensation observed in the nucleus of the male haploid germ cells during spermiogenesis. *Sepia officinalis* was chosen as a model to study these changes in nuclear protein composition in which there occur two protein transitions (Rousseaux-Prévost *et al.*, 1988). The differentiated neuroendocrine organ, internal fertilization, and the presence of all types of germinal cells in the testes of this animal make the cuttle-fish a good model to study, as it is suggested that there exists a close relationship of *Sepia officinalis* to other cephalopod and higher invertebrates (Rousseaux-Prévost *et al.*, 1988).

MATERIALS

Mature and immature male cuttle-fishes were obtained from of the Mediterranean coast of Cataluña, Spain. Gonads were dissected from fresh animals, and treated according to future use of the tissues, either frozen directly or fixed in the proper fixing buffer.

METHODS

Nuclear purification and protein extraction

Epididymus and testes tissues of *Sepia officinalis* were homogenized in ice-cold buffer, containing 10 mM Tris, 0.15 M NaCl, and 25 mM benzamidine chloride, a protease inhibitor, and then centrifuged for

5 minutes at 5000 rpm. The pellets were rehomogenized in a buffer containing 0.3 M sucrose, 20 mM Tris/HCl pH 7.5, with 2.5 mM calcium chloride, 25 mM benzamidine chloride, with 0.5% Triton-X 100. The solution was settled 10 minutes on ice, centrifuged again, and the pellets homogenized a third time in the same buffer without Triton X, and then centrifuged. The nuclei were washed with 1 mM Tris/HCl pH 7.5 and 1 mM EDTA. The solution was centrifuged and homogenized with 5 volumes of 0.4 N HCl on ice. The solution was centrifuged again 5 minutes at 10,000 rpm at 4° C. The supernatant was precipitated with 6 volumes of acetone at -20° C. The solution was centrifuged at 8,000 rpm at 4° C. The proteins were recovered in the precipitated sediment and washed in acetone and dried in a concentrator (Speedvac).

Electrophoresis

For analysis of proteins a 15% acrylamide-acetic acid-6M urea gel was used, due to insolubility of protamines in SDS-containing buffers. Protein samples were dissolved in same buffer containing 8 M urea, 5% acetic acid, 20 mM beta-mercaptoethanol, and 1% methylene green. Electrophoresis was performed at 150 V at constant voltage, with the cathode at the bottom of the gel, for 2 hours, using 5% acetic acid as the running buffer. The gel was stained with 0.25% Coomassie Brilliant Blue R-250 in 50% methanol and 10% acetic acid until clearly stained bands appeared, followed by destaining in 5% methanol and 7% acetic acid until the contrast between gel and protein bands was easily apparent.

Western Blot analysis

Western blotting was performed to insure antibody specificity for the three proteins being studied. Proteins were separated by gel electrophoresis as previously described. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane at 400 mA for 45 minutes at 4° C. using 7% acetic acid, 30% methanol as the transfer buffer. The membranes were blocked with 3% powdered condensed skim milk, or with 5% milk, 1% BSA (as was the case in the immunoblot for precursor protamine detection) diluted in PBS pH 7.4 for 1.5 hours, and then incubated with the primary antibody overnight at 4° C in the same block that was used to block the membrane. The dilutions of the antibodies were 1 µg/ml for anti-H4, 6 µg/ml for anti-H1, and 1:1000 for the serum containing anti-precursor protamine. The membranes were washed several times in distilled water, then incubated with the appropriate HRP-conjugated antibody, either anti-mouse, in the case of anti-H1, or anti-rabbit antibody, in the cases of anti-H4 and anti-precursor

protamine. Secondary antibody incubations, in dilutions of 1:5000 were for 2.5 hours at room temperature, followed by extensive washing of the membrane in distilled water, then a was with PBS pH 7.4 containing 0.005% Tween-20, and final washing with distilled water before revealing the membrane with ECL in a dark room.

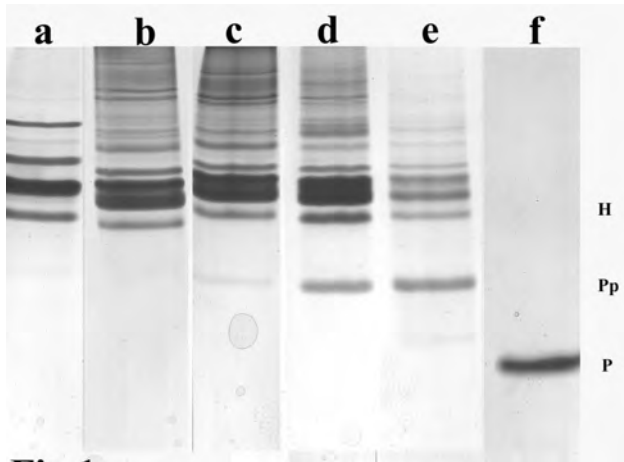


Figure 1 Change in nuclear proteins during spermiogenesis of *S. officinalis* on 15% polyacrylimide/ acetic acid/ urea gels. **Lane a:** Histone standard from lamprey. Electrophoretic pattern of nuclear proteins contained in the nuclei of male gonads from cuttlefish, of increasing maturity (lanes b-e). **Lane b:** The most immature testes show this pattern of histone proteins, and no band of precursor protamina. The comparison of lanes b through e shows that the histone content develops from being mostly histone proteins, to a lesser protein density of histones with the appearance of precursor protamine. The intermediate phase of testes maturity shows a band of more dense precursor protamine, which continues to intensify in the most mature phases, while the histone bands fade in density. **Lane c:** The thick histone bands indicate the nuclei from this male gonad are immature, and the faint precursor protamine band (Pp) indicates that the nuclei from which these proteins were extracted are more mature than those shown in lane b. **Lane d:** The gonad is a bit more mature than that used for extracts shown in lane c. The amount of histones is similar based on the intensity of the bands, yet there is noticeably a higher quantity of precursor protamine, due to the more intense band at the migration point of this protein. **Lane e:** nuclear extract from testes shows lesser contents of histones (H), and a strong apparent band of precursor protamine (Pp), marking the testes from which the nuclear proteins were extracted as the most mature, due to its protein pattern. **Lane f:** Nuclear extract from the epididymus of *Sepia officinalis*, showing only protamine (P). The protamine protein migrates further in the gel, corresponding to the lower molecular weight once the amino terminus has been cleaved from the precursor.

Tissue preparation for immunolocalization

Testes were obtained from sexually mature cuttle-fish. Pieces of testes 1.5 mm in diameter were fixed in a 1% glutaraldehyde plus 4% paraformaldehyde buffer and embedded in Lowicryl resin.

Immunolocalization

Lowicryl embedded ultrathin sections of the testes were obtained and mounted on 300-meshnickel grids. The applications of various solutions to the tissue sections were done by floating the grids, tissue-side down, on drops of relevant solutions. The sections were first blocked for 30 minutes in 0.1 M PBS pH 8.1 with 1% BSA, in the case of localizing H4, or with 0.1 M PBS pH 8.1 with 4% BSA, 1% goat serum, and 20 mM glycine for localization of precursor protamine. The primary and secondary antibodies were diluted in 0.1 M PBS pH 8.1 with 1% BSA in the case of localizing H4 and with 0.1 M PBS pH 8.1 with 4% BSA, 1% goat serum, containing 0.01% Tween-20 for H1 and precursor localizations. The primary antibodies were applied to at concentrations of 4, 6, and 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the case of H4 and at dilutions of 1:600 and 1:1000 for the precursor antibody. Negative controls were done on trials with each of the three antibodies used to in the localizations with the step of the primary antibody omitted and incubation of this stage was with the antibody diluting solution alone. Further negative controls were done with the same treatments, but with epididymus tissues instead of testes being mounted on the grid. Following primary antibody incubation, the grids were washed several times with the solution used to dilute the antibodies. The secondary antibodies, goat anti rabbit in the case of precursor and H4, conjugated with gold of 15 nm, was applied at a dilution of 1:25. Following incubation with the secondary antibody, a series of extensive washing was done with 0.1 M PBS pH 8.1, followed by several washes with distilled water before being dried. The sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate and then washed in distilled water and dried. Ultrathin sections were examined for immunogold labelling by TEM.

Electron microscopy

Testes and epididymus from *Sepia officinalis* were pre-fixed in 2.5% glutaraldehyde-paraformaldehyde in 0.1% cacodylate buffer (pH 7.3) and then post fixed in 1% osmium tetroxide (in 0.1 M cacodylate buffer). After fixation the tissues were dehydrated and embedded in Spurr's resin. Ultrathin sections were stained with uranyl and lead citrate and examined in a Hitachi

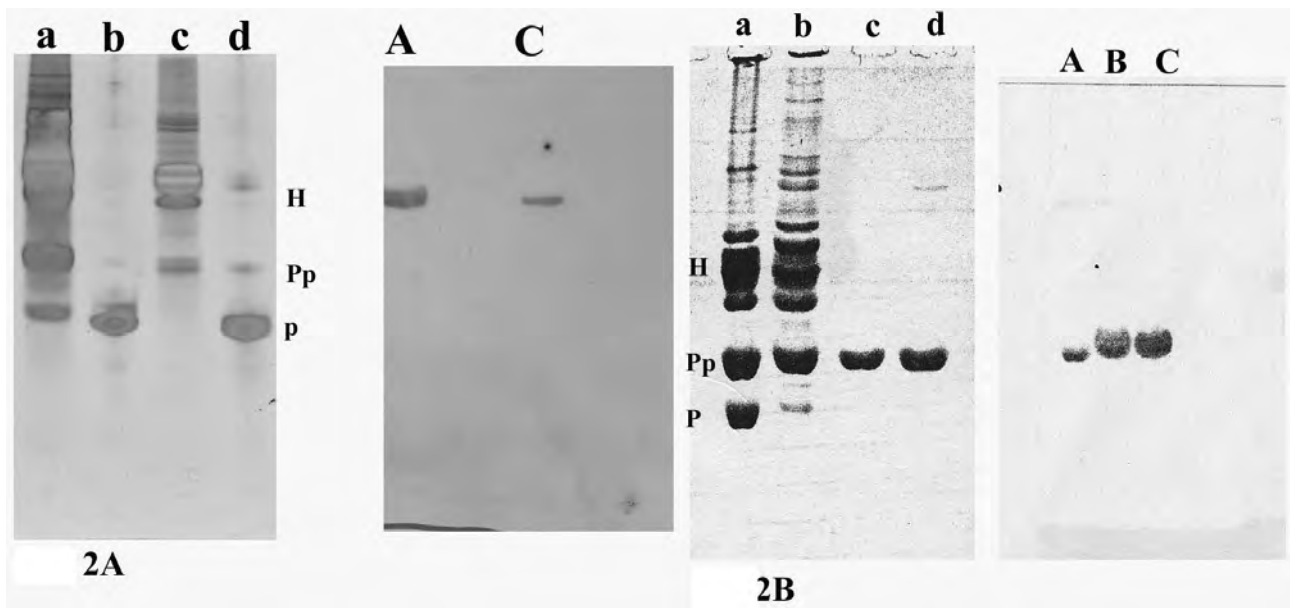


Figure 2 **Figure 2A.** Western Blot analysis of anti-histone H4. **Lanes a-d:** 15% polyacrylamide/ acetic acid/ urea gel transferred to nitrocellulose membrane used for blot. **Lane a:** nuclear extracts from mature gonad of cuttlefish. **Lane b:** nuclear extracts from epididymus of cuttlefish. **Lane c:** nuclear extracts from mature gonad of sepiola. **Lane d:** nuclear extracts from epididymus of sepiola. **Lane A:** revealed film, showing antibody binding to the site on the membrane corresponding to the migration of histone H4 from sepiola. **Lane C:** Label from anti-H4 antibody binding to the site of migration of the histone H4 in the sepiola. The marking of the antibody at these two points only shows specificity of the antibody for only histone H4. **Figure 2B.** Western Blot analysis of anti-precursor. **Lanes a-d:** Acetic acid urea gel of sperm nuclear proteins. **Lane a:** sperm nuclear extracts from squid. **Lane b:** Sperm nuclear extracts from cuttlefish. **Lane c:** Precursor protamine, isoform P2. **Lane d:** Precursor protamine, isoform P1. **Lanes A-B:** Revealed film from Western Blot with anti-precursor protamina. **Lane A:** Antibody reactivity to squid precursor protamine. **Lane B:** anti-precursor activity to precursor from cuttlefish. **Lane C:** Anti-precursor antibody reactivity to precursor protamine extract, isoform P1. Western blotting proves that the antibody specifically recognizes the precursor protamina, in its P1 isoform.

H-600 transmission electron microscope (Ribes *et al.*, 2001)

RESULTS AND DISCUSSION

Basic nuclear proteins

The observed proteins from nuclear extracts of testes from cuttle-fish at various stages of maturity show that in the most initial stages of spermiogenesis, containing mostly spermatogonia, primary and secondary spermatocytes, and round spermatids, only histones in the nuclei of the cells are present in the electrophoretic pattern (see figure 1). The migration of the histones can be observed from top (anode) to bottom (cathode). A slight trace of precursor protamine was observed in the nuclear extract of immature gonads. In intermediately mature gonads, the precursor band is slightly more intense. Finally, in mature gonads, a heavy precursor band is noticed along with the histones. According to the maturity of the male gonad from the sepiola used to

extract the nuclear proteins, the quantity of precursor protamine in the nuclear extracts vary. Gonads with more nuclei in elongation begin to demonstrate precursor protamines, and elongated and electrodense nuclei will show protein extracts of precursor, although it is unclear if the cleavage of the precursor into the protamina occurs in the gonad, or in the epididymus.

Western Blot analysis

Western Blotting analysis proved that the antibody to histone H4 was very specific in recognizing its antigenic site (see figure 2a). Since H4 is the most evolutionarily conserved histone, it makes sense that this antibody easily recognizes the antigenicity of H4 and easily maintains the specificity it has for its epitope on this histone.

The precursor antibody was generated against the most initial phase of the precursor protamine, the phosphorylated form. Therefore, this antibody recognizes the most initial phases of the first protein transitions that take place in the cuttle-fish male germ cell nucleus

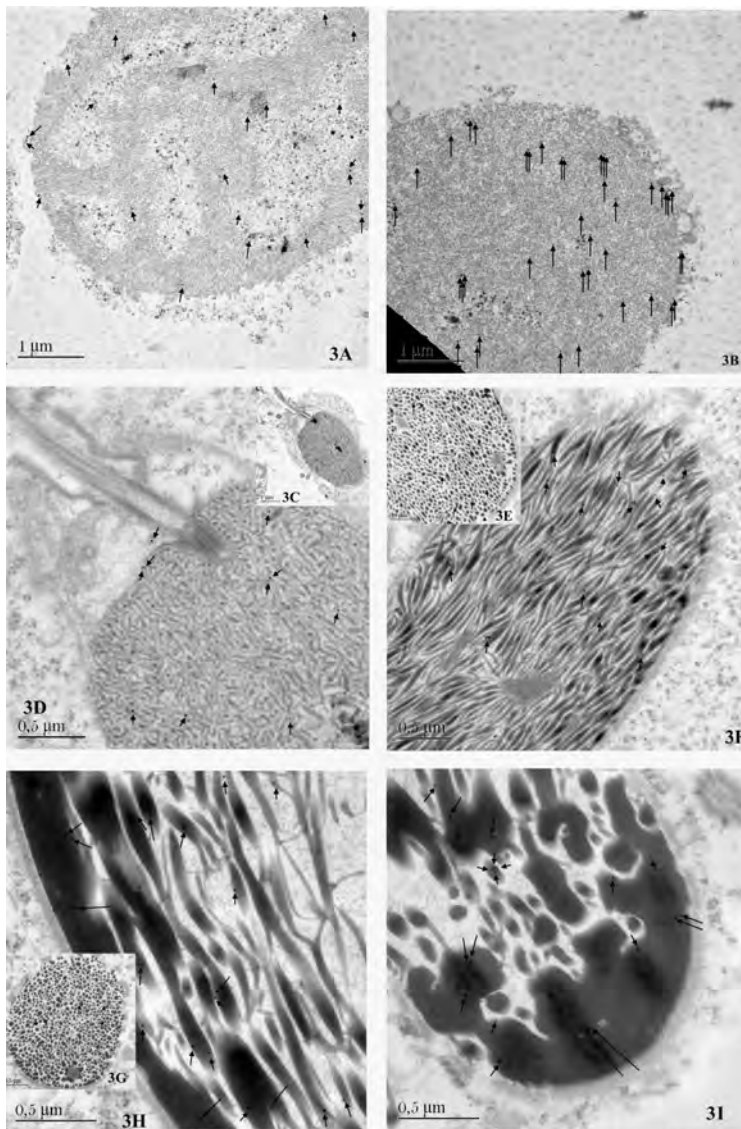


Figure 3 Transmission electron microscopy images from *Sepia officinalis* spermiogenesis, demonstrating the H4 immunolabeling at six of the phases described in spermiogenesis. **3A:** spermatocyte, the most initial phase of spermiogenesis, where euchromatin and heterochromatin coexist in the nucleus. Immunogold labels of 15 nm are difficult to see without the use of amplification of the image by using tools of a computerized program. The arrows were placed on labels identified with the help of Photoshop to amplify the image, allowing the ability to distinguish where the labels were located in the nucleus. **3B:** Early round spermatid, phase 2 of spermiogenesis. The chromatin is a homogenous mass of granular heterochromatin, and the nucleus maintains its round shape. **3C:** Spermatid nucleus at phase 3, showing the morphology of the fine chromatin fibers which have begun to form from the granules of chromatin in the previous phase. The nucleus is beginning to elongate in form. The invagination of the developing flagella is another identifying characteristic of this phase. **3D:** Detail of the nucleus in phase 3 around the base of the invagination of the flagella where mitochondria have accumulated, a characteristic of a nucleus in this phase. The thin fibers show a comparable amount of labeling in relation to a similar small surface area of a nucleus of phase 2. **3E:** Inset showing the transversal view of a nucleus at the fourth stage of sperm maturation. Notice the thicker chromatin fibers. Less labelling is noticed, due to the lesser exposition of surface area of chromatin fibers in comparison to that of a lateral view. **3F:** Lateral cut of an elongating spermatid in phase 4 of spermiogenesis. The chromatin is now organized in long thick fibers and the nucleus is stretching out in shape. Initiating from this phase there are noticeably fewer labels marking antibody binding once negating the unspecific binding of the secondary antibody observed in this phase (see figure 3.1 A). When subtracting the unspecific labeling on dense chromatin, it is evident that the labeling from phase 4 to the end of spermiogenesis is due to the tendency of the secondary antibody to unspecifically bind to electrodense chromatin, and the labeling does not actually signify the presence of H4 (see figure 3.1). **3G:** Transversal view of the thick fibers, characteristic of a nucleus in stage 5. Little marking is shown. **3H:** Detail of an elongated spermatid. The thick fibers from the previous phase have merged into fewer, thicker and denser fibers, and the nucleus has further elongated in form. **3I:** Elongated spermatid with homogeneously condensed chromatin. The chromatin dense, thick fibers from the previous phase have now begun to attach to the surrounding nuclear envelope for further diminution of the nuclear volume; the nuclear form is now very elongated.

during spermiogenesis, and immunoblotting indicates

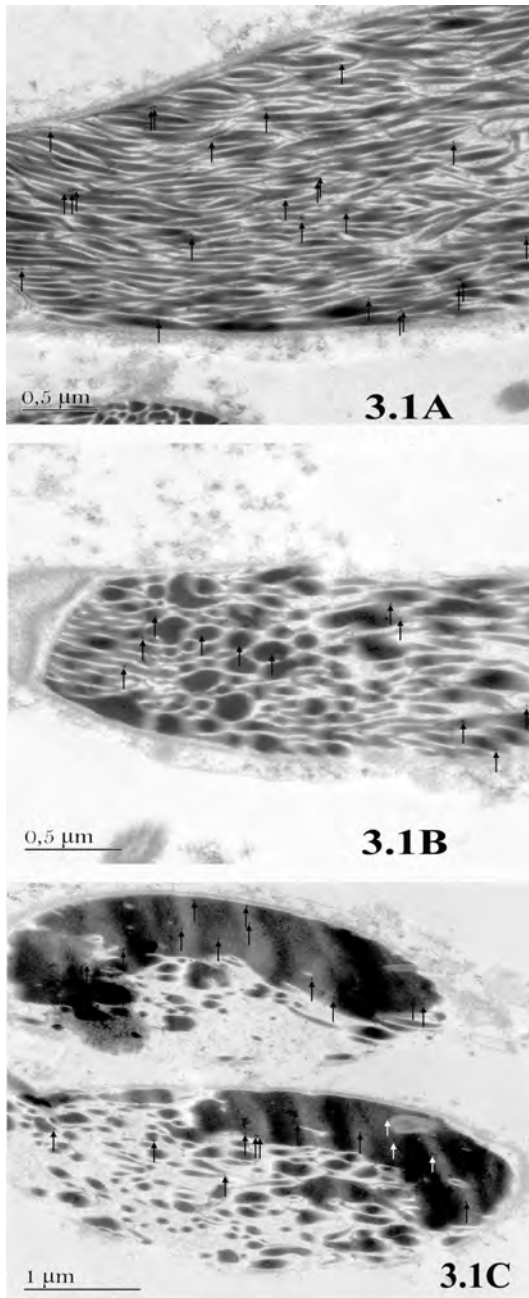


Figure 3.1 Transmission electron microscopy from immunolocalizations of cuttlefish testes, negative controls. The primary antibody was omitted, and samples were only treated with goat anti-rabbit secondary antibody. Labeling of the secondary antibody is comparable to that demonstrated in samples incubated with anti-H4 antibody. The labeling appears to be due to a high affinity of the goat-anti rabbit secondary antibody to chromatin of high density. **3.1A:** Detail of elongating spermatid in phase 4 of spermiogenesis. **3.1B:** Detail of elongated spermatid in phase 5 of sperm maturation. **3.1C:** Spermatid nucleus at phase 6, with highly condensed chromatin, homogeneously compacted at the lamelle.

that it is specific for the precursor protamines (see figure 2b).

Localizations of histones H4 and protamine precursor in male germ cells by immunoelectron microscopy

Anti-histone H4 Immunolabeling with anti-histone H4 show that in the initial stage, in which exist both euchromatin and heterochromatin, a large amount of labelling was demonstrated, with a notable increase in the label in the areas of heterochromatin than in euchromatin (see figure 3a). Higher condensation of the chromatin means a higher concentration of the histones and the exposition of their epitopes for recognition by the primary antibody; there is not actually an increase in the amount of histone H4 between the two classes of chromatin.

The second stage of spermiogenesis, characterized by homogenous granular heterochromatin, was the stage with the largest amount of immunolabeling (see figures 3b and 3c). At this point the chromatin is highly organized in nucleosomes, therefore there is a uniform granular state at this phase, in which many H4 histones would have epitopes exposed in relation to the size of the nucleus, which is still large in volume, and round in shape, providing a large surface for the presence of the protein-antibody union.

Phase 3, characterized by the initial formation of fibers in which the granular chromatin begins to unite into fine chromatin fibers of 20-25 nm, also demonstrated a large amount of labelling, though a slight decrease was observed (see figures 3d and 3e). Similar amounts of labelling were observed at this nuclear stage as that demonstrated in the first stage. It is proposed that the slight decrease in labelling signals the initiation of the protein transfer between nucleosomal histones and precursor protamine. This important change in the chromatin composition, as thin fibers form, is most likely due to the displacement of the granular state, into the stage of fiber formation, at which different proteins function in the process.

At the transition from the third to the fourth stage of chromatin condensation, when the fine fibers further organize into thicker and condensed fibers, it is highly probable that the complete substitution of histone H4 by the precursor protamine occurs. Many biochemical changes must be occurring molecularly to bring about the disassociation of H4. For example, it has been demonstrated that H4 is acetylated in meiosis, and this acetylated form disappears in condensing spermatids (Govin *et al.*, 2004). It is proposed that in order to drive the unbinding of H4, this histone is acetylated at its tail domain in order to lower the

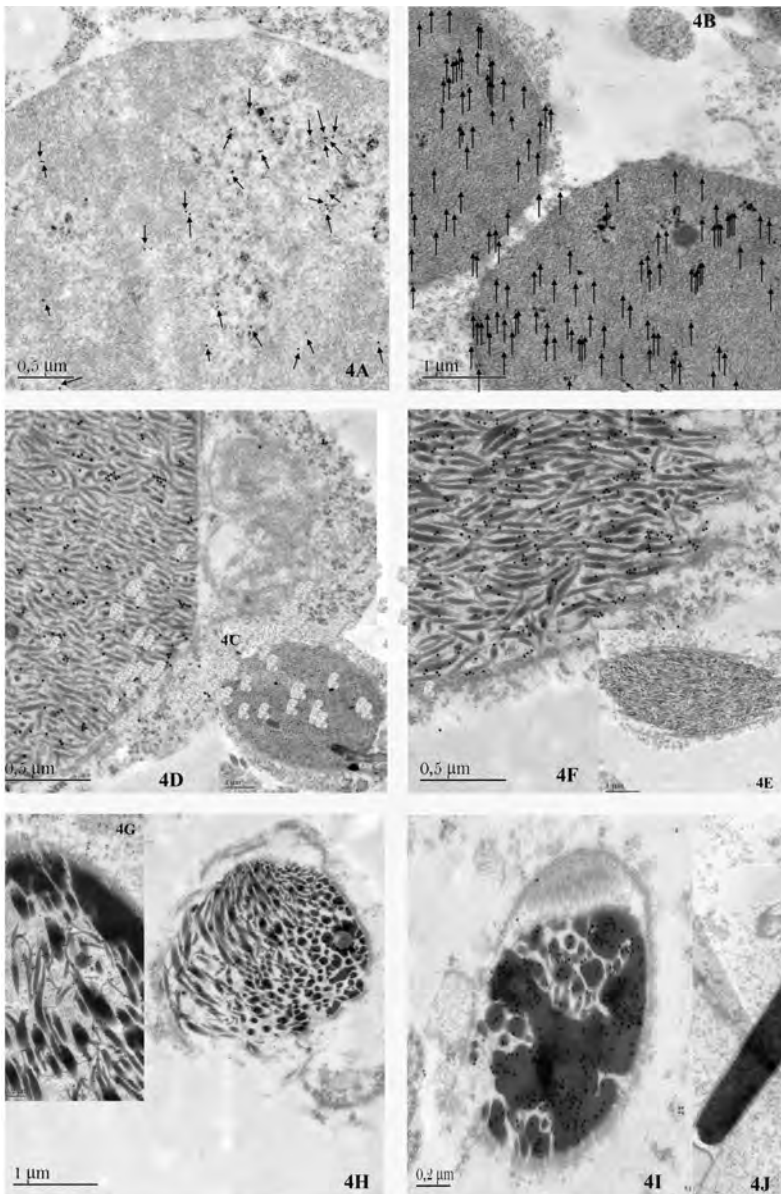


Figure 4 Transmission electron micrographs of sections of testes of *Sepia officinalis*, stained with polyclonal goat anti-rabbit antibody labeled with immunogold following incubation with anti-precursor protamina antibody. **4A:** Initial phase of spermiogenesis, where the heterochromatin and the euchromatin are still present. Notice the fair amount of labeling which was found to be similar to that demonstrated as background labeling, and is therefore not significant to represent the presence of the precursor protamine. **4B:** Granular chromatin is homogeneous. In this nucleus there is an increase in the labeling from that demonstrated by background, and shows that there is a significant amount of precursor protamine present at the second phase of maturation. **4C:** Phase 3 of spermiogenesis, showing fine fibers. In the small area shown of the nucleus in 4D, it is evident that the density of labeling is high; when applying this heavy labeling to the whole nucleus shown here, the labeling is superior to that of the nucleus in phase 2 of spermiogenesis. **4D:** Detail showing the intense labeling within the fine fibrillar chromatin of phase 3. Notice the mitochondria accumulated around the outer nuclear membrane, characteristic of a nucleus in phase 3. **4E:** Phase 4 of spermiogenesis, demonstrated by the long, thick chromatin fibers, and the nucleus more in elongation, with large amounts of immunolabeling, similar to that of phase 3. **4F:** Detail of a spermatocyte nucleus at phase 4 of maturation. The fibers are densely covered with immunolabeling for the precursor protamina. When applying this labeling to the whole nucleus shown in 4E, the labeling much superior than that of phases 1 or 2 of spermiogenesis, but similar to that of the fine fibrillar stage 3 of spermiogenesis. **4G:** Detail of longitudinal cut of nucleus in phase 5. Heavy labelling is notice throughout, especially in the area of the homogenously dense chromatin mass. **4H:** Nucleus in phase 5 of sperm maturation, showing lateral and transversal cuts of the chromatin fiber. The fibers are beginning to coalesce toward becoming a large chromatin mass. High amounts of labelling are still observed. **4I:** Phase 6 of spermiogenesis. The chromatin is accumulating toward the same point, becoming a dense mass. **4J:** Final phase of spermiogenesis; the spermatozoon. The elongated, pole-shaped nucleus and homogenously condensed chromatin mark the final stage of sperm maturation. The spermatozoon cells of this degree of maturation are found in the center of the gonad tubule, just before being translocated to the epididymus.

charge, and hence lower its affinity to the DNA (Iizuka *et al.*, 2001). The increase in binding affinity of the precursor protein could also be occurring at this phase to further drive this protein transition in chromatin with dense fibers.

When accounting for the unspecific secondary antibody binding to electrodense chromatin, as that characteristic of nuclei in phases 4-7 of maturation, our results show that there was not significant H4 labeling at the fourth stage of spermiogenesis (see figures 3*f*, 3*e* and 3.1). Fibers are thicker (40-50 nm) and the chromatin is denser at this phase, which marks a crucial point in spermiogenesis and the chromatin protein composition. Due to this thick and condensed nature of the chromatin, negation of some unspecific binding of the secondary antibody was necessary (see figure 3.1), leaving an insignificantly low amount of labelling at this point. The analysis of the absence of significant H4 labeling in dense chromatin indicates that the histones

have been displaced, and the first protein transition has already occurred, causing of the morphological chromatin change. The absence of significant labelling remains throughout the final stages of spermiogenesis, as the protein transitions continue to occur in the absence of histones, in order to bring about the full condensation of the chromatin (see figures 3*h-j*).

Anti-precursor protamine In our observations of the immunogold labeling, each phase of spermiogenesis showed some marking of the antibody. When analysing the significance of the labeling demonstrated, it is important to note that the amount of labeling of the precursor protamine is uncomparable to that of H4, due to the different nature of the antibodies used. Although both are polyclonal, the H4 antibody is a commercial antibody (Upstate) and the precursor protamine was generated in the laboratory of Juan Ausi . This antibody demonstrates superior affinity, so more overall labeling was observed in sample incubations with precursor protamine antibody than those incubated with anti H4.

The first stage of spermiogenesis showed only a small amount of labeling in the euchromatin and heterochromatin, which was very similar to the antibody labeling observed as background (see figure 4*a*). Therefore, the labeling noticed in the most immature nucleus was disregarded, as there is no significant difference in antibody labeling between that of the early sperm nucleus and background labeling.

The immunolocalization performed using anti-precursor protamine antibody shows a slight increase in labelling of the antibody in the second phase of spermiogenesis, where homogenous granular heterochromatin is found in the nucleus (see figures 4*b* and 4*c*). This superior labeling compared to that similar to background marking as demonstrating in the more immature nucleus indicates coexistence of the precursor protamines with nucleosomes. The presence of precursor protamine in the second phase could have an important function to bring about chromatin changes in the granular chromatin. It is possible that the precursor plays the role to organize these granules of 20-25 nm into fibers of 25-30 nm. When chromatin fibers begin to form, transitioning from the granular state of the chromatin to fibrillar chromatin, it is important to note that it is quite probable that there is a specific protein which is bringing about this morphological change in chromatin. This change in chromatin condensation, marking the transition from the second to the third phase of spermiogenesis, seems the crucial point in which a change in protein affinity to the DNA begins to occur, making the transition from chromatin

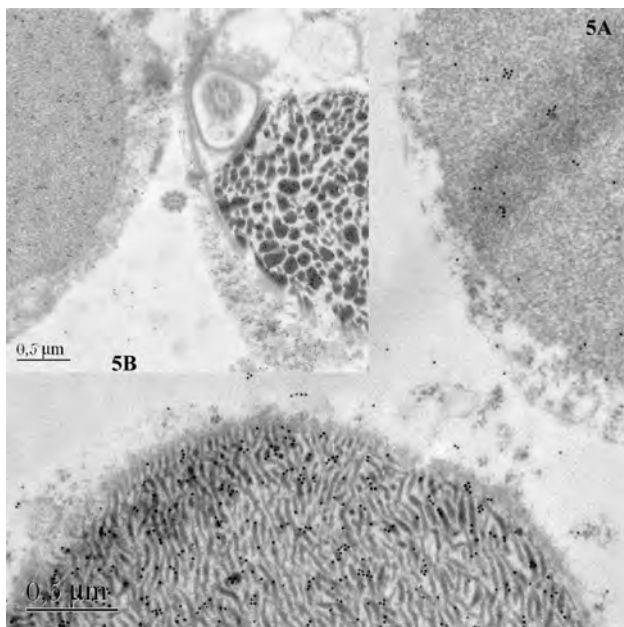


Figure 5 Transmission electron microscopy from immunolocalizations of cuttlefish testes, marking the presence of precursor protamine. Comparison of precursor labeling between nuclei of different stages of maturity in spermiogenesis. **5A:** Comparison of nuclei from phase 2 and phase 3, showing the superior precursor labeling in the nucleus with fibrillar chromatin of phase 3, versus the nucleus with granular chromatin in phase 2 which shows fewer precursor labels. **5B:** Comparison of a spermatocyte of the second phase with homogenous granular chromatin, similar in maturity to that shown in 5A, to a maturing spermatid of the fifth phase of spermiogenesis. The nucleus with granular chromatin shows much less antibody labeling when compared to that of the nucleus with condensed chromatin masses, which has a very elevated level of labeling.

organized by histones to chromatin organized by precursor protamines.

At the third phase of spermiogenesis when defined fibers are observed, a noticeable increase in the precursor labeling was observed (see figures 4d and 4e). The density of labeling was much more intense and numerous, showing that an important change in the protein-DNA interaction has occurred. Beginning at the fibrillar stages of spermiogenesis, a transition takes place from histones being the dominant protein, to precursor protamine being the dominant DNA interacting protein. In the third stage, however, it is previously mentioned that an extensive amount of histone H4 also exists. It is quite probable that in stage 3 of spermiogenesis changes are occurring to modify the binding affinities of these two proteins to bring about the final protein transition that will be fully brought about by the time stage 4 is reached, where fully elongated and thicker chromatin fibers are formed (see figures 4f and 4g).

We speculate that at the transition point of spermiogenesis, when thin fibers show labelling of both precursor and histone H4, that the charge of the hyperphosphorylated precursor protamines is increased by cleaving the phosphates, also increasing the charge its binding affinity to the DNA, while histone tails undergo acetylation to weaken their binding to the DNA (Wang *et al.*, 2001). With each phosphate cleaved the precursor protamine would have a stronger binding capability to the DNA until it is finally fully dephosphorylated and later cleaved at its amino terminus, leaving the protamine as the sole binding protein to the DNA in the most mature chromatin, as is observed in the highly electrodense chromatin of stages 6 and 7 of spermiogenesis.

The large increase in labelling from the granular to the fine fibrillar state of the chromatin continued to be observed throughout the final stages of spermiogenesis. A high amount of labelling was observed in mature, condensed chromatin as that of phases 5-7 where electrodense fibers coalesce to become a dense chromatin mass reduced in volume (see figures 4h-k). It was previously thought that in such a condensed chromatin state as that observed in the final phase of spermiogenesis, that the precursor would have already been cleaved to give way to the protamine. It is possible that the 21 amino acids which were cleaved, making up the amino domain of the precursor and contain the antigenicity recognizable by the precursor antibody, is still maintained and located in the chromatin, exposable to antibody binding. It is also a possibility that the precursor really does exist in such mature chromatin, but that it is in its most dephosphorylated state at this point, and is still recognized as an antigen by the an-

tibody, yet not as bound to the DNA as would be the protamine interacting in the chromatin to bring about its highly condensed state at these last three stages of spermiogenesis.

The last possibility that must be kept in mind when analyzing the results has to do with some unspecific binding demonstrated by the secondary antibody. There was a pattern of increased immunogold labeling in highly condensed chromatin, both in the negative controls, and in the experimental sets. Though the increase in secondary antibody binding in electrodense chromatin was accounted for in the observations in which primary antibody was present, it is still not fully understood if some of the immunolabeling was due to the presence of the primary antibody being bound to the protein of interest, or if some of the labeling mentioned is due to unspecific binding of the secondary antibody to chromatin which is very electrodense.

Our initial results indicate that in the early phases of the germ cell nuclei, there is coexistence of the precursor protamine with the histones in the granular and initial fibrillar stages of spermiogenesis, since both H4 and precursor were observed in the second and third phases of spermiogenesis. At the fourth phase of long, dense chromatin fibers, precursor protamine is the main protein interacting with the DNA to bring about this stage of chromatin organization. The results also indicate that there is a coexistence of both precursor protamine, as well as protamine in the most advanced germ cell nuclei in the testes of *Sepia officinalis*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the BMC 2002-04081-C02-02 grant, provided by the Ministerio de Ciencia y Tecnología. We thank Dra. N. Cortadellas and A. García Soto for their assistance with the transmission electron microscopy.

BIBLIOGRAPHY

- DOENECKE, D.; ALBIG, W.; BODE, C.; DRABENT, B.; FRANKE, K.; GAVENIS, K.; WITT, O. (1997). «Histones: genetic diversity and tissue-specific gene expression». *Histochem. Cell. Biol.*, 107:1-10.
- GIMÉNEZ-BONAFÉ, P.; SOLER, F.; BUESA, C.; SAUTIÈRE, P.; AUSIÓ, J.; KOUACH, M.; KASINSKY, H.; CHIVA, M. (2004). «Chromatin organization during spermiogenesis in *Octopus Vulgaris* II: DNA-interacting protein». *Molecular Reproduction and Development*, 68:232-239.

- GOVIN, J.; CARON, C.; LESTRAT, C.; ROUSSEAU, S.; KHOCHBIN, S. (2004). «The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis». *European Journal of Biochemistry*, 271:3459-3467.
- IATROU, K.; KIXON, G. H. (1978). «Protamine messenger RNA: Its life history during spermatogenesis in rainbow trout». *Red. proc.*, 37:2526-2533.
- IIZUKA, M.; SMITH, M. M. (2003). «Functional consequences of histone modifications». *Current Opinion in Genetics and Development*, 13:154-160.
- RIBES, E.; GIMÉNEZ-BONAFÉ, P.; SOLER, F.; GONZALEZ, A.; SAPERAS, N.; KASINSKY, H.; CHIVA, M. (2004). «Chromatin Organization during Spermiogenesis in *Octopus Vulgaris*. I: Morphological structures». *Molecular Reproduction and Development*, 68:223-231.
- RIBES, E.; SANCHES DE ROMERO, L.; KASINSKY, H.; DEL VALLE, L.; GIMÉNEZ-BONAFÉ, P.; CHIVA, M. (2001). «Chromatin Reorganization during spermiogenesis of the mollusc *Thais homostoma* (Muricidae): implication for sperm nuclear morphogenesis in cenogastropods». *Journal of Experimental Zoology*, 289:304-316.
- ROUSSEAU-PRÉVOST, R.; ENGLEHARDT, R.; ROUSSEAU, J.; WOUTERS-TYROU, D.; SAUTIÈRE, P. (1988). «Nuclear protein transition in cuttle-fish spermiogenesis: immunocytochemical localization of a protein specific for the spermatid stage». *Gamete Research*, 19:277-290.
- SELLOS, D.; KMICCIK, D. (1985). «Characterization of the histones and protamines from the sperm of the marine worm *Platynereis dumerilii*». *Comp. Biochem. Physiol.*, 80:119-126.
- SUPHAMUNGMEE, W.; APISAWEKAKAN, S.; WEERACHATYANUKUL, W.; WANICHANON, C.; STRETARUGSA, P.; POOMTONG, T.; SOBHON, P. (2005). «Basic nuclear protein pattern and chromatin condensation in the male germ cells of a tropical abalone, *Haliotis asinina*». *Molecular Reproduction and Development*, 70:211-221.
- WOUTERS-TYROU, D.; CHARTIER-HARLIN, M. C.; MARTIN-PONTHIEU, A.; BOUTILLON, C.; VAN DORSSELAER, A.; SAUTIÈRE, P. (1991). «Cuttlefish spermatid-specific protein t. Molecular characterisation of two variants T1 and T2, putative precursors of sperm protamine variants Sp1 and Sp2». *The Journal of Biological Chemistry*, 266:17 388-17 395.

AROMATASA EN PECES TELEÓSTEOS

Mercedes Blázquez,* Francesc Piferrer

Departament de Recursos Marins Renovables. Institut de Ciències del Mar (CSIC).
Passeig marítim, 37-49. 08003 Barcelona. Tel. 932 309 542. Fax 932 309 555. Correo electrónico: blazquez@icm.csic.es.

Resum

L'aromatasa és un enzim esteroïdogenètic encarregat de la conversió d'andrògens en estrògens i implicat en el procés de diferenciació sexual dels vertebrats. Els principals llocs de síntesi d'aquest enzim són les gònades i el cervell. A diferència d'altres vertebrats, els peixos teleostis tenen uns nivells extremadament elevats d'aromatasa en el cervell i, per tant, sintetitzen grans quantitats de neuroestrògens, cosa que fa que siguin un model únic per a l'estudi del significat biològic de l'aromatització al sistema nerviós central. Per altra banda, els teleostis són els únics vertebrats que tenen dos gens diferents d'aromatasa, un dels quals s'expressa principalment en el cervell i l'altre en la gònada, i això té com a conseqüència dues proteïnes estructuralment i funcionalment diferents.

Paraules clau Aromatasa, neurogènesi, diferenciació sexual, maduració sexual, llobarro.

Abstract

Aromatase is the steroidogenic enzyme responsible for the conversion of androgens into estrogens and thus it has been implicated in vertebrate sex differentiation. The main sites of synthesis of this enzyme are the gonads and the brain. Contrary to what has been described in other vertebrates, fish are characterized by exceptionally high levels of aromatase activity per unit of protein in the brain and have the ability to synthesize important amounts of estrogens termed neuroestrogens. In addition, teleosts are unique in the animal kingdom since a duplication of their genomes resulted in two genes, one preferably expressed in the gonads and the other one in the brain, responsible for the synthesis of two structural and functionally different proteins.

Key words Aromatase, neurogenesis, sex differentiation, sex maturation, sea bass.

INTRODUCCIÓN

El citocromo P450 aromatasa es el encargado del proceso de aromatización y de andrógenos y pertenece a la superfamilia de citocromos P450 de la que existen más de cuatrocientos ochenta miembros distribuidos a lo largo de setenta y cuatro familias. Se trata de un complejo enzimático que se encuentra anclado a la membrana del retículo endoplásmico liso de varios tipos de células esteroïdogenéticas. El complejo catalíticamente activo está formado por el citocromo P450 aromatasa, encargado de la unión al sustrato, acoplado al citocromo P450 reductasa, a su vez unido a una flavoproteína, la adenina dinucleótido fosfato (NADPH), que facilita el flujo de electrones necesario para la oxidación del sustrato. Este complejo enzimático cataliza la conversión de andrógenos en estrógenos a través de una reacción de aromatización (Conley y Walters,

1999). La aromatización implica varias hidroxilaciones en el grupo metilo del carbono 19. Concretamente, para la síntesis de un mol de estrógeno se necesita la transferencia de tres pares de electrones con el consiguiente consumo de tres moles de oxígeno molecular y tres de NADPH.

GENES Y LUGARES DE EXPRESIÓN

El gen que codifica a la aromatasa es el *cyp19* y en el caso de la gran mayoría de los tetrápodos, exceptuando el cerdo (Choi *et al.*, 1997), solo existe una copia de este gen en su genoma haploide de forma que su expresión diferencial en diferentes tejidos se consigue por mecanismos de *splicing* alternativo o de utilización de diferentes zonas del promotor. Sin embargo, en el caso de los teleósteos se postula la

hipótesis de que en un pez ancestral se produjo una duplicación cromosómica, de modo que existen dos genes diferentes denominados *cyp19a* y *cyp19b* que codifican la síntesis de dos proteínas estructuralmente distintas P450aromA y P450aromB que se expresan preferentemente en gónadas y en cerebro, respectivamente (Force *et al.*, 1999). En la mayoría de los vertebrados estudiados, se ha visto que la expresión de aromatasa tiene lugar principalmente en cerebro y gónadas, aunque también se ha encontrado expresión en una gran variedad de tejidos entre los que cabe destacar la placenta, el riñón, el hígado, tejido adiposo, tejido óseo y el tracto digestivo (Simpson *et al.*, 2002).

ESTRUCTURA MOLECULAR Y FILOGENIA

Estudios basados en la estructura molecular de la aromatasa han revelado la presencia de varios dominios funcionales (Amarneh *et al.*, 1993) filogenéticamente conservados, lo que confirma su importancia durante la evolución. Estos dominios son la hélice-1, que interviene en la activación del oxígeno molecular, el péptido de ozol, implicado en la unión del esteroide, la región específica de la aromatasa y la zona de unión del grupo hemo que interviene en la aromatización del anillo A de los esteroides (véase la figura 1).

Estudios filogenéticos demuestran que las dos isoformas de aromatasa presentes en gónadas y cerebro de teleósteos son ortólogas de la aromatasa de los tetrápodos y miembros de clados parálogos en la línea evolutiva de los peces (véase la figura 2). Además, el hecho de que el porcentaje de identidad entre la forma de gónada y de cerebro en una misma especie sea bajo indica que ambos genes se separaron posiblemente después de la aparición de los teleósteos.

AROMATASA Y NEUROGÉNESIS

Datos recientes indican que los estrógenos producidos de forma local en el cerebro por aromatización de andrógenos son importantes en procesos de neurogénesis (García-segura *et al.*, 2001). En efecto, durante etapas tempranas del desarrollo los esteroides sexuales de origen cerebral, particularmente los estrógenos (neuroestrógenos), tienen una importancia singular en el crecimiento del cerebro y la configuración de las áreas que controlarán la reproducción cuando el animal alcance la madurez sexual (Hutchison *et al.*, 1999). El efecto organizador que los esteroides sexuales ejercen sobre las estructuras cerebrales en un cerebro en pleno crecimiento y desarrollo se conoce como *diferenciación sexual del cerebro*. Los estrógenos actúan sobre

las neuronas, sus sinapsis y las células de la glía, regulando su supervivencia y diferenciación (McEwen, 2001). Posteriormente, actuarán sobre las mismas estructuras (efecto activador) y serán responsables de funciones biológicamente relevantes como la reproducción. La síntesis de neuroestrógenos implica la presencia de aromatasa en el cerebro. En este sentido, y al contrario de lo que ocurre en mamíferos, los peces teleósteos se caracterizan por exhibir niveles muy elevados de actividad aromatasa en el cerebro, llegando a ser incluso cien y hasta mil veces superiores por unidad de proteína a los encontrados en mamíferos (Callard *et al.*, 1990), lo que convierte a los peces en un excelente modelo de estudio. El significado biológico de estos elevados niveles de actividad aromatasa y, por tanto, de la elevada producción de neuroestrógenos en teleósteos es todavía una cuestión sin resolver aunque la hipótesis de la neurogénesis es la más apoyada. Contrariamente a lo que ocurre en mamíferos, la neurogénesis en peces tiene lugar durante toda la vida de los individuos, debido a la elevada plasticidad y el gran poder regenerativo de los peces adultos (Clint y Zupanc, 2001) y parece estar asociada con elevados niveles de aromatasa y neuroestrógenos (Menuet *et al.*, 2003).

La aromatasa de cerebro ha estado siempre asociada al denominado *cerebro reproductivo*, que es el cerebro anterior y que comprende fundamentalmente el bulbo olfatorio, el telencéfalo y el hipotálamo. Recientemente, se ha demostrado la presencia de mRNA de aromatasa en células de la glía en varias especies de teleósteos (Forlano *et al.*, 2001; Menuet *et al.*, 2003), mientras que en mamíferos y aves la expresión de aromatasa está restringida a las neuronas (Balzathart y Ball, 1998). Estas células de la glía están implicadas en la migración de las neuronas durante la neurogénesis. De hecho, en mamíferos se ha visto que en situaciones posteriores al daño cerebral, los niveles de aromatasa y, por tanto, los de neuroestrógenos, se encuentran muy elevados, lo que relaciona a esta enzima en procesos de neuroprotección y de neurogénesis o regeneración neuronal (Azcoitia *et al.*, 2001). Esta neurogénesis debe tener también importancia en la reorganización del cerebro no solo ante un daño neuronal sino también ante eventos biológicamente fundamentales para los individuos durante los que se requieren reestructuraciones de núcleos o áreas cerebrales. Eventos de este tipo son, por ejemplo, la diferenciación sexual o la reproducción, en los cuales el cerebro y los esteroides sexuales formados localmente son parte activa.

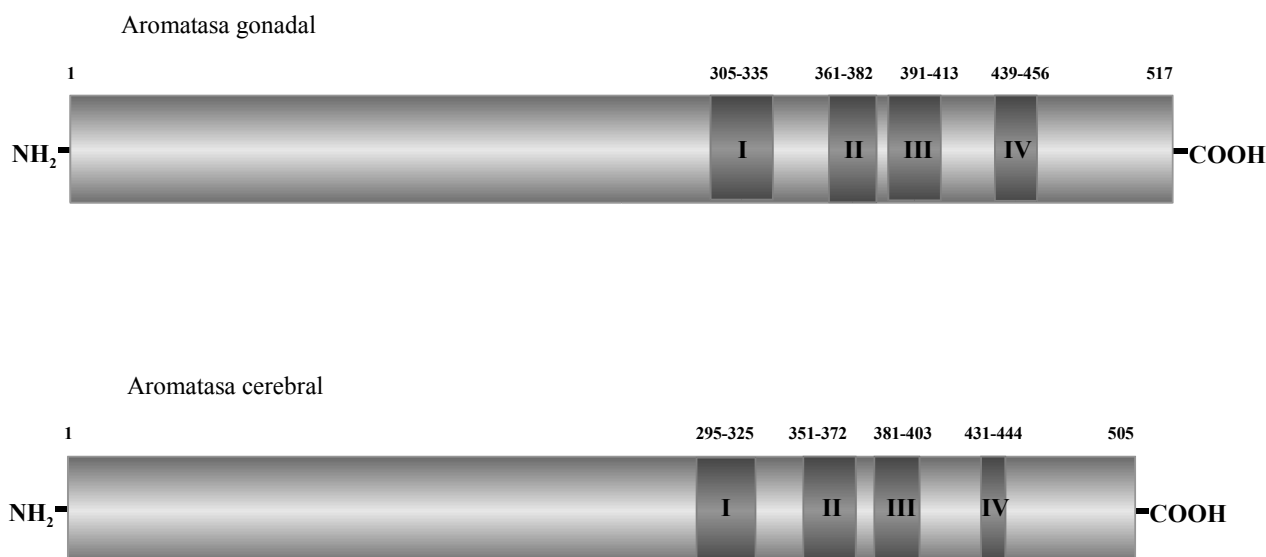


Figura 1 Representación esquemática de las dos isoformas de la aromatasa en la lubina, una específica de ovario y la otra de cerebro. Como en todos los teleósteos estudiados, la aromatasa gonadal es algo más larga que la del cerebro. Sin embargo, todas ellas, desde mamíferos hasta peces, poseen los mismos dominios funcionales y están estructuradas del mismo modo. I: hélice-I, II: péptido de ozol, III: región específica de la aromatasa, IV: zona de unión del grupo hemo. Los números corresponden a los aminoácidos.

AROMATASA Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL

La mayoría de los estudios sobre la expresión de la aromatasa durante la diferenciación sexual se han centrado en la gónada. Básicamente, los estudios refuerzan la idea de que niveles elevados de aromatasa son esenciales para la síntesis de estradiol y por lo tanto para la diferenciación ovárica. De hecho, la aromatasa gonadal juega un papel clave en el proceso de diferenciación sexual, dado que es la responsable final de la síntesis de estradiol en las gónadas (Devlin y Nagahama, 2002). Recientemente se ha demostrado en la tilapia que los niveles de aromatasa en las hembras son muy elevados, mientras que en los machos se observa el efecto contrario. Esto reafirma la idea de que la aromatasa es fundamental para el desarrollo ovárico y no para el testicular, implicando a esta enzima en la diferenciación sexual de peces teleósteos (Kwon *et al.*, 2001). Sin embargo, en el caso de la aromatasa cerebral no parece que su papel sea tan evidente. Los altos niveles de actividad y expresión aromatasa presentes en el cerebro de peces teleósteos están al mismo tiempo regulados por los niveles de estradiol (Kishida y Callard, 2001). También se han localizado elementos de respuesta a los estrógenos (EREs) en el promotor de la aromatasa de cerebro de varias especies de teleósteos (Tchoudakova *et al.*, 2001), lo cual implica directamente a los estrógenos en el control de la expresión de la aromatasa cerebral por activación directa de los ERE.

AROMATASA Y MADURACIÓN SEXUAL

En vertebrados, los estrógenos poseen efectos endocrinos, paracrinos y autocrinos en muchos procesos biológicos fundamentales, entre los que cabe destacar el comportamiento sexual, la maduración sexual y la gonadogénesis. En el caso de la aromatasa gonadal, ésta se ha asociado tradicionalmente al desarrollo ovárico, debido a su papel fundamental en la producción de estrógenos. Sin embargo, la concepción de que el estradiol es la hormona femenina por excelencia se ha abandonado, dado que los niveles de esta hormona en machos son considerables. En este aspecto, se ha visto que la aromatasa es fundamental para el desarrollo de la espermatogénesis en mamíferos, lo cual se ha demostrado usando ratones para los que el gen de la aromatasa se había inactivado (*knock out*). La importancia de la aromatasa también se ha demostrado en un pez evolutivamente ancestral como es el caso del tiburón, donde la esteroidogénesis tiene lugar en las células de Sertoli, siendo los niveles de aromatasa, y por tanto de estradiol, elevados durante estadios tempranos de la espermiogénesis, mientras que la testosterona es necesaria en estadios más tardíos como son la maduración de las espermátidas y la producción de esperma (Callard *et al.*, 1985). También en el caso del ovario, la producción de estradiol durante el ciclo reproductor está determinada por cambios en la actividad y la expresión del gen de la aromatasa. En este sentido, se ha observado un aumento de la producción

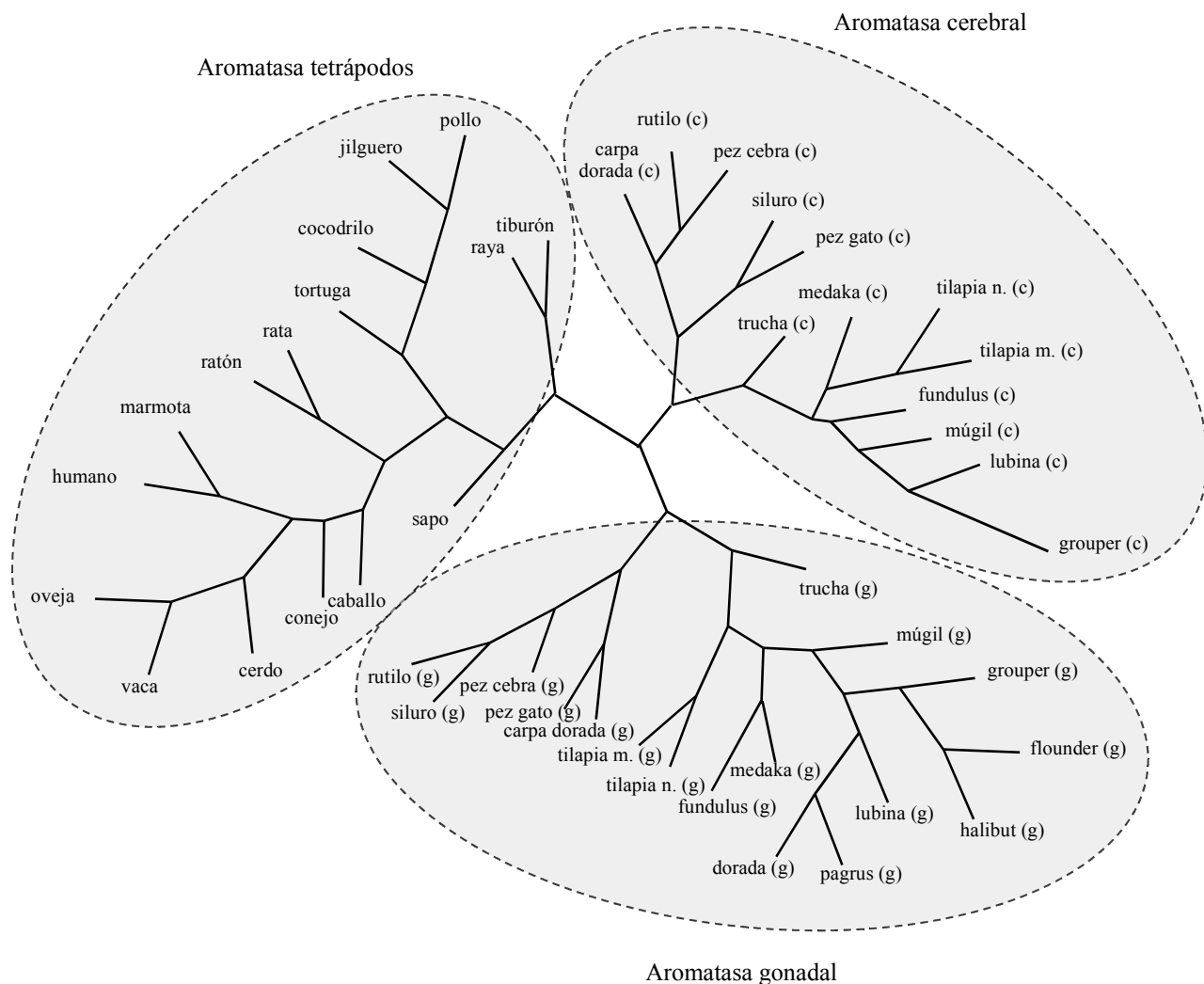


Figura 2 Árbol filogenético de las proteínas aromatasa a lo largo de la evolución de los vertebrados. Las distancias evolutivas se han calculado con el método empírico de Kimura y el árbol se ha construido usando el método de *neighbour joining*. g) isoforma gonadal, c) isoforma cerebral, tilapia m. = tilapia de Mozambique, tilapia n. = tilapia del Nilo. Se observan tres agrupaciones claras, la de las aromatasa de tetrápodos (una única forma) y en el caso de los peces teleósteos la de las aromatasa cerebrales y las aromatasa gonadales.

de estradiol durante la vitelogénesis en varias especies de teleósteos como la trucha, la tilapia, la medaka o la dorada. Además, la disminución de los niveles de estradiol al final de la vitelogénesis y al inicio del proceso de maduración de los oocitos coincide con la disminución de la actividad y la expresión de la aromatasa (Chang *et al.*, 1997). Trabajos recientes en la trucha han demostrado que en el caso de los peces, al igual que ocurre en mamíferos, la estimulación de la producción de estradiol por parte de la hormona foliculo estimulante (FSH) está mediada por una estimulación de la expresión y la actividad de la enzima aromatasa (Montserrat *et al.*, 2004).

LA AROMATASA EN LA LUBINA

La lubina europea, *Dicentrarchus labrax*, es una especie importante tanto en investigación básica como aplicada. Estudios recientes indican la existencia de dos actividades catalíticas para la aromatasa, una propia de cerebro y la otra de ovario (González y Piferrer, 2002). Otros estudios han determinado la secuencia de dos proteínas diferentes, una expresada principalmente en gónadas (Dalla Valle *et al.*, 2002) y otra en cerebro (Blázquez y Piferrer, 2004). Además, se han demostrado diferencias entre machos y hembras en los niveles de actividad aromatasa en diferentes partes del cerebro durante el ciclo reproductor (González y Piferrer, 2003). Incluso se ha determinado la presencia

de niveles elevados de aromatasa cerebral durante los primeros estadios del desarrollo (Blázquez y Piferrer, datos no publicados) y también durante el proceso de diferenciación sexual (Blázquez y Piferrer, 2004). Estos estudios sugieren que los altos niveles encontrados durante los primeros estadios del desarrollo, que coinciden con un rápido crecimiento del cerebro, serían el reflejo de un proceso de neurogénesis activa, mientras que los niveles elevados en el momento de la diferenciación sexual, siendo estos superiores en hembras que en machos, estarían relacionados con el proceso de diferenciación sexual en esta especie.

PERSPECTIVAS FUTURAS

El estudio de la función de la aromatasa y, por tanto, de los neuroestrógenos en los peces teleósteos, se perfila como una importante línea de investigación en el caso de la neurogénesis. La expresión de aromatasa en células de la glía en teleósteos, así como los elevados niveles de esta enzima en el cerebro de estos peces hace de ellos un material interesante de estudio. Del mismo modo, la gran cantidad de neuroestrógenos producidos por los teleósteos, conocidos por su función neurotrófica, y el hecho de que la aromatasa se encuentre en células de la glía, relacionadas sobre todo con la migración y la regeneración neuronal, evidencia que en estos peces los estrógenos podrían tener funciones diferentes a las meramente reproductivas. El significado biológico y funcional de la aromatasa en el cerebro de los peces es algo que aún queda por dilucidar.

BIBLIOGRAFÍA

- AMARNEH, B.; CORBIN, C. J.; PETERSON, J. A.; SIMPSON, E. R.; GRAHAM-LORENCE, S. (1993). «Functional domains of human aromatase cytochrome P450 characterized by linear alignment and site-directed mutagenesis». *Mol. Endocrinol.*, 7:1617-1624.
- AZCOITIA, I.; SIERRA, A.; VEIGA, S.; HONDA, S. I.; HARADA, N.; GARCÍA-SEGURA, L. M. (2001). «Brain aromatase is neuroprotective». *J. Neurobiol.*, 47:318-329.
- BALZATHART, J.; BALL, G. F. (1998). «New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase)». *Trends Neurosci.*, 21:243-249.
- BLÁZQUEZ, M.; PIFERRER, F. (2003). «Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*)». *Mol. Cell. Endocrinol.*, 219:83-94.
- CALLARD, G. V.; PUDNEY, J. A.; MAK, P.; CANICK, J. A. (1985). «Stage-dependent changes in steroidogenic enzymes and estrogen receptors during spermatogenesis in the testis of the dogfish, *Squalus acanthias*». *Endocrinology*, 117:1328-1335.
- CALLARD, G. V.; SCHLINGER, B. A.; PASMANIK, M. (1990). «Nonmammalian vertebrate models in studies of brain-steroid interactions». *J. Exp. Zool. (Suppl.)*, 4:6-16.
- CHANG, X. T.; KOBAYASHI, T.; KAJIURA, H.; NAKAMURA; NAGAHAMA, Y. (1997). «Isolation and characterization of the cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (P450arom): changes in P450arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis». *J. Mol. Endocrinol.*, 18:57-66.
- CHOI, I.; TROYER, D. L.; CORNWELL, D. L.; KIRBY-DOBBELS, K. R.; COLLANTE, W. R.; SIMMEN, F. A. (1997). «Closely related genes encode developmental and tissue isoforms of porcine cytochrome P450 aromatase». *DNA Cell Biol.*, 16:769-777.
- CLINT, S.; ZUPANC, G. (2001). «Neuronal regeneration in the cerebellum of adult teleost fish, *Apteronotus leptorhynchus*: guidance of migrating young cells by radial glia». *Dev. Brain. Res.*, 130:15-23.
- CONLEY, A. J.; WALTERS, K. W. (1999). «Aromatization». Dins: *Encyclopedia of Reproduction*, vol. 1:280-291. Academic Press.
- DALLA VALLE, L.; LUNARDI, L.; COLOMBO, L.; BELVEDERE, P. (2002). «European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cytochrome P450arom: cDNA cloning, expression and genomic organization». *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 80:25-34.
- DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. (2002). «Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences». *Aquaculture*, 208:191-364.
- FORCE, A.; LYNCH, M.; PICKETT, F. B.; AMORES, A.; YAN, Y. L.; POSTLETHWAIT, J. (1999). «Preservation of duplicate genes by complementary degenerative mutations». *Genetics*, 151:1531-1545.
- FORLANO, P. M.; DEITCHER, D. L.; MYERS, D. A.; BASS, A. H. (2001). «Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source». *J. Neurosci.*, 21:8943-8955.
- GARCIA-SEGURA, L. M.; AZCOITIA, I.; DONCARLOS, L. L. (2001). «Neuroprotection by estradiol». *Prog. Neurobiol.*, 63:29-60.
- GONZÁLEZ, A.; PIFERRER, F. (2002). «Characterization of aromatase activity in the sea bass: effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes». *J. Exp. Zool.*, 293:500-510.
- (2003). «Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle». *Gen. Comp. Endocrinol.*, 132:223-230.
- HUTCHINSON, J. B.; WOZNIAK, A.; BEYER, C.; KAROLCZAK, M.; HUTCHINSON, R. E. (1999). «Steroid metabolising enzymes in the determination of brain gender». *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 69:85-96.

- KISHIDA, M.; CALLARD, G. V. (2001). «Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development». *Endocrinology*, 142:740-750.
- KWON, J. Y.; MCANDREW, B. J.; PENMAN, D. J. (2001). «Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)». *Mol. Reprod. Dev.*, 59:359-370.
- MCEWEN, B. S. (2001). «Estrogen effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms». *J. Appl. Physiol.*, 91:2785-2801.
- MENUET, A.; ANGLADE, I.; LE GUEVEL, R.; PELLEGRINI, E.; PAKDEL, F.; KAH, O. (2003). «Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor alpha». *J. Comp. Neurol.*, 462:180-93.
- MONTERRAT, N.; GONZÁLEZ, A.; MÉNDEZ, E.; PIFERRER, F.; PLANAS, J. V. (2004). «Effects of follicle stimulating hormona on estradiol-17beta production and P-450 aromatase (CYP19) activity and mRNA expression in brown trout vitellogenic ovarian follicles *in vitro*». *Gen. Com. Endocrinol.*, 137:123-131.
- SIMPSON, E. R.; CLYNE, C.; RUBIN, G.; BOON, W. C.; ROBERTSON, K.; BRITT, K.; SPEED, C.; JONES, M. (2002). «Aromatase- A brief overview». *Ann. Rev. Physiol.*, 64:93-127.
- TCHOUDAKOVA, A.; KISHIDA, M.; WOOD, E.; CALLARD, G. V. (2001). «Promoter characteristics of two cyp19 genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish». *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 78:427-39.

ALTERACIONS EN LA FUNCIO OVÀRICA DE LA TRUITA EN RESPOSTA AL LIPOPOLISACÀRID BACTERIÀ

Núria Montserrat,¹ Mario Mas,¹ Laura Acerete,² Lluís Tort,² Simon MacKenzie,² Aleksei Krasnov,³ Frederick W. Goetz,⁴ Josep V. Planas *

¹ Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.

Av. Diagonal, 645. 08028 Barcelona. Tel. 934 021 557. Fax 934 110 359. Adreça electrònica: jplanas@ub.edu.

² Unitat de Fisiologia Animal, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, Barcelona. Tel. 935814127.

³ Institute for Applied Biotechnology. University of Kuopio.

Finlàndia. Tel. 35 817 163 742. Fax 35 817 163 752. Adreça electrònica: krasnov@uku.fi.

⁴ Great Lakes Water Institute. University of Wisconsin.

Milwaukee, WI 53204, EUA. Tel. 414-382-1742. Fax 414-382-1705. Adreça electrònica: rick@uwm.edu.

Resum

En mamífers se sap que els processos infecciosos poden provocar alteracions reproductores i fins i tot infertilitat. Nombroses citocines i factors immunològics són produïts durant una infecció bacteriana i actuen sobre el sistema reproductor. Sorprenentment, se sap molt poc de les conseqüències reproductores de l'activació del sistema immunitari per patògens bacterians en peixos. Per tant, hem estudiat els efectes del lipopolisacàrid (LPS) sobre la funció reproductora de truites femelles sexualment madures abans de l'ovulació. El tractament amb LPS no va alterar la producció basal d'esteroides ovàrics *in vitro* però va potenciar lleugerament els efectes esteroïdogenics de la LH *in vitro*. No es van observar efectes de l'LPS *in vivo* sobre la maduració oocitària. Malgrat això, l'LPS va augmentar el nombre de nuclis apoptòtics en cèl·lules de les capes fol·liculars, la qual cosa es correlaciona amb un augment de l'expressió de gens proapoptòtics en l'ovari. Per tant, malgrat que l'LPS no sembla causar importants alteracions esteroïdogeniques ni maduratives, provoca la mort cel·lular en l'ovari, la qual cosa és molt probable que causi alteracions de la funció ovàrica. En aquests moments, no sabem si altres funcions reproductores, com la fecunditat o la fertilitat, estan afectades per l'LPS.

Paraules clau LPS, esteroïdògenesis, apoptosi, ovari, truita.

Abstract

Altered ovarian function in trout by bacterial lipopolysaccharide. In mammals it is well known that infectious processes can lead to alterations in reproductive function and even cause infertility. A number of cytokines and immune factors are known to be produced during a bacterial infection and to act on the reproductive system. Surprisingly, very little is known about the reproductive consequences of the activation of the immune system by bacterial pathogens in fish. Therefore, we have examined the effects of lipopolysaccharide (LPS) on the reproductive function of sexually mature female trout prior to ovulation. LPS treatment *in vivo* did not alter the basal *in vitro* production of steroids but slightly potentiated the *in vitro* steroidogenic effects of LH. No effects of LPS *in vivo* were observed on GVBD. However, LPS administration increased the incidence of apoptotic nuclei in cells of the follicular layers, which correlated with the increased expression of pro-apoptotic genes in the ovary. Therefore, although LPS does not appear to cause significant impairments in ovarian steroid production and oocyte final maturation, LPS triggers ovarian cell death which will most likely cause alterations normal ovarian function. At the present time it is not known whether other reproductive functions, such as fecundity and fertility, are affected.

Key words LPS, steroidogenesis, apoptosis, ovary, trout.

INTRODUCCIÓ

En mamífers se sap que certs processos infecciosos poden provocar alteracions de la funció reproductora i fins i tot infertilitat. L'activació del sistema immunitari com a resultat d'una infecció bacteriana es caracteritza per la producció de citocines, que poden actuar com a moduladors químics d'àmbit local o ser secretades a la circulació i actuar com a hormones. Per exemple, el factor de necrosi tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) es una citocina que es produïda pels macròfags en resposta a l'acció del lipopolisacàrid (LPS), un component actiu de la paret cel·lular de bacteris gramnegatius, durant una infecció bacteriana. El $\text{TNF}\alpha$, apart de la seva funció endocrina, desenvolupa una important funció local en els diferents teixits, incloent-hi l'ovari, on s'ha demostrat que té efectes sobre la diferenciació, la proliferació i la inducció de l'apoptosi mitjançant receptors específics. Per tant, el $\text{TNF}\alpha$ pot actuar com a mitjancer entre el sistema immunitari i el sistema reproductor.

Els peixos, especialment en aqüicultura, estan exposats a una gran varietat de patògens procedents de bacteris gramnegatius que poden ocasionalment provocar una important mortalitat amb un alt cost econòmic. L'exposició de peixos enfront de patògens bacterians en l'aigua pot també tenir importants conseqüències negatives sobre diversos processos biològics, incloent-hi la reproducció. Malauradament, no se sap gairebé res sobre la possible interacció entre els sistemes immunitari i reproductor en peixos. Malgrat això, han estat identificats diversos dels components del sistema immunitari en peixos que podrien tenir influència sobre el sistema reproductor. Per exemple, s'ha demostrat que els macròfags de peixos poden ser activats mitjançant el tractament amb LPS i que, com a resultat, aquests produeixen $\text{TNF}\alpha$ i moltes altres citocines i factors implicats en la resposta immunitària innata

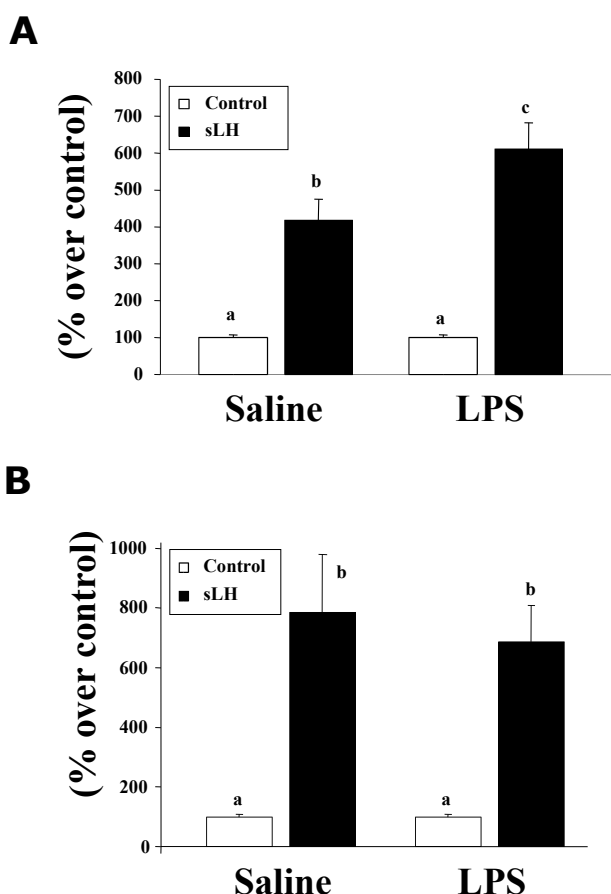


Figura 1 Efectes de l'administració d'LPS *in vivo* sobre la producció basal i estimulada per LH de testosterona (A) i 17α -hidroxiprogesterona (B) en fol·licles ovàrics de truita. Els resultats estan expressats en relació al percentatge sobre el control (100 %).

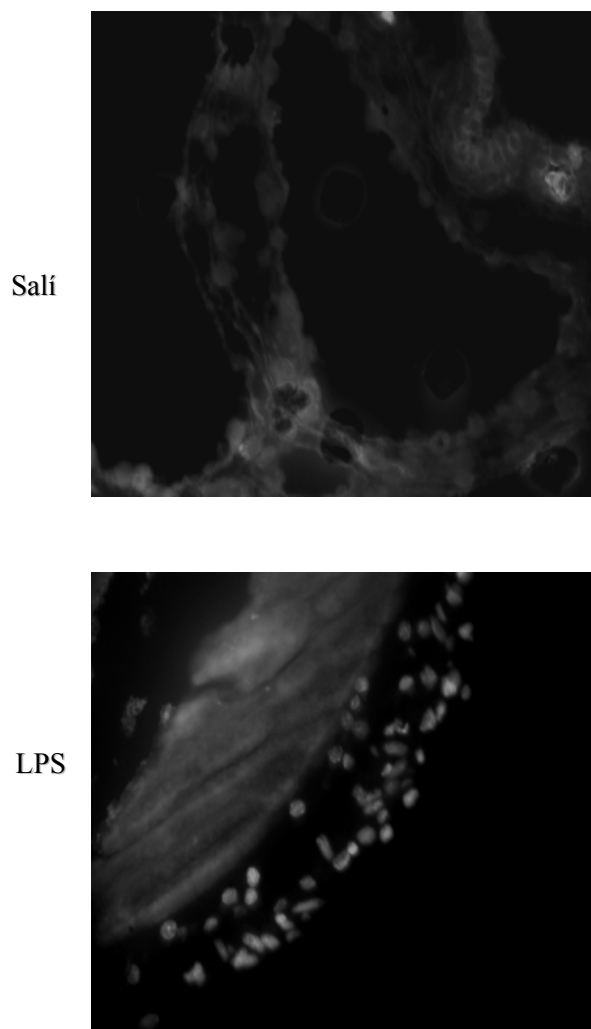


Figura 2 Efectes de l'administració d'LPS *in vivo* sobre l'apoptosi en l'ovari de truita. Imatges representatives d'un ovari d'una femella injectada amb salí i d'un ovari d'una femella injectada amb LPS.

(MacKenzie *et al.*, 2003; Goetz *et al.*, 2004). Recentment, s'ha demostrat que l'ovari dels peixos podria ser un òrgan diana a causa de la presència d'un receptor en l'ovari que podria regular la seva activitat biològica (Bobe *et al.*, 2000). Tanmateix, l'ovari expressa la ciclooxigenasa 2 abans de l'ovulació i és possible que aquest fet estigués més relacionat amb un procés infecciós que amb l'ovulació, la qual cosa suggeriria indirectament l'existència d'un procés d'activació dels macròfags en l'ovari (Roberts *et al.*, 2000). Aquests resultats suggereixen que el TNF α i la ciclooxigenasa 2 i altres marcadors immunitaris podrien emprar-se com a marcadors de l'activació macrofàgica en l'ovari. Per tant, és important establir una relació directa entre causa i efecte entre la inducció d'una resposta immunitària i alteracions en la funció reproductora en peixos. Per això, l'objectiu principal d'aquest estudi ha estat analitzar els efectes de l'administració d'LPS com a via d'inducció d'una resposta immunitària sobre la funció ovàrica en la truita (*Salvelinus fontinalis*).

MATERIALS I MÈTODES

Animals

Truites (*Salvelinus fontinalis*) femelles van mantenir-se a 12,5° C i sota fotoperíode natural a les instal·lacions de la University of Notre Dame (Notre Dame, IN, EUA). Truites en estat preovulatori van ser anestesiades amb àcid 3-aminobenzoic etil ester (0,1 g/l; Sigma, St. Louis, MO, EUA) dissolt en aigua i sacrificades per decapitació abans d'extraure els ovaris.

Administració d'LPS

Un grup de deu femelles van ser injectades intraperitonealment amb LPS d'*Escherichia Coli* (6 mg/kg) un cop cada dia durant quatre dies consecutius. Com a control, es va incloure un grup de deu femelles que van rebre el mateix règim d'injeccions amb salí. Al cinquè dia, els peixos control (salí) i els experimentals (LPS) van ser sacrificats.

Incubacions de teixit ovàric

Immediatament després de la dissecció, els ovaris van ser col·locats en una solució de sals Hank's (HBSS) i es van separar fol·licles ovàrics individualment. Fol·licles intactes (cinc fol·licles/pou/ml) van ser incubats en HBSS amb 0,2 % de BSA (fraction V, Sigma) en absència i presència d'LH durant 18 h a 15° C. Al final de la incubació, es van separar el medi i el teixit ovàric i van ser guardats a -20° C i -80° C, respectivament.

Per a l'assaig de la ruptura de la vesícula germinal (GVBD), es van incubar deu fol·licles en presència de 17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17,20 P; 100 ng/ml) per 72 h a 12° C. Al final de la incubació, els fol·licles van ser examinats per la presència o absència (GVBD) de la vesícula germinal.

Radioimmunoassaig

Els nivells de testosterona (T) i 17 α -hidroxiprogesterona (17P) en el medi d'incubació i en plasma es van mesurar directament utilitzant un radioimmunoassaig comercial (Schering-CIS, Madrid). Per a la mesura dels nivells de cortisol en plasma, es va utilitzar un radioimmunoassaig desenvolupat prèviament.

Tinció de TUNEL

La presència de cèl·lules apoptòtiques es va detectar per la tècnica de TUNEL mitjançant un *kit* comercial (Roche).

Anàlisi d'expressió gènica per microxip

A partir d'RNA total d'ovari de peixos injectats amb salí o LPS, es va analitzar l'expressió gènica amb un microxip de cDNA que conté aproximadament mil quatre-cents gens i que ha estat prèviament desenvolupat i validat (Koskinen *et al.*, 2004; Krasnov *et al.*, 2005).

RESULTATS

L'administració de LPS no va afectar la producció basal de T o 17P però va potenciar lleugerament els efectes estimuladors de la LH sobre la producció de T, però no els de 17P (vegeu la figura 1). Tanmateix, l'administració d'LPS no va afectar els nivells en sang de T (els nivells en sang de 17P i d'estradiol no van ser detectables) però va provocar un important augment en els nivells en sang de cortisol (resultats no presentats). Tampoc no es van detectar diferències significatives entre femelles injectades amb salí o LPS quant a la inducció de la GVBD, la qual cosa indica que l'administració de LPS no afecta la maduració dels oòcits. En canvi, l'administració de LPS va provocar un important increment en el nombre de cèl·lules apoptòtiques en les capes fol·liculars que envolten l'oòcit (vegeu la figura 2). L'anàlisi de l'expressió gènica global amb un microxip de cDNA per a salmònids (Koskinen *et al.*, 2004; Krasnov *et al.*, 2005) va indicar que el tractament amb LPS provoca un augment de l'expressió de

gens proapoptòtics com la ZIP cinasa i una disminució en l'expressió de gens antiapoptòtics com Beclin 1, p21 i CYP11B2 (resultats no presentats). Tanmateix, el tractament amb LPS provoca un augment de l'expressió de gens implicats en la resposta immunitària, com el gen del precursor del col·lagen, la immunoglobulina Mu i antígens d'histocompatibilitat.

DISCUSSIÓ

En aquest treball s'ha estudiat la resposta de l'ovari de la truita a una activació del sistema immunitari provocada per l'administració d'LPS, que és el component actiu de bacteris gramnegatius. L'LPS s'ha demostrat que provoca una important activació del sistema immunitari en truita tant en experiments *in vitro* com *in vivo* i, per tant, constitueix un adient model experimental d'inducció immunitària.

Els nostres resultats indiquen que l'administració d'LPS, almenys en el moment del mostreig, no provoca efectes negatius sobre la resposta hormonal en l'ovari de la truita. En primer lloc, l'administració d'LPS no afecta la capacitat de resposta esteroïdògena de les capes fol·liculars a l'acció de la LH, la qual és el principal factor que regula la producció d'esteroides sexuals per part de l'ovari a la truita (Planas *et al.*, 2000). En segon lloc, l'administració d'LPS no afecta la capacitat dels oòcits a respondre a l'acció de la 17,20P i estimula la inducció de la maduració. Malgrat aquests resultats, el nostre estudi prova, com a resposta a l'acció de l'LPS, l'activació del procés de mort cel·lular programada o apoptosi en cèl·lules de les capes fol·liculars que envolten l'oòcit. En aquest estudi no hem identificat les cèl·lules fol·liculars que han entrat en apoptosi en resposta a l'LPS, però és molt possible que entre aquestes trobem les cèl·lules teca i granulosa, les quals són essencials per a la producció d'esteroides sexuals (Planas *et al.*, 2000) i altres factors necessaris per a la fol·liculogènesi i posterior ovulació. Creiem que la pèrdua d'aquestes cèl·lules i dels factors que produeixen provocarà efectes negatius sobre la funció ovàrica a mitjà o llarg termini. Propers estudis hauran d'examinar els efectes de l'administració d'LPS en les primeres setmanes després del tractament per a determinar les alteracions ovàriques a mitjà o llarg termini.

Utilitzant la tècnica del microxip, hem detectat canvis importants en l'expressió de gens en l'ovari de femelles tractades amb LPS. Malgrat que el nombre de gens ovàrics que responen al tractament no és molt elevat, comparat amb altres teixits (resultats no presentats), s'observa clarament que el tractament amb LPS provoca canvis en l'expressió de gens implicats

en el procés apoptòtic, la qual cosa es correlaciona bé amb els nostres resultats sobre l'increment de cèl·lules apoptòtiques. Tanmateix, s'observa que el tractament amb LPS provoca un augment en l'expressió de gens implicats en la resposta immunitària. En estudis previs també s'han detectat alts nivells de gens implicats en la resposta immunitària al llarg de l'ovulació, com per exemple el receptor *decoy* de l' $TNF\alpha$ i el mateix $TNF\alpha$ (Bobe *et al.*, 2000, 2001). Una qüestió que es desprèn d'aquests resultats és si aquests gens són expressats per les cèl·lules ovàriques o si són expressats per cèl·lules immunitàries (per exemple, macròfags) que han infiltrat l'ovari. Aquesta és una qüestió important que haurà de ser investigada en propers estudis.

Creiem que els efectes observats de l'administració d'LPS no són deguts a l'acció directa de l'LPS sobre les cèl·lules ovàriques, sinó que són deguts als efectes estimuladors de l'LPS sobre cèl·lules immunitàries, ja siguin perifèriques o infiltrades en l'ovari. Com a resposta a l'LPS, les cèl·lules immunitàries produeixen citocines com el $TNF\alpha$, tal com hem demostrat prèviament (MacKenzie *et al.*, 2003; Goetz *et al.*, 2004; MacKenzie *et al.*, 2004), que podrien actuar directament sobre les cèl·lules ovàriques estimulants l'apoptosi. En mamífers, el $TNF\alpha$ té clarament efectes proapoptòtics i és molt probable que en peixos tingui el mateix efecte. Per tant, proposem que els efectes negatius observats com a resultat de l'administració d'LPS són deguts a la secreció de citocines per cèl·lules immunitàries i a l'acció d'aquestes citocines sobre les cèl·lules ovàriques.

AGRAÏMENTS

Aquest estudi ha estat finançat en part per un ajut de la Comisió de Intercambio Cultural, Educativo y Científico entre España y Estados Unidos (Projecte 20055) a J. V. P. i F. W. G.

BIBLIOGRAFIA

- BOBE, J.; GOETZ, F. W. (2001). «Molecular cloning and expression of a TNF receptor and two TNF ligands in the fish ovary». *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 129:475-481.
- BOBE, J.; GOETZ, F. W. (2000). «A tumor necrosis factor decoy receptor homologue is up-regulated in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ovary at the completion of ovulation». *Biol. Reprod.*, 62:420-426.
- GOETZ, F. W.; ILIEV, D. B.; MCCAULEY, L. A. R.; LIARTE, C. Q.; TORT, L. B.; PLANAS, J. V.; MACKENZIE, S. (2004). «Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide-

- stimulated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages». *Mol. Immunol.*, 41:1199-1210.
- KOSKINEN, H.; PEHKONEN, P.; VEHNIAINEN, E.; KRASNOV, A.; REXROAD, C.; AFANASYEV, S.; MOLSA, H.; OIKARI, A. (2004). «Response of rainbow trout transcriptome to model chemical contaminants». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320:745-753.
- KRASNOV, A.; KOSKINEN, H.; PEHKONEN, P.; REXROAD, C. E.; AFANASYEV, S.; MOLSA, H. (2005). «Gene expression in the brain and kidney of rainbow trout in response to handling stress». *BMC Genomics*, 6:3.
- MACKENZIE, S.; LIARTE, C. Q.; ILIEV, D. B.; PLANAS, J. V.; TORT, L.; GOETZ, F. W. (2004). «Identification and characterization of a highly inducible novel CC chemokine from differentiated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages». *Immunogenetics*, 56:611-615.
- MACKENZIE, S.; PLANAS, J. V.; GOETZ, F. W. (2003). «LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor-alpha mRNA in primary trout monocytes and in vitro differentiated macrophages». *Develop. & Comp. Immunol.*, 27:393-400.
- PLANAS, J. V.; ATHOS, J.; GOETZ, F. W.; SWANSON, P. (2000). «Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish». *Biol. Reprod.*, 62:1262-1269.
- ROBERTS, S. B.; LANGENAU, D. M.; GOETZ, F. W. (2000). «Cloning and characterization of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 from the brook trout ovary». *Mol. Cell. Endocrinol.*, 160:89-97.

EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE INTERLEUCINA 6 (IL-6), IL-8, IL-10, INF- γ Y ÓXIDO NÍTRICO EN EL PLASMA SEMINAL COMO POTENCIALES MARCADORES DE INFECCIÓN O INFLAMACIÓN DEL TRACTO GENITAL MASCULINO

Franca Puccio,^{1,2} Maira Cabrera,² María Isabel Camejo^{1*}

¹ Departamento de Biología de Organismos. Universidad Simón Bolívar.

Baruta, Estado Miranda, Venezuela. Tel. 58-212-9063077. Correo electrónico: mcamejo@usb.ve.

² Instituto de Biomedicina-MSDS-UCV.

Caracas, Venezuela. Correo electrónico: fpuccio@telcel.net.ve.

Resumen

Muchos autores han sugerido que las infecciones en el tracto genital masculino pueden contribuir a la infertilidad. Sin embargo, la selección de un método idóneo para el diagnóstico ha sido controvertida. El objetivo de este estudio fue evaluar la concentración de interferón gamma (INF- γ), interleucina-6 (IL-6), IL-8, IL-10 y óxido nítrico (NO) en el plasma seminal de hombres infértiles y su relación con la leucocitospermia y parámetros seminales. Muestras de semen de setenta y dos hombres infértiles y veinte hombres fértiles fueron analizadas por un sistema automatizado (CASA) y el plasma seminal fue evaluado para determinar las concentraciones de INF- γ , IL-6, IL-8, IL-10 (ELISA) y NO (*Griess reaction*). Los niveles de INF- γ , IL-6 y NO fueron superiores en el grupo con leucocitospermia comparado con el grupo sin leucocitospermia y el control. En el grupo con leucocitospermia, los niveles de IL-6, INF- γ y NO presentaron una correlación negativa con velocidad y movilidad espermática. Sin embargo, en el grupo control, con bajas concentraciones de IL-6 y NO, se observó una correlación positiva de estos parámetros con la velocidad y movilidad espermática. Estos hallazgos pueden sugerir que las citocinas a concentraciones fisiológicas pueden contribuir con las funciones espermáticas, mientras que su incremento durante las infecciones puede provocar disminución de la capacidad fértil. En cuanto a la IL-10, es necesario evaluar su papel en el contexto de la respuesta inmunitaria global. Estos hallazgos indican que otros parámetros de infección, además de la leucocitospermia, tales como IL-6 y NO, pueden ser propuestos como marcadores de calidad seminal en hombres con infertilidad idiopática.

Palabras clave Citocinas, óxido nítrico, plasma seminal, leucocitospermia.

Abstract

Many authors have suggested that male genital tract infections can lead to infertility. However, the selection of the gold standard method for the diagnosis of infections and inflammation has been very controversial. The aim of this study was to evaluate the concentration of interferon gamma (INF- γ), interleukin 6 (IL-6), IL-8, IL-10 and nitric oxide (NO) in seminal plasma of infertile men and their relationship with the presence leukocytospermic and seminal parameters. Semen samples from 72 infertile men and 20 fertile men were tested by the automatic system CASA and seminal plasma were evaluated for INF- γ IL-6, IL-8, IL-10 (ELISA) and NO (Griess reaction). The levels of INF- γ , IL-6 and NO were statistical higher in the leukocytospermic group as compared with the non leukocytospermic infertile male and with the control group. In the leukocytospermic group, the levels of IL-6, INF- γ and NO had a negative correlation with sperm velocity and mobility. However, in the control group, with low concentration of IL-6 and NO, there was a positive correlation of these immune parameters with sperm velocity and mobility. These results could suggest that cytokines at physiological concentrations could mediate the sperm functions, but an increase of these could act in a deleterious form on male fertility. The variations of the concentrations of IL-10 need to be analyzed within the context of the complete immune response during physiological and infections events. These findings indicate that different additional parameters of infection, other than leukocytospermic IL-6 and nitric oxide could be good candidates as markers of the quality of semen in infertile men with idiopathic infertility.

Key words Cytokine, nitric oxide, seminal plasma, leukocytospermic.

INTRODUCCIÓN

El hombre contribuye con aproximadamente el 30-50 % de las causas de infertilidad de la pareja. Aunque en la actualidad se conocen muchos de los problemas que llevan a la infertilidad masculina aún existe un alto porcentaje (33 %) de casos del tipo idiopático. Las infecciones e inflamaciones del tracto genital masculino están dentro del grupo de enfermedades en las cuales no se ha podido identificar claramente su efecto sobre la fertilidad. Las mismas pueden ir acompañadas por incremento de leucocitos en semen y por la liberación de sustancias reactivas al oxígeno (ROS) (Depuydt *et al.*, 1996), citocinas proinflamatorias (Matalliotakis *et al.*, 2002) y óxido nítrico, moléculas que podrían causar deterioro de las funciones del espermatozoide, tales como disminución de su movilidad, aumento de la peroxidación lipídica de la membrana espermática (Camejo *et al.*, 2001; Segnini *et al.*, 2003) y daño al DNA espermático (Henkel *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 1998). Es posible que algunos de los casos incluidos actualmente dentro del grupo de infertilidad idiopática podría ser explicado si se profundiza en el conocimiento de la respuesta inmunitaria durante las infecciones del tracto genital masculino. Dentro de las citocinas proinflamatorias, las más estudiadas han sido la IL-6 y la IL-8, las cuales han sido propuestas como posibles marcadores clínicos de inflamación en semen (Friebe *et al.*, 2003; Krause *et al.*, 2003). Sin embargo, no se ha podido establecer claramente el efecto de su incremento sobre las funciones espermáticas. Entre las moléculas antiinflamatorias está la IL-10, la cual está presente en el plasma seminal y podría estar jugando un papel antiinflamatorio (Camejo, 2003).

El objetivo de este estudio fue determinar la concentración de IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-10 y óxido nítrico en el plasma seminal de hombres fértiles e infértiles y observar su posible relación con la leucocitospermia y los parámetros seminales, para poder evaluar su potencial como posibles marcadores de inflamación o infección en el semen humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las muestras

Se tomaron muestras de semen por masturbación, luego de dos o tres días de abstinencia sexual, de veinte hombres de fertilidad comprobada y de setenta y tres hombres que acudieron a la consulta de fertilidad de la Clínica Leopoldo Aguerrevere, en Caracas. Todas las muestras fueron evaluadas siguiendo los criterios

de la Organización Mundial de la Salud y utilizando el sistema automatizado de análisis seminal (CASA).

Determinación de citocinas y óxido nítrico en plasma seminal

Para determinar la presencia de leucocitos se realizó el test de peroxidasa, por tinción con ortotoluidina, a aquellas muestras con más de un millón de células redondas por ml de semen. Luego las muestras fueron centrifugadas y el plasma seminal fue congelado a -20° C para la posterior determinación de las citocinas. La IL-6 y IL-8 fueron determinadas utilizando un *kit* comercial de ELISA (Diacclone), mientras que las concentraciones de IL-10 y el IFN- γ fueron evaluadas por un *kit* de ELISA estandarizado en nuestro laboratorio. El óxido nítrico fue evaluado por la detección de nitratos solubles como marcador de la enzima *óxido nítrico sintetasa* y la producción de radicales de óxido nítrico según la reacción de Griess (Moshage *et al.*, 1995).

El análisis estadístico fue llevado a cabo por *t* de Student. Los coeficientes de correlación fueron calculados por el método de Pearson. Valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos

Clasificación de los pacientes en grupos de estudio

Luego de la determinación de leucocitos en el semen, los hombres fueron clasificados en: grupo 1, pacientes infértiles con leucocitospermia ($n = 31$); grupo 2, pacientes infértiles sin leucocitospermia ($n = 42$); grupo 3, hombres fértiles con parámetros seminales normales y sin leucocitospermia ($n = 20$).

RESULTADOS

No se observó diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de IL-8 entre los diferentes grupos. La concentración de IL-6 en el plasma seminal del grupo con leucocitospermia fue significativamente mayor que el grupo fértil de control ($P < 0,01$) (véase la tabla 1). Los niveles de IL-6 e IL-8 observados en el grupo 2 correlacionan de forma negativa con la velocidad espermática ($P < 0,001$) (véase la tabla 2). Por otra parte, se observó una correlación positiva entre las concentraciones de IL-6 e IL-8. En cuanto a la IL-10, las mayores concentraciones fueron observadas en el grupo 1 seguido por el grupo 2 y por último el 3. Sin embargo, no se observó diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Con relación al IFN- γ , pudimos observar que en el grupo 1 con leucocitospermia (con altos niveles de

Tabla 1 Concentración de IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ y óxido nítrico en plasma seminal de hombres fértiles e infértiles.

	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IFN- γ UI/ml	óxido nítrico (μ M)
Grupo 1 (n = 31)	38,4* (2,3-131,4)	1 292,7 (588,6-2 221,5)	18,3 (0-148,8)	485,21* (0-2 295,7)	14,11* (1,57-271,92)
Grupo 2 (n = 41)	21,8 (0,9-123,8)	1 144,4 (2,3-131,4)	15,1 (0-129,4)	301,05* (0-1 142,3)	10,43* (2,9-77,28)
Grupo 3 (n = 20)	6,9 (0,5-16,7)	1 035,7 (2,3-131,4)	12,5 (0-78,9)	57,54 (0-490)	3,31 (2,4-4,5)

* $P < 0,01$ al comparar con el grupo 3

Tabla 2 Correlación entre velocidad o movilidad espermática y concentración de citocinas en el plasma seminal de los diferentes grupos.

	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IFN- γ UI/ml	IL-10 (pg/ml)
Grupo 1 (n = 35)	0,42 ($P < 0,001$)	-0,95 ($P < 0,001$)	-0,43 ($P < 0,001$)	ns
Grupo 2 (n = 42)	-0,84 ($P < 0,001$)	-0,84 ($P < 0,001$)	ns	ns
Grupo 3 (n = 20)	ns	ns	0,54 ($P < 0,001$)	ns

Tabla 3 Correlación entre los niveles de oxido nítrico en el plasma seminal y los diferentes parámetros seminales.

Parámetros	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Concentración MM/ml	0,009 ns	-0,03 ns	0,24 $P < 0,05$
Velocidad m/s	-0,125 ns	0,05 ns	0,44 $P < 0,05$
Movilidad total	-0,45 $P < 0,01$	-0,07 ns	0,03 ns
Espermatozoides progresivos	-0,423 $P < 0,01$	0,10 ns	0,020 ns
Espermatozoides no progresivos	0,04 ns	-0,01 ns	0,054 ns
% Formas normales	-0,73 $P < 0,001$	0,056 ns	0,40 $P < 0,05$
% Formas anormales	0,73 ns	-0,056 ns	-0,40 $P < 0,05$

IFN- γ) se notó una correlación lineal negativa entre movilidad espermática y niveles de IFN- γ ($P < 0,01$), mientras que en el grupo 3 o control (bajos niveles de IFN- γ) se observó una correlación positiva entre concentración de esta citocina y movilidad espermática (véase la tabla 2).

El grupo con leucocitospermia presentó una correlación lineal negativa entre niveles de nitritos y movilidad total, movilidad progresiva y formas normales. En cambio, en el grupo control, que presentó los menores niveles de nitritos, se encontró una correlación positiva con concentración espermática, movilidad total y formas normales (véase la tabla 3).

DISCUSIÓN

Aunque muchos autores han sugerido que las infecciones e inflamaciones del tracto genital masculino pueden conducir a la infertilidad (Diemer *et al.*, 2003), aún el tema sigue en debate. Entre los problemas que dificultan llegar a esta conclusión están las dificultades en realizar un buen diagnóstico de infección en el semen, ya que los cultivos de semen pueden dar falsos negativos, debido a las características inmunosupresoras del mismo. Por otra parte, están las características

asintomáticas de muchas infecciones y la dificultad de diagnosticar algunas infecciones frecuentes, como por ejemplo la de *C. trachomatis*. Por esa razón es de utilidad evaluar la respuesta inmunitaria durante las infecciones para de esta forma tratar de encontrar marcadores efectivos de inflamación o infección del tracto reproductor masculino. El presente estudio muestra que los niveles de IL-6 son mayores en el grupo con leucocitospermia, similar a lo observado por otros autores (Friebe *et al.*, 2003), indicando que la IL-6 es producida principalmente por los leucocitos. Por otra parte, las concentraciones de IL-8 fueron similares entre los diferentes grupos, lo que concuerda con algunos trabajos publicados pero difiere con otros. Sin embargo, se observó una correlación positiva entre la IL-6 y la IL-8, lo que puede indicar que ambas citocinas se activan conjuntamente durante el proceso inflamatorio. Adicionalmente, en el grupo con leucocitospermia se observó una correlación negativa entre IL-6, óxido nítrico e IL-8 con la velocidad espermática y movilidad, similar a lo encontrado por otros grupos (Yoshida *et al.*, 2004), lo que podría producir un efecto perjudicial a la capacidad fértil del espermatozoide. Pero por otra parte, bajos niveles de IL-6, IFN- γ y óxido nítrico (Roselli *et al.*, 1998) pueden favorecer la velocidad y movilidad espermática, lo que demuestra el papel

dual que pueden presentar estas moléculas dependiendo de si se encuentran en concentraciones fisiológicas o patológicas, lo que ya ha sido descrito por algunos autores (Calabrese, 2001).

Trabajos previos de nuestro laboratorio (Camejo, 2003) indican que las concentraciones de IL-10 son superiores en los hombres fértiles respecto a los pacientes con infertilidad idiopática, sin signos de infección, lo que se asemeja a los resultados encontrados en este estudio entre los grupos 2 y 3. Sin embargo, los valores más elevados de IL-10 están presentes en el grupo con leucocitospermia, lo cual podría explicarse como una reacción del sistema inmunitario para contrarrestar las altas concentraciones de las citocinas proinflamatorias y, de esta forma, proteger al espermatozoide y a la mucosa genital.

En conclusión, incrementos en los niveles de IL-6, IL-8 y óxido nítrico disminuyen la velocidad y movilidad espermática, lo que podría afectar la capacidad fértil masculina. Variaciones de la concentración de IL-10 en los diferentes grupos necesitan ser analizadas en el contexto global de la respuesta inmunitaria. Estos hallazgos indican que otros indicadores de infección, además de la leucocitospermia, pueden ser importantes al momento de evaluar la calidad seminal del paciente con infertilidad idiopática. Este trabajo indica que la IL-6 y el óxido nítrico son buenos candidatos para ser considerados marcadores de infección o inflamación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Decanato de Investigación y Desarrollo, el Decanato de Postgrado de la Universidad Simón Bolívar y por el Instituto de Biomedicina MSDS-UCV, Caracas.

BIBLIOGRAFÍA

- CALABRESE, E. J. (2001). «Nitric oxide: biphasic dose responses». *Crit. Rev. Toxicol.*, 31:489-501.
- CAMEJO, M. I. (2003). «Relation between immunosuppressive PGE2 and IL-10 to pro-inflammatory IL-6 in seminal plasma of infertile and fertile men». *Arch. Androl.*, 49:111-116.
- CAMEJO, M. I.; SEGNINI, A.; PROVERVIO, F. (2001). «Interleukin-6 in seminal plasma of infertile men, and lipid peroxidation of their sperm». *Arch. Androl.*, 47:97-101.
- DEPUYDT, C. E.; BOSMANS, E.; ZALATA, A.; SCHOONJANS, F.; COMHAIRE, F. H. (1996). «The relation between reactive oxygen species and cytokines in andrological patients with or without male accessory gland infection». *J. Androl.*, 17:699-707.
- DIEMER, T.; HUGE, M.; LUDWIG, M.; WEIDNER, H.; WEIDNER, W. (2003). «Urogenital infection and sperm motility». *Andrologia*, 35:283-287.
- FRIEBE, K.; BOHRING, C.; SKRZYPEK, J.; KRAUSE, W. (2003). «Levels of interleukin-6 and interleukin-8 in seminal fluid of men attending and andrological clinic». *Andrologia*, 35:126-129.
- HENKEL, R.; MAASS, G.; HAJIMOHAMMAD, M.; MENKVELD, R.; STALF, T.; VILLEGAS, J.; SANCHEZ, R.; KRUGER, T. F.; SCHILL, W. B. (2003). «Urogenital inflammation: changes of leucocytes and ROS». *Andrologia*, 35:309-313.
- KRAUSE, W.; BOHRING, C.; GUETH, A.; HORSTER, S.; KRISP, A.; SKRZYPEK, J. (2003). «Cellular and biochemical markers in semen indicating male accessory gland inflammation». *Andrologia*, 35:279-282.
- LOPES, S.; JURISICOVA, A.; SUN, J.; CASPER, R. (1998). «Reactive oxygen species: Potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa». *Hum. Reprod.*, 13:896-900.
- MATALLIOTAKIS, I.; ARICI, A.; GOUMENOU, A.; KOUMANTAKIS, G.; SELA, M. B.; MATALLIOTAKIS, G.; KOUMANTAKIS, E. (2002). «Distinct expression pattern of cytokines in semen of men with genital infection and oligo-terato-asthenozoospermia». *Am. J. Reprod. Immunol.*, 48:170-175.
- MOSHAGE, H.; KOK, B.; HUIZENGA, J. R.; JANSEN, P. L. (1995). «Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation». *Clin. Chem.*, 41:892-896.
- ROSSELLI, M.; KELLER, P. J.; DUBEY, R. K. (1998). «Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction». *Hum. Reprod. Update*, 4:3-24.
- SEGNINI, A.; CAMEJO, M. I. (2003). «Chlamydia trachomatis and sperm lipid peroxidation in infertile men». *Asian J. Androl.*, 5:47-49.
- YOSHIDA, S.; HARADA, T.; IWABE, T.; TANIGUCHI, F. [et al.] (2004). «A combination of interleukin-6 and its soluble receptor impairs sperm motility: implications in infertility associated with endometriosis». *Hum. Reprod.*, 19:1821-1825.

EFFECTE DE LA TEMPERATURA SOBRE LA PROPORCIÓ DE SEXES DEL LLOBARRO (*Dicentrarchus labrax*)

Laia Navarro-Martín, Mercedes Blázquez, Francesc Piferrer

Departament de Recursos Marins Renovables. Institut de Ciències del Mar, ICM-CSIC.

Passeig Marítim de la Barceloneta, 37-49. 08003 Barcelona. Tel. 932 309 500. Fax. 932 309 555. Adreça electrònica: lnavarro@icm.csic.es.

Resum

El llobarro (*Dicentrarchus labrax*) és una de les espècies en què el desenvolupament gonadal es veu alterat per la temperatura. La gònada primerament roman indiferenciada un període en el qual és molt sensible a estímuls externs. Animals indiferenciats van ser sotmesos a diferents temperatures des del moment de l'eclosió dels ous i durant diferents períodes. No es van trobar diferències en la longitud de les gònades dreta i esquerra respecte als tractaments, però es van trobar diferències en la longitud de les gònades femenines i masculines. L'índex gonadosomàtic en femelles va ser unes set vegades major que en mascles. Temperatures elevades de cultiu (21° C) al principi del desenvolupament van causar una masculinització dels individus. En canvi, temperatures baixes (15° C) aconseguiren augmentar fins a tres vegades la proporció de femelles respecte a la de les temperatures elevades dels controls (de 11,5 a un 35 %). D'aquests experiments i en conjunt amb els realitzats fins ara, es dedueix que no és possible feminitzar individus aplicant tractaments de temperatura, però sí que es pot evitar el fenomen de masculinització que apareix en cultius larvaris a altes temperatures.

Paraules clau Llobarro, diferenciació sexual, temperatura, aromatasa.

Abstract

The European sea bass is a fish species in which temperature can modify the process of sex differentiation. The influence of the water temperature on the resulting sex ratios is maximal during the period in which sea bass gonads remain sexually undifferentiated and thus they are highly sensitive to external factors. Undifferentiated fish were reared at different water temperatures from hatching and during different periods. Sex ratios were determined one year later by histological examination of the gonads. No significant length differences were found between the left and right gonads among the different temperature regimes. However, differences in gonad length between sexes were found. Furthermore the gonadosomatic index was 7-fold higher in females than in males. High rearing temperatures (21° C) during early development can result in the masculinization of the fish. On the other hand, low rearing temperatures (15° C) increased the number of females 3-fold respect to those groups reared at high temperature (from 11.5% to 35%). From this and other previous experiments we can conclude that complete feminization of fish populations cannot be induced with different temperature regimes. However, low temperatures are capable to reduce and even eliminate the androgenesis-induced in the sea bass when reared at high temperatures.

Key words Sea bass, sexual differentiation, temperature, aromatase.

INTRODUCCIÓ

És conegut que la temperatura afecta de manera significativa molts processos biològics, tant al metabolisme com a la fisiologia. Alguns vertebrats, entre els quals trobem amfibis, rèptils i alguns peixos, poden veure alterat el seu procés de diferenciació sexual per factors ambientals o socials. El llobarro (*Dicentrarchus*

labrax) és una espècie gonocorista (o de sexes separats), en què la gònada es desenvolupa de forma directa i en direcció caudocraneal (Roblin i Bruslé, 1983). Aquesta roman indiferenciada a l'inici del desenvolupament i és molt sensible a estímuls externs que poden decantar el procés de diferenciació envers testicles o ovaris. Aquest període de major sensibilitat és anomenat *període làbil*. Les femelles són les primeres a

diferenciar l'ovari, mentre els mascles resten un període més llarg indiferenciats. La diferenciació gonadal és més dependent de la talla que de l'edat (Blázquez *et al.*, 1999) i té lloc en peixos entre 8,3 i 11,8 cm (Saillant *et al.*, 2003). Aquesta plasticitat de la gònada fa que factors externs, entre els quals la temperatura té el major grau d'influència, alterin de forma significativa el desenvolupament gonadal. L'aromatasa (P450arom) és un dels enzims clau en la diferenciació sexual, encarregat de convertir els andrògens a estrògens, esteroides responsables del desenvolupament testicular i ovàric, respectivament. Elevades temperatures causen una supressió de l'expressió del gen P450arom en espècies com el *Paralichthys olivaceus* (Kitano *et al.*, 1999) o el peix zebra (Uchida *et al.*, 2004). Es podria pensar, doncs, que és necessària una repressió del gen per a desenvolupar la gònada envers un testicle, però no queda clar si és la temperatura la causa directa d'aquesta repressió o si actua des d'un altre punt de vista causant la repressió de l'aromatasa com a efecte secundari.

Prenent en conjunt diferents estudis d'alguns investigadors (vegeu la taula 1), es pot concloure que tant les elevades temperatures (20-21° C) com prolongats períodes de baixes (13-15° C) indueixen a la masculinització (Saillant *et al.*, 2002). En canvi, l'aparició de percentatges de femelles més elevats s'aconsegueix mantenint els peixos a baixes temperatures des del dia de fertilització fins a la meitat de la metamorfosi (17-18 mm) (Pavlidis *et al.*, 2000).

L'objectiu d'aquest estudi ha estat poder determinar amb més exactitud quins règims tèrmics afavoreixen

l'aparició de femelles i de mascles, i aclarir com la temperatura pot afectar el desenvolupament gonadal i a quin nivell.

MATERIAL I MÈTODES

Per a realitzar els experiments s'utilitzaren ous fertilitzats d'elevada qualitat procedents d'una sola femella. Es van repartir en gobelets de PVC de 19 l a una densitat de 20.000 ous/gobelet. Els ous es van mantenir entre 13-14° C fins al moment de l'eclosió. Es van alimentar *ad libitum* amb artèmia, artèmia enriquida i pinsos de diferents mides en funció del grau de desenvolupament.

Els peixos, sexualment indiferenciats, es van sotmetre per duplicat a cinc règims tèrmics diferents: un grup control a 21° C des de l'eclosió dels ous i quatre grups cultivats a 15° C durant diferents períodes, al final dels quals es va incrementar la temperatura a 21° C (vegeu la figura 1). Aquests grups van ser anomenats *grup 30, 60, 90 i 120* en funció dels dies postfertilització mantinguts a 15° C. Els increments de temperatura de 15 a 21° C es van fer a raó d'1° C/dia. L'experiment es va repetir quatre vegades amb la progènie de quatre encreuaments de progenitors diferents. Es van recollir mostres de gònades durant el desenvolupament i a l'any amb la finalitat de realitzar anàlisis histològiques (determinació del sexe) i moleculars (nivells d'expressió de P450arom i de receptor d'andrògens). Finalitzat l'experiment s'agafaren dades de pes (g) i longitud (mm) de les gònades. Durant el desenvolupament es registraren dades de pes (g) i talla (cm) dels individus per a monitoritzar el creixement dels animals.

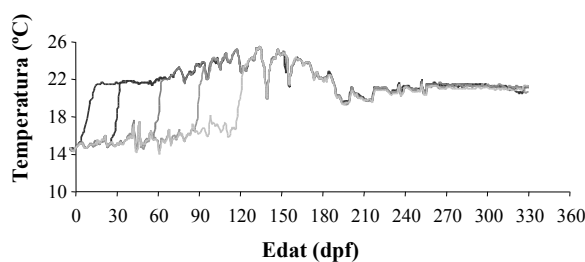


Figura 1 Temperatures (° C) registrades en els diferents grups experimentals al llarg de l'estudi. dpf = dies postfertilització. Grups experimentals: control = mantingut a 21° C durant tot l'experiment; 30 = mantingut a 15° C des de l'eclosió fins a 30 dpf; 60 = mantingut a 15° C des de l'eclosió fins a 60 dpf; 90 = mantingut a 15° C des de l'eclosió fins a 90 dpf; 120 = mantingut a 15° C des de l'eclosió fins a 120 dpf. Acabats els diferents tractaments a 15° C es va incrementar la temperatura de cultiu a 21° C fins al final de l'experiment.

RESULTATS

A les dues primeres famílies la proporció de femelles al grup control va ser d'11,5 ± 0,6 %. Els grups que van estar a temperatures baixes des de l'inici del desenvolupament van aconseguir augmentar tres vegades la proporció de femelles respecte al control (fins aproximadament el 35 %), sense una clara relació entre temps de cultiu a 15° C i proporció de femelles produïdes. (Vegeu la taula 2.)

S'analitzaren els índexs gonadosomàtics (IGS) de mascles i femelles de cada grup i es va obtenir aproximadament un IGS set vegades major en femelles que en mascles (vegeu la taula 3). Es va realitzar una ANOVA d'una via per a mascles i un altra per a femelles, i es va observar el mateix patró de diferències en referència al tractament per als dos sexes.

Es va realitzar un estudi comparatiu entre la longi-

Taula 1 Efecte de la temperatura en la proporció de sexes del llobarro.

Temp. (° C)	Període (dpf) ^a	Mitjana % femelles	Referència
22	15-57	5,8	Blázquez <i>et al.</i> (1998)
13	1-93	73,0	Pavlidis <i>et al.</i> (2000)
15	1-74	69,0	Pavlidis <i>et al.</i> (2000)
20	1-65	26,3	Pavlidis <i>et al.</i> (2000)
15	1-64	66,1	Koumoundouros <i>et al.</i> (2002)
15	1-38	47,1	Koumoundouros <i>et al.</i> (2002)
15	1-11	37,6	Koumoundouros <i>et al.</i> (2002)
20	1-56	18,1	Koumoundouros <i>et al.</i> (2002)
13	0-346	11,0	Saillant <i>et al.</i> (2002)
20	19-149	32,5	Saillant <i>et al.</i> (2002)
15	0-120	35,0	Navarro <i>et al.</i> (dades no publicades)
21	15-120	11,5	Navarro <i>et al.</i> (dades no publicades)

^a dpf: dies postfertilització

Taula 2 Percentatges de femelles ($n = 14-49$ per rèplica).

Tractament	% femelles \pm SD
Control	11,5 \pm 0,60 ^a
30 dpf	32,7 \pm 0,85 ^b
60 dpf	37,8 \pm 8,76 ^b
90 dpf	30,7 \pm 6,26 ^{ab}
120 dpf	37,8 \pm 2,82 ^b

Diferents lletres indiquen diferències significatives en un test de Tuckey amb $P < 0,05$.

tud de les gònades dreta i esquerra i es va concloure que no existien diferències entre la longitud dreta i esquerra respecte als tractaments. En el cas de comparar la longitud de les gònades de les femelles amb les dels mascles es trobaren diferències entre sexes. La longitud mitjana de les gònades dretes era de $35,6 \pm 7,3$ mm en el cas dels mascles, mentre que la de les femelles era de $24,4 \pm 1,7$ mm. Les gònades esquerres mesuraven de mitjana $36,9 \pm 7,6$ mm per als mascles i $24,6 \pm 1,9$ mm en el cas de les femelles.

Quant a l'expressió d'aromatasa, es van trobar uns nivells majors ($P < 0,01$) en femelles que en mascles, amb diferències significatives entre les femelles del grup 90 i les del grup control. L'expressió del receptor d'andrògens (AR) va resultar significativament major ($< 0,05$) en mascles que en femelles. No obstant això, no es van trobar diferències entre sexes dins del grup de 90. (Vegeu la taula 4.)

DISCUSSIÓ

Observant els resultats obtinguts quant a proporció de sexes dels diferents règims tèrmics podem afirmar que

les baixes temperatures aconseguen augmentar la proporció de femelles aproximadament tres vegades respecte els controls a altes temperatures. En estudis previs aquest increment va ser similar, encara que partint de proporcions de femelles en els controls més elevades i, en conseqüència, obtenint proporcions majors als tractaments de temperatures baixes —des d'un 18 a un 66% (Koumoundouros *et al.*, 2002) i des d'un 26 a un 73% (Pavlidis *et al.*, 2000). No obstant això, no es va aconseguir obtenir una feminització completa aplicant temperatures. D'aquí es pot deduir que les temperatures baixes no són suficients per a feminitzar els mascles genotípics i que, en canvi, temperatures altes decanten el procés de diferenciació envers mascles, masculinitzant les possibles femelles genotípiques.

Tant els resultats d'expressió de P450 com d'AR ens mostren que són bons indicadors de la presència de mascles o de femelles, respectivament. Així, seria interessant poder veure com varien aquests nivells durant el procés de desenvolupament gonadal.

AGRAÏMENTS

A l'Elvira Martínez per l'ajuda en el manteniment dels peixos i a la Silvia Joly per la feina d'anàlisi molecular. Finançat pel projecte SEXRATIO AGL-2002-02636 a F. P. i per la beca del MEC AGL2002-02636 a L. N.

BIBLIOGRAFIA

BLÁZQUEZ, M.; ZANUY, S.; CARRILLO, M.; PIFERRER, F. (1998). «Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L)». *J. Exp. Zool.*, 281:207-216.

Taula 3 Índex gonadosomàtic ($n = 14-44$ per rèplica).

Tractament	Femelles (mitjana \pm SD)	Mascles (mitjana \pm SD)
Control	0,254 \pm 0,0317 ^a	0,039 \pm 0,0185 ^a
30 dpf	0,246 \pm 0,0429 ^{ab}	0,027 \pm 0,0119 ^{ab}
60 dpf	0,207 \pm 0,0276 ^{bc}	0,036 \pm 0,0430 ^{bc}
90 dpf	0,168 \pm 0,0498 ^c	0,022 \pm 0,0119 ^c
120 dpf	0,171 \pm 0,0311 ^c	0,021 \pm 0,0094 ^c

Diferents lletres indiquen diferències significatives en un test de Tuckey amb $P < 0,01$.

Taula 4 Nivells d'expressió d'aromatasa i receptor d'andrògens ($n = 2-10$).

Tractament	P450aromA/18S		AR/18S	
	Femelles	Mascles	Femelles	Mascles
Control	7,73 \pm 1,305 ^{ab}	0,65 \pm 0,029 ^d	1,88 \pm 0,183 ^{bc}	3,33 \pm 0,195 ^a
30 dpf	6,82 \pm 0,949 ^{ab}	0,80 \pm 0,067 ^d	2,06 \pm 0,224 ^{bc}	2,93 \pm 0,232 ^a
60 dpf	8,02 \pm 1,194 ^{bc}	1,03 \pm 0,103 ^d	1,50 \pm 0,096 ^c	2,37 \pm 0,211 ^{ab}
90 dpf	10,88 \pm 0,620 ^c	1,04 \pm 0,085 ^d	2,33 \pm 0,140 ^{bc}	2,69 \pm 0,197 ^{ab}
120 dpf	5,37 \pm 1,498 ^a	1,27 \pm 0,125 ^d	1,94 \pm 0,672 ^c	3,23 \pm 0,294 ^a

Dades com a mitjana \pm SD

- BLÁZQUEZ, M.; CARRILLO, M.; ZANUY, S.; PIFERRER, F. (1999). «Sex ratios in offspring of sex-reversed sea bass and the relationship between growth and phenotypic sex differentiation». *J. Fish Biol.*, 55:916-930.
- KITANO, T.; TAKAMUNE, K.; KOBAYASHI, T.; NAGAHAMA, Y.; ABE, S. I. (1999). «Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*». *J. Mol. Endocrinol.*, 23:167-176.
- KOUMOUNDOUROS, G.; PAVLIDIS, M.; ANEZAKI, L.; KOKKARI, C.; STERIOTI, A.; DIVANACH, P.; KENTOURI, M. (2002). «Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): critical sensitive ontogenetic phase». *J. Exp. Zool.*, 292:573-579.
- PAVLIDIS, M.; KOUMOUNDOUROS, G.; STERIOTI, A.; SOMARAKIS, S.; DIVANACH, P.; KENTOURI, M. (2000). «Evidence of temperature-dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)». *J. Exp. Zool.*, 276:209-218.
- ROBLIN, C.; BRUSLÉ, J. (1983). «Ontogenèse gonadique et différenciation sexuelle du loup *Dicentrarchus labrax*, en conditions d'élevage». *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 23:115-127.
- SAILLANT, E.; FOSTIER, A.; HAFFRAY, P.; MENU, B.; THIMONIER, J.; CHATAIN, B. (2002). «Temperature effects and genotype-temperature interactions on sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)». *J. Exp. Zool.*, 292:494-505.
- SAILLANT, E.; CHATAIN, B.; MENU, B.; FAUVEL, C.; VIDAL, M. O.; FOSTIER, A. (2003). «Sexual differentiation and juvenile intersexuality in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)». *J. Zool. Lond.*, 260:53-63.
- UCHIDA, D.; YAMASHITA, M.; KITANO, T.; IGUCHI, T. (2004). «An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal». *Comp. Biochem. Physiol.*, 137:11-20.

MECANISMES MOLECULARS DURANT LA HIDRATACIÓ DE L'OU DE PEIXOS MARINS: PAPER D'UNA NOVA SUBFAMÍLIA DE CANALS MOLECULARS D'AIGUA

Mercedes Fabra, Angele Tingaud-Sequeira, Joan Cerdà*

Laboratori IRTA-CSIC. Institut de Ciències del Mar (CSIC).

Passeig marítim, 37-49. 08003 Barcelona. Tel. 932 309 531. Fax 932 309 555. Adreça electrònica: jcerda@icm.csic.es.

Resum

La flotabilitat positiva dels ous de peixos marins en l'oceà és un factor crític per a la seva supervivència i dispersió. Aquest procés està precedit per una remarcable hidratació de l'oòcit induïda per hormones a través de mecanismes moleculars desconeguts. En aquest treball revisem dades recents que indiquen que la hidratació de l'oòcit és un procés altament controlat basat en la interacció entre la proteòlisi del vitel, per a produir la força osmòtica, i un nou canal molecular d'aigua (aquaporina, AQP), SaAQP1o, per a mitjançar l'entrada d'aigua a l'oòcit. La SaAQP1o pertany a una nova subfamília de canals moleculars d'aigua similars a l'AQP1 específicament evolucionada en peixos, aparentment especialitzada en la hidratació de l'oòcit sota control hormonal i potser en altres mecanismes osmoreguladors encara desconeguts.

Paraules clau Oòcit, maduració meiòtica, aquaporines.

Abstract

Molecular mechanisms during oocyte hydration in marine fish: role of a novel subfamily of molecular water channels. The positive buoyancy of marine fish eggs in the ocean is critical for their survival and dispersal. It is preceded by a remarkable oocyte hydration induced by meiotic maturation-inducing hormones through unknown molecular mechanisms. Here, we review recent data showing that fish oocyte hydration is a highly controlled process based on the interplay between protein hydrolysis, producing the osmotic driving force, and a novel molecular water channel (aquaporin, AQP), SaAQP1o, mediating water uptake. The SaAQP1o belongs to a unique subfamily of AQP1-like channels specifically evolved in teleosts apparently specialized in hormone-induced oocyte hydration, and perhaps in other yet unknown osmoregulatory mechanisms.

Key words oocyte, meiotic maturation, aquaporins.

INTRODUCCIÓ

En teleostis i altres vertebrats, l'oòcit finalitza la meiosi (maduració) després del període de creixement (vitel·logènesi) en resposta a l'esteroid inductor de la maduració (MIS) alliberat per les cèl·lules somàtiques associades a l'oòcit (Nagahama *et al.*, 1995). En alguns teleostis, especialment en espècies marines que produeixen ous pelàgics o flotants (espècies pelagòfiles), els oòcits experimenten un ràpid augment de volum durant la maduració com a conseqüència d'una entrada masiva d'aigua, procés conegut com a *hidratació del oòcit*. Aquest procés, inicialment descrit per Fulton fa més de cent anys (Fulton, 1898) contribueix a la flotabilitat dels ous en aigua de mar, facilita

l'intercanvi d'oxigen amb l'atmosfera i la dispersió dels ous i embrions en l'oceà, i augmenta així la seva supervivència (Meloner, 1994).

El principal mecanisme fisiològic implicat en la hidratació de l'oòcit de peixos està relacionat amb un augment en aminoàcids lliures dintre de l'oòcit, com a conseqüència de la proteòlisi de les proteïnes del vitel activada durant el procés de maduració, cosa que crea la força osmòtica per a l'entrada d'aigua a l'oòcit (p. ex., Finn *et al.*, 2002). Tanmateix, l'acumulació de ions inorgànics durant la maduració meiòtica, com el K^+ o el Na^+ , també contribueix a la hidratació, i en el cas de peixos marins que produeixen ous hidratats però no flotants (espècies bentòfiles) aquest sembla ser el principal mecanisme implicat (Wallace *et al.*,

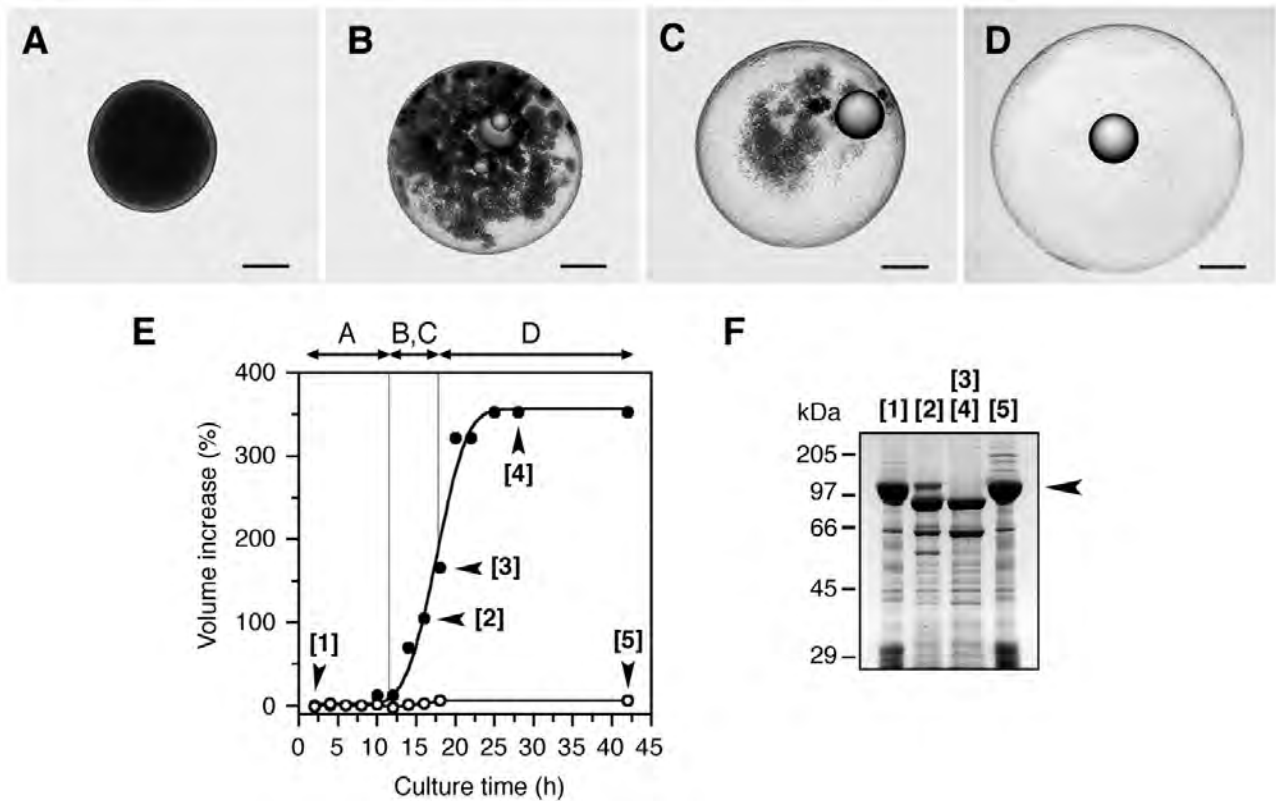


Figura 1 Maduració i hidratació de l'òcít de l'orada *in vitro*. **A-D**: Fotografies dels òcits durant la maduració. Barra, 200 μ m. **E**: Increment de volum en un òcít individual al llarg del temps en presència del MIS (punts negres) o etanol (punts blancs). Les lletres corresponen als diferents estats durant la maduració indicats en A-D. **F**: Electroforesi de les principals proteïnes del vitel en òcits en diferents moments durant la hidratació (els nombres corresponen al plafó E). La fletxa indica proteòlisi de la lipovitelina.

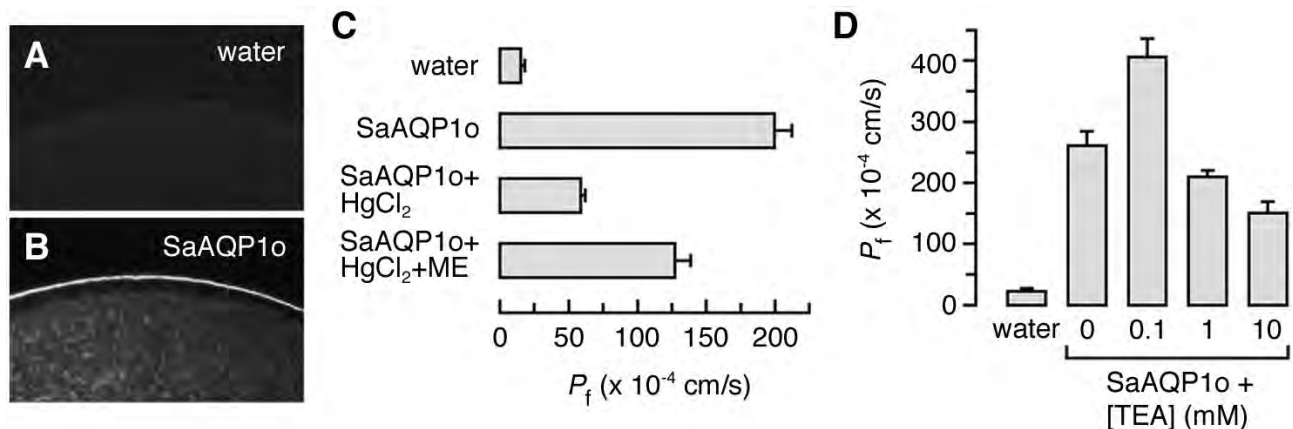


Figura 2 Expressió de la SaAQP1o en òcits de *Xenopus laevis*. **A-B**: Imatges d'immunofluorescència que indiquen la localització de la proteïna de SaAQP1o a la membrana plasmàtica de l'òcít injectat amb 10 ng de SaAQP1o cRNA amb un antisèrum contra la SaAQP1o (A, òcits control injectats amb aigua). **C**: Permeabilitat osmòtica a l'aigua dels òcits que expressen SaAQP1o, i la seva inhibició i recuperació amb HgCl₂ i β ME. **D**: Inhibició de la permeabilitat a l'aigua mitjançada per SaAQP1o amb tractament amb TEA.

1992). No obstant això, els potencials mecanismes per al transport d'aigua a l'òcít de teleostis són completament desconeguts tant en espècies pelagòfiles com bentòfiles.

L'extensa hidratació de l'òcít de peixos pelagòfils podria ser consistent amb el paper de canals moleculars especialitzats en el transport d'aigua a través de membranes, també coneguts com a *aquaporines*

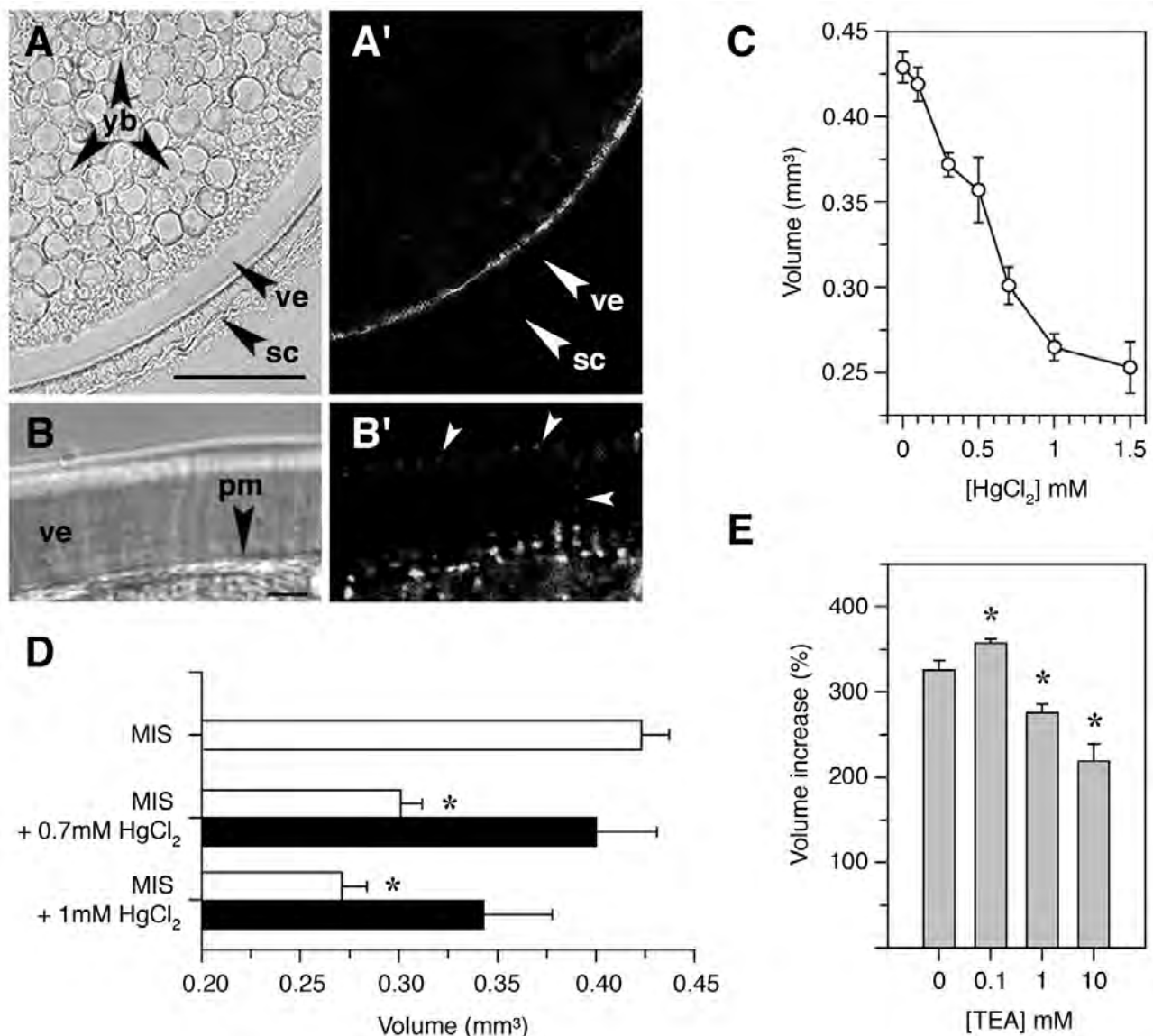


Figura 3 **A-B:** Imatges d'immunofluorescència que indiquen la localització de la SaAQP1o sota la membrana d'òcits postvitel·logènics (A, A') i avui és conegut que formen una superfamília gènica amb almenys tretze membres diferents en mamífers: AQP0, AQP1, AQP2, AQP3, AQP4, AQP5, AQP6, AQP7, AQP8, AQP9, AQP10, AQP11 i AQP12 (Agre *et al.*, 2002). La superfamília de les AQP pot ser dividida en dos grups: aquelles que són exclusivament permeables a l'aigua (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5 i AQP8) i aquelles que també són permeables a petits soluts com el glicerol o la urea (aquagliceroporines; AQP3, AQP7, AQP9 i AQP10). Les AQP s'expressen en molts teixits o cèl·lules on el transport d'aigua és important, i

C: Inhibició sobre l'augment de volum dels òcits d'orada durant la maduració meiótica *in vitro* amb dosis creixents de HgCl₂. **D:** Inhibició de la hidratació amb HgCl₂ (barres blanques) i reversibilitat de l'efecte del mercuri mitjançant tractament amb βME (barres negres). **E:** Inhibició de la hidratació de l'òcít de l'orada amb TEA.

(AQP). Aquestes proteïnes van ser descobertes fa uns quinze anys (Denker *et al.*, 1988), i avui és conegut que formen una superfamília gènica amb almenys tretze membres diferents en mamífers: AQP0, AQP1, AQP2, AQP3, AQP4, AQP5, AQP6, AQP7, AQP8, AQP9, AQP10, AQP11 i AQP12 (Agre *et al.*, 2002). La superfamília de les AQP pot ser dividida en dos grups: aquelles que són exclusivament permeables a l'aigua (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5 i AQP8) i aquelles que també són permeables a petits soluts com el glicerol o la urea (aquagliceroporines; AQP3, AQP7, AQP9 i AQP10). Les AQP s'expressen en molts teixits o cèl·lules on el transport d'aigua és important, i

en pràcticament tots els organismes, des de bacteris fins a mamífers. Les proves recents que indiquen un important paper de les AQP en el transport d'aigua en l'ovari de mamífers (McConnell *et al.*, 2002) fan raonable la hipòtesi del paper d'aquestes proteïnes en el procés d'hidratació de l'òcít de peixos. En aquest treball revisarem resultats d'investigacions molt recents en suport d'aquesta hipòtesi, cosa que ha portat, tanmateix, al descobriment d'una nova subfamília d'AQP en teleostis.

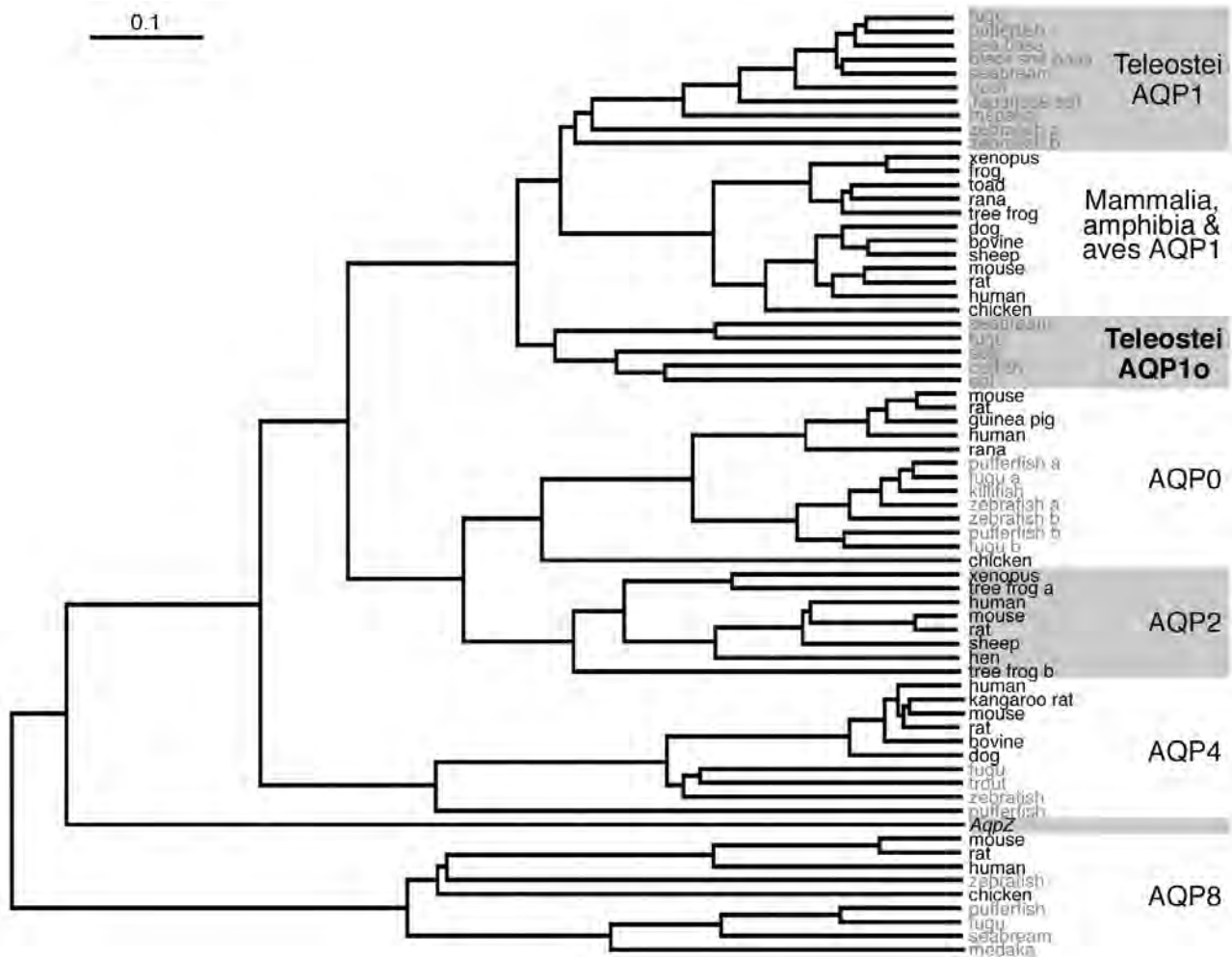


Figura 4 Relacions filogenètiques entre proteïnes d'AQP selectives a l'aigua en vertebrats. La seqüència d'aminoàcids de l'AQP d'*Escherichia coli* (*AqpZ*) va ser utilitzada com a referència. La barra representa la distància genètica entre les seqüències.

L'AQUAPORINA SaAQP1o I LA SEVA FUNCIO DURANT LA HIDRATACIO DE L'OOCIT

L'orada, *Sparus aurata*, és una espècie pelagòfila que produeix ous molt hidratats i, per tant, ofereix un excel·lent model per a la investigació del paper de les AQP durant la hidratació de l'oòcit. En aquesta espècie, la quantificació del procés d'hidratació de l'oòcit en resposta al MIS, 17 α ,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17,20 β P) *in vitro* ha revelat que la hidratació es dona de forma progressiva durant aproximadament deu hores, la qual cosa porta a un augment d'aproximadament 4,5 i 1,5 ordres de magnitud en el volum i contingut d'aigua de l'oòcit, respectivament (Fabra *et al.*, 2005). No obstant això, la hidratació de l'oòcit sembla accelerada en un període d'aproximadament dues hores, justament en el moment de la màxima proteòlisi de les principals proteïnes del vitel (lipovitellina) i, per tant, quan es crea aparentment la pressió osmòtica més ele-

vada dintre de l'oòcit (vegeu la figura 1, estat oocitari 3).

Per tal de comprovar si la relativament ràpida hidratació de l'oòcit de l'orada podria estar regulada per AQP cebadores degenerades d'oligonucleòtids, compostos a partir de regions altament conservades entre els membres de la superfamília de les AQP, van ser utilitzats per aïllar cDNA d'AQP en l'ovari de l'orada mitjançant RT-PCR. Es va aïllar un cDNA complet que mostrava sis dominis transmembrana i dos regions asparagina-prolina-alanina (NPA), que són característiques de la superfamília de les AQP (Fabra *et al.*, 2005). La seqüència d'aminoàcids deduïda del cDNA aïllat va mostrar la màxima identitat amb l'AQP1 de mamífers, i aminoàcids específics en la regió potencialment involucrada en el transport d'aigua que estan conservats en les AQP però no en les aquagliceroporines. D'acord amb aquestes característiques estructurals, el cDNA expressat artificialment en oòcits de *Xenopus laevis* va

demostrar ser selectivament permeable a l'aigua (i no permeable al glicerol o la urea), la qual cosa podia ser inhibida per clorur de mercuri (HgCl_2) i seguidament recuperat per β -mercaptoetanol (β ME); mostra, d'aquesta manera, propietats funcionals similars a l'AQP1 de mamífers (Preston *et al.*, 1992) (vegeu la figura 2a-c). No obstant això, el grau d'identitat del cDNA aïllat en l'orada i l'AQP1 de mamífers va ser lleugerament més baix (60%) que el trobat entre altres seqüències de peixos potencialment AQP1, dipositades en bases de dades, i els corresponents ortòlegs de mamífers (62-66%). A més, a diferència de l'AQP1 de mamífers, que s'expressa en molts teixits diferents, l'mRNA de l'AQP aïllada en l'orada apareixia de forma predominant en l'ovari (Fabra *et al.*, 2005). Basats en aquestes característiques inusuals, vàrem concloure que la proteïna codificada pel cDNA ovàric suposava una nova AQP en vertebrats, i l'hem anomenada *AQP1 de l'ovari d'orada* (SaAQP1o).

Mitjançant un antisèrum purificat, hem localitzat la SaAQP1o en l'ovari de l'orada. L'única immunoreacció es troba en el citoplasma de l'oòcit i no en les cèl·lules somàtiques que envolten l'oòcit, i aquesta es comença a detectar en la part més cortical dels oòcits que es troben a l'inici de la vitel·logènesi (Fabra *et al.*, 2005). A mesura que els oòcits avancen en la vitel·logènesi la SaAQP1o és translocada cap a una zona més perifèrica de l'oòcit, i quan aquests procés finalitza la SaAQP1o apareix localitzada en una zona justament per sota de la membrana plasmàtica de l'oòcit (vegeu la figura 3a). Durant la maduració meiòtica, i més específicament quan comença la màxima proteòlisi del vitel i està a punt de començar la hidratació de l'oòcit més marcada, la SaAQP1o és aparentment translocada a la membrana plasmàtica de l'oòcit i apareix en les microvellositats que travessen l'embolcall vitel·lí (vegeu la figura 3b). Per tant, la localització de la SaAQP1o durant la maduració de l'oòcit seria consistent amb el seu paper en la captació d'aigua per l'oòcit una vegada ha estat creat el gradient osmòtic a causa de la proteòlisi del vitel.

Per tal d'esbrinar el significat funcional de la característica localització cel·lular de la SaAQP1o en l'oòcit d'orada, es van dur a terme incubacions *in vitro* de fol·licles ovàrics a l'inici de la maduració en presència o absència de inhibidors de l'activitat de les AQP. A més de l' HgCl_2 , també es van utilitzar tetraetilamoni (TEA), conegut inhibidor de canals iònics que es capaç d'afectar també l'activitat de la SaAQP1o (vegeu la figura 2d) i de l'AQP1 de mamífers (Brooks *et al.*, 2000) expressades en oòcits de *X. laevis*. El tractament de fol·licles ovàrics d'orada amb HgCl_2 va ser capaç d'inhibir els augments en volum de l'oòcit a causa de la hidratació, i aquesta inhibició va ser revertida amb trac-

tament amb β ME (vegeu la figura 3c i d). Tanmateix, la presència de 10 mM de TEA va reduir l'augment de volum dels oòcits d'orada, però dosis baixes d'aquest compost estimulaven la hidratació (vegeu la figura 3e), igual com s'observa en oòcits de *X. laevis* que expressen la SaAQP1o (vegeu la figura 2d). Aquests resultats indiquen que el tipus de permeabilitat dels oòcits de l'orada en resposta a l' HgCl_2 i TEA és molt semblant al que presenta la SaAQP1o en oòcits de *X. laevis*. Per tant, aquestes dades, juntament amb la característica localització intracel·lular de la SaAQP1o en el oòcit, proporcionen bones proves del paper d'aquesta nova AQP en el mecanisme d'hidratació de l'oòcit en l'orada.

IDENTIFICACIÓ DE LA SUBFAMÍLIA AQP1o EN PEIXOS

L'aïllament i caracterització molecular de la SaAQP1o ens va portar a cercar AQP similars en l'orada mitjançant el cribratge d'una genoteca de cDNA de ronyó. Es va aïllar un nou cDNA que presentava una identitat elevada de la seva seqüència d'aminoàcids amb les seqüències de l'AQP1 de mamífers (63-67%) i d'altres peixos (88-94%), i era només un 60% idèntica a la SaAQP1o. Aquest segon cDNA era també selectivament permeable a l'aigua i sensible a l' HgCl_2 quan era expressat en oòcits de *X. laevis*, i apareixia estar expressat en molt més teixits que la SaAQP1o. Aquestes característiques, doncs, eren més semblants a l'AQP1 de mamífers, i en conseqüència aquest cDNA es va anomenar SaAQP1.

Per tal d'investigar les relacions entre la SaAQP1o, la SaAQP1 i altres AQPs selectives a l'aigua en vertebrats es van identificar seqüències similars en diverses espècies de teleostis mitjançant clonatge per homologia i cerca en genomes seqüenciats. Amb les noves seqüències obtingudes, l'anàlisi filogenètica de les AQP selectives a l'aigua en vertebrats indica l'existència de dos grups d'AQP en almenys alguns teleostis (vegeu la figura 4). El primer grup el componen els ortòlegs pròpiament de l'AQP1 de mamífers, els quals mostren un 64-67% d'identitat amb les seqüències de mamífers, aus i amfibis, mentre que l'altre grup està format per diverses AQP relacionades amb la SaAQP1o, que semblen ser expressades en l'ovari de diferents teleostis, com el llenguado (*Solea senegalensis*), l'anguila europea (*Anguilla anguilla*), el fugu (*Takifugu rubripes*) i el peix gat (*Ictalurus punctatus*). Aquestes últimes seqüències presenten un 58-62% d'identitat amb altres AQP1 de vertebrats; per tant, més baixa que les seqüències d'AQP1 de peixos, i només un 63-70% d'identitat amb les AQP1 de teleostis. La

identitat entre les AQP1o de peixos és, però, variable (des de 60% fins a 82%), i és la més elevada entre les AQP1o de perciformes (orada) i tetraodontiformes (fugu). Un fet remarcable, no obstant això, és que les AQP1o de teleostis representen un *cluster* separat d'altres AQP1 de vertebrats, i mostra branques més llargues que les AQP1 de peixos. Aquestes observacions, per tant, suggereixen una ràpida i específica evolució de la nova subfamília AQP1o en teleostis, molt probablement derivada a partir d'un gen ancestral comú codificador d'AQP1.

L'aparent ràpida aparició de les AQP1o ovàriques en peixos podria haver estat facilitada pel procés de duplicació gènica que possiblement va tenir lloc abans de la radiació dels teleostis durant l'evolució (Postlethwait *et al.*, 2004). Aquest mecanisme pot haver permès el desenvolupament d'una còpia d'un gen en una funció específica (com en aquest cas per la SaAQP1o en la hidratació de l'oòcit), i quedaria la funció inicial en el gen ancestral (p. ex., AQP1). Aquesta situació pot quedar exemplificada en el peix zebra (*Danio rerio*) on es poden trobar dues còpies tant d'AQP1 com de AQP0, possiblement com a resultat de la duplicació gènica que va tenir lloc durant l'evolució d'aquesta espècie (Postlethwait *et al.*, 2000). L'aparició de l'AQP1o en peixos marins es podria entendre si considerem que al principi de l'evolució els peixos van evolucionar des d'aigua marina cap a aigua dolça, però durant el període Juràssic, els peixos van colonitzar un altre cop l'oceà (Long, 1995). Aquesta transició molt probablement va requerir certes adaptacions osmòtiques, com la hidratació de l'oòcit mitjançant la proteòlisi del vitel com un pas clau per a alleujar la pèrdua passiva d'aigua imposada per la hiperosmolaritat de l'aigua de mar (Fyhn *et al.*, 1999). Les AQP1o podria haver evolucionat en teleostis pelagòfils per a regular aquest procés, i haurien aconseguit, a més, una flotabilitat positiva dels ous en el mar per a millorar la seva supervivència. D'aquesta forma, el descobriment de la subfamília d'AQP1o en peixos il·lustra com aquests organismes s'han adaptat a un medi hiperosmòtic durant la seva evolució.

Com ja s'ha esmentat, els canals d'aigua AQP1o han estat trobats sobretot en diferents teleostis pelagòfils que produeixen ous altament hidratats. No obstant això, s'ha identificat també una seqüència relacionada amb la SaAQP1o en l'ovari del peix gat, espècie d'aigua dolça que no produeix ous flotants. La presència d'AQP1o en el peix gat pot ser el resultat d'un gen AQP1o heretat dels ancestres dels peixos abans de la seva entrada en l'aigua dolça. D'aquesta forma, l'AQP1o podria estar encara present en algunes d'aquestes espècies i haver desenvolupat una funció similar a la que pot dur a terme en peixos marins,

ser simplement redundant, o tenir una altra funció osmoreguladora dintre de l'ovari. En aquests sentit, en salmònids i altres peixos «primitius», com els ciprinodontiformes o siluriformes (peix gat), s'ha descrit una baixa però contínua hidratació del vitel o de l'oòcit durant el creixement i maduració, i ha resultat en alguns casos un lleuger augment de volum de l'oòcit (Potts i Rudy, 1969; Iwamatsu *et al.*, 1992; Selman *et al.*, 1993). Per tant, és plausible que les AQP1o en peixos d'aigua dolça puguin tenir una funció anàloga a la SaAQP1o, si bé aquesta hipòtesi encara no ha estat demostrada.

CONCLUSIONS

El recent descobriment de la SaAQP1o en l'oòcit de l'orada ha provat un dels mecanismes moleculars clau en el procés de transport d'aigua al oòcit de teleostis. En aquesta espècie, les nostres observacions indiquen que el procés d'hidratació de l'oòcit és un mecanisme altament controlat basat en la interacció entre la proteòlisi del vitel i la SaAQP1o. De manera remarcable, AQP relacionades amb l'AQP1o han estat identificades sobretot en teleostis pelagòfils, i això suggereix que en aquestes espècies l'AQP1o podria haver-se especialitzat en la regulació del procés d'hidratació de l'oòcit induït per hormones. Aquesta regulació podria facilitar una ràpida i controlada hidratació cel·lular, la qual cosa seria essencial en aquelles espècies que ovulen diverses vegades consecutives durant l'època de reproducció, com l'orada, el llenguado o el fugu. No obstant això, són necessaris estudis futurs per a confirmar aquesta hipòtesi i per a determinar la possible regulació hormonal sobre l'expressió del gen de l'AQP1o, la seva traslocació intracel·lular o la seva funció. La recerca sobre aquests interrogants contribuirà indubtablement a un coneixement més profund dels mecanismes biològics implicats en la hidratació de l'oòcit de teleostis, la qual cosa pot tenir importants aplicacions biotecnològiques en aqüicultura.

BIBLIOGRAFIA

- AGRE, P.; KING, S. L.; YASUI, M.; GUGGINO, W. B.; OTTERSEN, O. P.; FUJIYOSHI, Y.; ENGEL, A.; NIELSEN, S. (1992). «Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine». *J. Physiol.*, 542:3-16.
- BROOKS, H. L.; REGAN, J. W.; YOOL, A. J. (2000). «Inhibition of aquaporin-1 water permeability by tetraethylammonium: involvement of the E pore region». *Mol. Pharmacol.*, 57:1021-1026
- DENKER, B. M.; SMITH, B. L.; KUHAJDA, F. P.; AGRE, P.

- (1988). «Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules». *J. Biol. Chem.*, 263:15634-15642.
- FABRA, M.; RALDÚA, D.; POWER, D. A.; DEEN, P. M. T.; CERDÀ, J. (2005). «Marine fish egg hydration is aquaporin-mediated». *Science*, 307:545.
- FINN, R. N.; OSTBY, G. C.; NORBERG, B.; FYHN, H. J. (2002). «In vivo oocyte hydration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): proteolytic liberation of free amino acids, and ion transport, are driving forces for osmotic water influx». *J. Exp. Biol.*, 205:211-224.
- FULTON, T. W. (1898). «On the growth and maturation of the ovarian eggs of teleostean fishes». *16th Annu. Rep. Fish. Bd. Scotl.*, 3:83-134.
- FYHN, H. J.; FINN, R. N.; REITH, M.; NORBERG, B. (1999). «Yolk protein hydrolysis and oocyte free amino acids as key features in the adaptative evolution of teleost fishes to seawater». *Sarsia*, 84:451-456.
- IWAMATSU, T.; TAKAHASHI, S. Y.; OH-ISHI, T.; YOKOCHI, T.; MAEDA, H. (1992). «Changes in electrophoretic patterns of oocyte proteins during oocyte maturation in *Oryzias latipes*». *Dev. Growth Differ.*, 34:173-179.
- LONG, J. A. (1995). *The rise of fishes. 500 millions years of evolution*. Baltimore: The John Hopkins University Press.
- MCCONNELL, N. A.; YUNUS, R. S.; GROSS, S. A.; BOST, K. L.; CLEMENS, M. G.; HUGHES, F. M. JR. (2002). «Water permeability of an ovarian antral follicle is predominantly transcellular and mediated by aquaporins». *Endocrinology*, 143:2905-2912.
- MELLINGER, P. J. (1994). «La flottabilité des oeufs de Téléostéens». *L'Année Biologie*, 33:117-138.
- NAGAHAMA, Y.; YOSHIKUNI, M.; YAMASHITA, M.; TOKUMOTO, T.; KATSU, Y. (1995). «Regulation of oocyte growth and maturation in fish». *Curr. Top. Dev. Biol.*, 30:103-45.
- POSTLETHWAIT, J. H.; WOODS, I. G.; NGO-HAZELETT, P.; YAN, Y. L.; KELLY, P. D.; CHU, F.; HUANG, H.; HILL-FORCE, A.; TALBOT, W. S. (2000). «Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes». *Genome Res.*, 10:1890-1902.
- POSTLETHWAIT, J.; AMORES, A.; CRESKO, W.; SINGER, A.; YAN, Y. L. (2004). «Subfunction partitioning, the teleost radiation and the annotation of the human genome». *Trends Genet.*, 20:481-490.
- POTTS, W. T.; RUDY, P. P. (1969). «Water balance in the egg of the Atlantic salmon, *Salmo salar*». *J. Exp. Biol.*, 50:223-237.
- PRESTON, G. M.; CARROLL, T. P.; GUGGINO, W. B.; AGRE, P. (1992). «Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing cell CHIP28 protein». *Science*, 256:385-387.
- SELMAN, K.; WALLACE, R. A.; SARKA, A.; QI, X. (1993). «Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*». *J. Morphol.*, 218:203-224.
- WALLACE, R. A.; GREELEY, M. S. JR.; MCPHERSON, R. (1992). «Analytical and experimental studies on the relationship between Na⁺, K⁺, and water-uptake during volume increases associated with *Fundulus* oocyte maturation in vitro». *J. Comp. Physiol.*, 162B:241-248.

EXPRESSIÓ DE LES PROTEÏNES ASSOCIADES A QUIMIORESISTÈNCIA, MRP-1 I LRP EN CÀNCER DE PRÒSTATA

Neus Bergés,¹ Julio E. Diestra,¹ August Vidal,² Enric Condom,² José Fco. Suárez,³ Ferran Aguiló,³ Ricardo Pérez-Tomás,⁴ Pepita Giménez-Bonafé^{1*}

¹ Departament de Ciències Fisiològiques II. Facultat de Medicina, Campus de Bellvitge. Universitat de Barcelona. Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Adreça electrònica: pgimenez@ub.edu.

² Servei d'Anatomia Patològica. Ciutat Sanitària i Universitaria de Bellvitge. Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat.

³ Servei d'Urologia. Ciutat Sanitària i Universitaria de Bellvitge. Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat.

⁴ Departament de Biologia Cel·lular i Patologia. Facultat de Medicina. Campus de Bellvitge. Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat.

Resum

El càncer de pròstata (CaP) és un dels càncers amb més incidència i mortalitat en la població masculina. En estadis avançats quan el càncer ja ha metastatitzat i com a últim recurs s'aplica la quimioteràpia, però en molts d'aquests casos al cap d'un temps les drogues utilitzades ja no fan efecte; és el fenomen anomenat *quimioresistència* (QR). La QR està associada a la presència d'unes proteïnes de membrana que actuen com a bombes d'*efflux* de substàncies tòxiques per a la cèl·lula, entre les quals hi ha les drogues utilitzades en els tractaments de quimioteràpia. El present treball s'ha centrat en l'estudi de la proteïna MRP-1, pertanyent a la família de les transportadores ABC, i en la proteïna LRP, pertanyent a la família de les proteïnes *vault*, en la progressió del CaP. Per a realitzar aquests estudi s'ha partit de tumors prostàtics humans en els quals les proteïnes que participen en la QR s'han detectat amb tècniques d'immunohistoquímica i la seva expressió s'ha correlacionat amb l'historial clínic dels diferents pacients.

Paraules clau Quimioresistència, càncer de pròstata, MRP-1, LRP.

Abstract

Expression of proteins associated to chemoresistance, mrp-1 and lrp, in prostate cancer. Prostate cancer (CaP) is the most prevalent cancer with high mortality among men. In advanced stages, when the cancer has metastasized, chemotherapy is applied as the last resort, but in most of the cases it fails after a while, because the drugs become ineffective, a phenomenon known as chemoresistance (QR). QR is associated to the presence of some membrane proteins that act as efflux pumps of toxic substances for the cell, and among them drugs used in chemotherapy. The present work is focused on the study of MRP-1 protein, a member of the ABC transporter family, and LRP protein, a "vault" protein, involved in CaP progression. For this study we have used human prostate tumors where proteins associated to QR have been detected by immunohistochemistry and its expression correlated to the clinical stage of the different patients.

Key words chemoresistance, prostate cancer, MRP-1, LRP.

INTRODUCCIÓ

El càncer de pròstata (CaP) és una neoplàsia maligna i invasiva originada a partir de les cèl·lules epitelials de la glàndula prostàtica, i una de les més freqüents en la població masculina. A Espanya és el tercer càncer en freqüència i el segon en mortalitat, i a Catalunya és el

segon en freqüència i el tercer en mortalitat (Fernández *et al.*, 2001). Els primers casos acostumen a aparèixer a partir dels cinquanta anys, i augmenten força a partir del seixanta-cinc anys.

Els sistemes utilitzats per a la detecció precoç del CaP es basen en els nivells de PSA (antigen específic de la pròstata) en sang. Si els valors estan per sobre

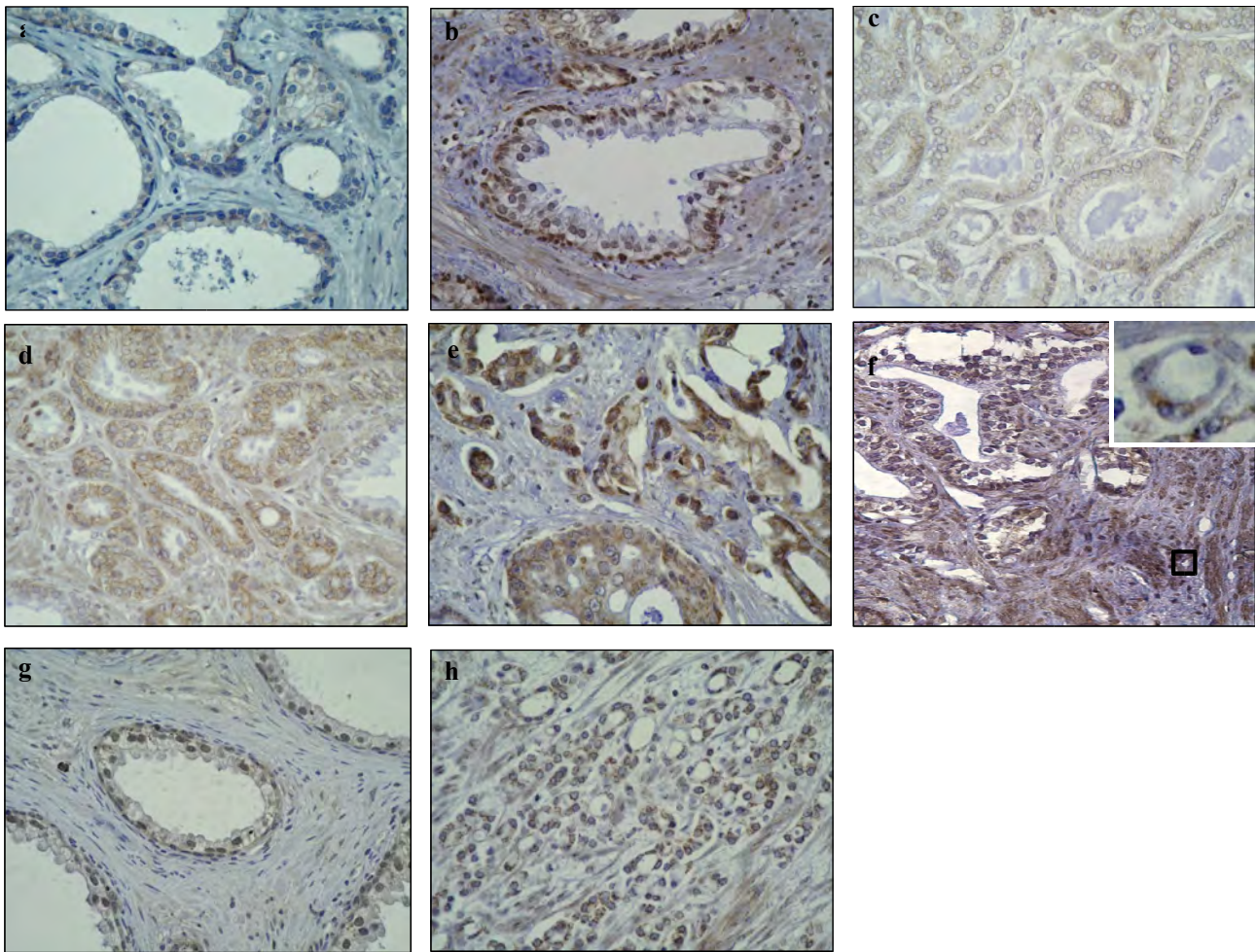


Figura 1 Detecció de MRP-1 en CaP. Amb l'anticòs MRPr1: *a*) teixit normal de pròstata, *b*) hiperplàsia benigna. Estadis progressius de càncer: *c*) grau Gleason 4, *d*) grau Gleason 6, *e*) grau Gleason 7, *f*) grau Gleason 9. Amb l'anticòs MRPm5: *g*) hiperplàsia benigna, *h*) grau Gleason 3.

de 4 ng/ml augmenten les possibilitats de tenir CaP. Un altre mètode és el tacte rectal, en el qual el metge palpa qualsevol irregularitat de la pròstata. Quan les proves anteriors són positives, es fa una biòpsia per a determinar si realment hi ha o no càncer.

Si s'ha trobat un càncer localitzat i sense metastasi es realitza una prostatectomia radical o criocirurgia. Si el tumor és de baix grau i confinat a la pròstata o disseminat a teixits veïns, s'aplica la radioteràpia. Si el tumor ja ha metastatitzat s'aplica la teràpia hormonal, consistent en la supressió d'andrògens, de manera que el càncer es redueix, ja que moltes de les cèl·lules canceroses prostàtiques que depenen dels andrògens per a sobreviure entren en apoptosi quan els en manquen. Però hi ha cèl·lules que sobreviuen indiferents a l'absència d'andrògens; aquestes cèl·lules han adquirit un fenotip d'independència als andrògens, és a dir, el tumor continuarà creixent. En aquests casos i com a últim recurs, s'aplica la quimioteràpia, amb què pacient és tractat amb drogues amb la finalitat d'eliminar

les cèl·lules canceroses independents als andrògens. Al principi fan el seu efecte, però en molts casos el pacient adquireix el fenotip de quimioresistència (QR), en què les cèl·lules no moren en presència de drogues. El fenomen de QR està relacionat amb la presència d'unes proteïnes de membrana que actuen com a bombes d'*efflux* de substàncies tòxiques per a la cèl·lula, entre les quals les drogues utilitzades per als tractaments de quimioteràpia (Gimenez-Bonafé *et al.*, 2004; Gottesman *et al.*, 2002).

S'han trobat diferents molècules implicades en QR, entre les quals s'inclouen membres de la família de proteïnes *ATP-binding cassette (ABC) transporters* (Borst *et al.*, 2002). Aquestes proteïnes es troben en teixits normals i estan involucrades en el transport de diferents substrats endògens, amb funcions de detoxificació en fetge, ronyó o tracte gastrointestinal; i funcions de protecció, amb la regulació de la permeabilitat del sistema nerviós central, testicles o placenta.

Dins la família de transportadors ABC es troben les

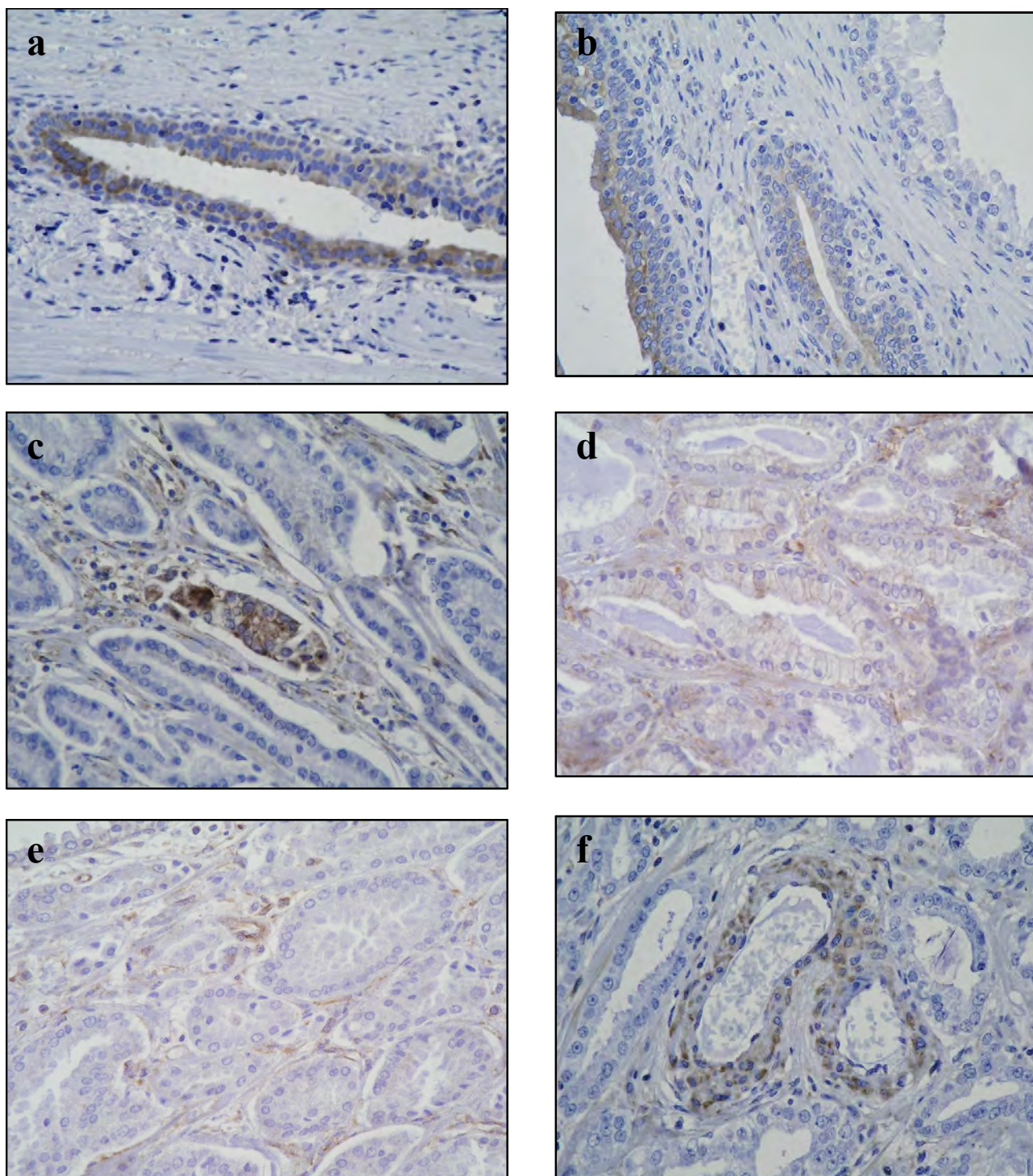


Figura 2 Detecció de LRP en CaP. *a-b*) hiperplàsia benigna, *c-d*) grau Gleason 6, *e*) grau Gleason 7, *f*) grau Gleason 9.

proteïnes associades a resistència múltiple, les MRP (Leslie *et al.*, 2001). El present treball se centra en el membre MRP-1, proteïna àmpliament distribuïda, responsable del transport de gran quantitat de drogues carregades negativament o neutres, conjugades amb glutatió, sulfat o glucoronat, i que s'ha trobat associada

a QR en leucèmies, càncer d'esòfag, de cèl·lules no petites de pulmó.

Una altra proteïna relacionada amb la QR, no pertanyent a la família de les proteïnes transportadores ABC és la LRP (*lung resistance-related protein*) (Diestra *et al.*, 2003), descrita com la *major vault protein* en humans. És una ribonucleoproteïna present en totes les

cèl·lules eucariotes en citoplasma i membrana cel·lular, involucrada en el transport de diversos substrats. Fou descoberta en càncer de cèl·lules no petites de pulmó, i també s'ha vist associada a QR en càncer de mama, ovari, testicle i pròstata (Zurita *et al.*, 2003).

En càncer de pròstata no es coneixen ben bé les proteïnes involucrades en QR. Diferents membres de la família MRP s'han trobat expressats en pròstata tant en línies cel·lulars (Van Brussel *et al.*, 1999) com en tumors procedents de pacients en diferent estat de progressió de la malaltia (Grau Gleason). MRP-1 s'ha trobat sobreexpressada i amb un increment significatiu al llarg de la progressió del CaP (Van Brussel *et al.*, 2003). La LRP també s'ha trobat sobreexpressada en càncers hormonoindependents disseminats (Van Brussel *et al.*, 2001).

L'objectiu del nostre treball s'ha centrat en l'estudi de l'expressió de les proteïnes MRP1 i LRP en CaP, per a poder trobar una relació entre la seva expressió i la progressió del càncer. Hem estudiat la seva expressió en hiperplàsia benigna i en diferents estats de malignitat.

Grau Gleason	G4	G6	G7	G8-9
PSA	6,8	8,13	8,9	14,65
recidiva	0%	66%	50%	50%
marcatge MRP-1	+	++	+++	++++
marcatge LRP	no det.	+++	-	-
nombre pacients	1	2	2	2

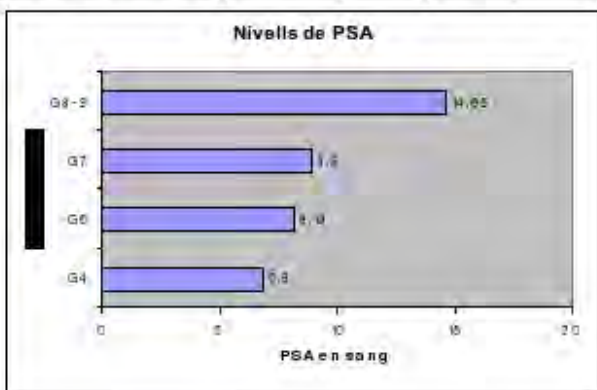


Figura 3 Correlació entre l'estat clínic del pacient i els resultats d'immunohistoquímica: a) nivells de PSA expressats en ng/ml, b) quantificació de l'expressió de MRP-1 i LRP *versus* la recidivitat del pacient.

MATERIAL I MÈTODES

Aquest estudi s'ha realitzat amb tumors parafinats de pacients procedents del Banc de Tumors del Servei d'Anatomia Patològica de la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge. Per a la detecció de les proteïnes associades a QR, MRP1 i LRP s'han realitzat immunohistoquímiques, amb els anticossos monoclonals MRPr1 i LRP, respectivament, cedits pels Drs. R. Scheper i G. Scheffer del Free University Hospital d'Holanda. De tots els pacients s'han fet controls negatius utilitzant com a anticòs primari una IgG irrelevant.

A partir dels blocs de teixit parafinat, es feren talls histològics de 4 µm que es muntaren en portaobjectes tractats amb poly-L-lisina i assecats a l'estufa a 37° C tota la nit. Les làmines es desparafinaren en xilol i rehidrataren en un gradient d'alcohols. La peroxidasa endògena es bloquejà amb un 3 % de H₂O₂ en aigua destil·lada i a fosques durant 10 min, procedit d'un rentat de les làmines en aigua destil·lada. Seguidament, per a poder exposar els epítops de la proteïna a estudiar, es procedí a fer un desemmascarament amb citrat sòdic 0,1 M a pH 6,0 a l'olla a pressió. Les làmines es deixaren refredar a temperatura ambient i es rentaren amb aigua destil·lada i PBS (5 min en cada bany). Seguidament les unions inespecífiques es bloquejaren incubant amb *normal rabbit serum* (NRS) (dilució 1:50) durant 30 min. Després s'eliminà lleugerament l'NRS i es procedí a la col·locació de l'anticòs primari MRPr1 (dilució 1:50) per a MRP1 i LRP (1:100) per a LRP i per als controls negatius IgG (1:100), per a deixar-los incubant a 4° C durant tota la nit en una cambra humida. Després es rentaren en PBS 0,2 % Tritó 100× i dos cops en PBS (5 min/bany), i es procedí a la tinció amb un mètode d'immunoperoxidasa biotina-estreptavidina, incubant a temperatura ambient amb l'anticòs secundari de conill contra rata (1:100) per a MRP1 i de conill contra ratolí (1:150) per a LRP conjugats amb biotina durant 60 min i seguidament amb peroxidasa de rave conjugada amb estreptavidina (1:500) durant 60 min. Les làmines es rentaren amb PBS i es revelaren amb DAB (diaminobencidina). Finalment, totes les làmines foren contrastades amb hematoxilina, deshidratades i muntades amb DPX.

Les observacions han estat realitzades en un microscòpi Olympus BX51, amb un objectiu de 40× i les fotografies fetes a 400× amb una càmera Camedia C5050.

RESULTATS

Hem partit de vuit pacients de l'Hospital Universitari de Bellvitge, amb càncer de pròstata localitzat. D'aquests pacients hem fet immunohistoquímiques per a MRP-1 utilitzant dos anticossos contra dos epítops diferents, el MRPr1 situat a l'extrem N-terminal i el MRPm5 a l'extrem C-terminal; ambdós reconeixen epítops interns d'MRP-1. També hem detectat la proteïna LRP amb l'anticòs LRP, i en aquest cas només s'han utilitzat sis pacients.

Pel que respecta a les immunohistoquímiques realitzades per a MRP-1, l'anticòs que millor resultat ha donat és el MRPr1. En el teixit prostàtic normal, s'observa una tinció tènue i difusa de membrana, i una tinció difusa i granular de citoplasma (vegeu la figura 1a). En el cas de la hiperplàsia benigna (HB) s'observa una tinció molt forta de les cèl·lules basals, i en cèl·lules acinars s'observa tinció de membrana i una tinció de citoplasma granular més forta respecte el teixit normal de pròstata; a més hi ha tinció paranuclear (vegeu la figura 1b).

Els primers estadis de CaP es caracteritzen per una pèrdua de les cèl·lules basals, el nucli és molt més actiu, es fa més gran i apareix nucleol. A mesura que el CaP avança hi ha una desestructuració de les glàndules prostàtiques. En un estadi poc avançat del càncer (Gleason 4) s'observa un clar increment en la intensitat de la tinció en citoplasma respecte del teixit normal i HB, però no pel que fa a la tinció de membrana (vegeu la figura 1c). A mesura que el càncer progressa, paral·lelament amb la desestructuració, s'observa un augment en la intensitat del marcatge granular de citoplasma i paranuclear, mentre el marcatge de membrana no canvia (vegeu la figura 1c-f). Un índex d'estadis avançats de CaP és l'aparició de les cèl·lules d'anell de segell, cèl·lules amb un vacúol molt gran que exerceix una pressió sobre el nucli desplaçant-lo cap a un costat i fent que el citoplasma quedi molt reduït (vegeu el detall de la figura 1f). Amb l'anticòs MRPm5 en zones hiperplàsiques s'observa tinció granular de citoplasma, mentre que en les zones de càncer el marcatge per a tots els casos de CaP és negatiu, exceptuant un pacient que presenta càncer poc avançat (Gleason 3) on s'observa tinció nuclear.

Els resultats obtinguts en les immunohistoquímiques realitzades per a detectar LRP, han estat negatius en zones hiperplàsiques i en zones de càncer per a quatre dels sis pacients estudiats. El marcatge positiu obtingut en els altres dos pacients ha estat focalitzat, amb una tinció granular de citoplasma (vegeu la figura 2c) i de membrana tènue (vegeu la figura 2d). Totes les glàndules atrofiques han donat marcatge positiu per a LRP i s'ha trobat una forta tinció granular citoplasmà-

tica. També s'ha trobat marcatge positiu en les cèl·lules endotelials dels vasos i en múscul esquelètic estriat, estructures que han servit com a control positiu per a l'anticòs.

Discussió

El CaP és mortal quan no s'ha detectat a temps, s'ha donat metàstasi i les cèl·lules canceroses no responen als tractaments de quimioteràpia aplicats. Part d'aquesta falta de resposta a les drogues aplicades és deguda a l'aparició de la QR, associada a la presència de proteïnes de membrana que funcionen com a bombes d'*efflux* de diferents substrats, entre els quals es troben les drogues aplicades en quimioteràpia.

Aquest treball s'ha centrat en l'estudi de l'expressió de les proteïnes MRP-1 i LRP, associades al fenotip de QR en d'altres càncers. Ha estat un estudi preliminar en el qual només s'han utilitzat vuit pacients, de tal manera que els resultats obtinguts són la base per a un estudi posterior amb un nombre de pacients més gran ($n = 60$), on els resultats seran estadísticament significatius.

Pel que respecta a MRP-1, s'ha trobat expressada en la pròstata normal en baixes quantitats, i a la bibliografia s'ha descrit que MRP-1 està àmpliament distribuïda amb funció protectora destoxificant. Tant en HB com en CaP s'ha detectat MRP-1, però en diferent localització cel·lular. En el cas de la HB MRP-1 es troba en la membrana citoplasmàtica i en poca quantitat en el citoplasma, mentre que en CaP la localització és inversa, i es troba una tinció granular que s'incrementa gradualment amb la progressió i apareix una tinció paranuclear. Una possible explicació és que la proteïna incrementi la seva síntesi amb l'avenç del CaP i s'acumuli en el reticle endoplasmàtic, d'aquí la localització paranuclear, l'aparell de Golgi, i vesícules d'exocitosi; d'aquí la tinció granular que s'observa en el citoplasma. S'ha descrit que en determinades condicions i depenent del tipus cel·lular, MRP-1 pot estar localitzada a la membrana de les vesícules citoplasmàtiques amb la funció de segrestar la droga i acumular-la dins la vesícula per evitar l'acció de toxicitat. Aquest fet podria estar relacionat amb l'elevada expressió observada en vesícules citoplasmàtiques. També estaria correlacionat amb una menor localització a la membrana citoplasmàtica, ja que la cel·lula no necessitaria tanta activitat d'*efflux*, en no haver-hi droga lliure a l'interior de la cel·lula. En el cas de la HB, la presència de MRP-1 a la membrana citoplasmàtica tindria la mateixa funció destoxificadora que en la pròstata normal, i el seu increment respecte a la pròstata normal es podria explicar per l'alteració en l'activitat de les cèl·lules hiperplàsiques (augment de la traducció). Cu-

riosa en HB s'ha trobat marcatge nuclear de les cèl·lules basals, i en un cas de CaP poc avançat també s'ha vist tinció nuclear (resultats no mostrats), però de cèl·lules acinars (les cèl·lules basals s'han perdut). Aquests últims són resultats en els quals cal aprofundir.

Una altra proteïna associada a QR és la LRP. Aquesta proteïna, a diferència de MRP-1, es troba bàsicament localitzada en vesícules citoplasmàtiques i una petita proporció als porus nuclears. Dels sis pacients utilitzats per a fer les immunohistoquímiques, quatre han donat negatiu en càncer i els altres dos han donat una positivitat focal tant en membrana com granular citoplasmàtica. Les glàndules atròfiques, tant les presents en la HB com en càncer, han donat un marcatge positiu. Utilitzar sis pacients no és significatiu per a afirmar que LRP estigui sobreexpressada en càncer, tot i que representi un 33 % del total, Van Brussel *et al.* (2001) en un mostreig de dinou pacients obtenen un 32 % d'expressió de LRP en citoplasma, resultats similars als obtinguts en el present treball. Cal concloure que per a arribar a resultats estadísticament significatius cal agafar una representació més àmplia.

La QR és un fenotip no solament degut a una proteïna, sinó a un conjunt de proteïnes. Si es té en compte només l'expressió d'MRP-1 i segons els nivells de PSA dels pacients en el moment de fer la prostatectomia radical, es veu que hi ha un increment dels nivells de PSA, com s'esperava, i també del marcatge d'MRP-1, però no hi ha una correlació entre la recidivitat, que és del 50 %, i l'augment de l'expressió de MRP-1. Ara bé, quan s'estudia conjuntament l'expressió positiva de MRP-1 i LRP, s'observa que en el cas de tres pacients amb Gleason 6, hi ha un 66 % de recidivitat (vegeu la figura 3), és a dir, un nombre superior de pacients ha regenerat el tumor. L'expressió conjunta d'MRP-1 i LRP podria estar relacionada amb la reaparició del càncer. Per a aquest cas (Gleason 6) sí que s'ha trobat una correlació entre l'expressió conjunta de dues proteïnes associades a QR, MRP-1 i LRP i la recidivitat dels pacients.

Els resultats mostrats en aquest treball són molt preliminars. S'ha utilitzat un nombre petit de mostres (vuit pacients totals), de manera que no es poden treure conclusions determinants. S'ha vist, però, que a mesura que el CaP progressa hi ha sobreexpressió de la proteïna MRP-1, i que la seva localització no és solament a la membrana citoplasmàtica, sinó que també es troba dintre del citoplasma en compartiments vesiculars. S'ha de realitzar un estudi més profund de la localització d'MRP-1 (colocalització d'MRP-1 amb proteïnes específiques de vesícules), i conèixer el significat d'aquesta localització en CaP (paper en

la quimioresistència). Utilitzant un nombre major de pacients es podrà determinar si existeix una correlació entre l'expressió de diferents proteïnes transportadores de drogues, i així es podrà establir una relació entre l'expressió conjunta d'aquestes proteïnes i l'aparició *de novo* del càncer en el pacient.

AGRAÏMENTS

Donem les gràcies al Dr. Manel Chiva Royo (BMC-2002-04081-002-02) i al Dr. Jordi Bermúdez (BFI2003-02539; HU02-22) pel seu suport incondicional, i a la Dra. Lourdes Carbonell pels seus consells.

BIBLIOGRAFIA

- BORST, P.; OUDE ELFERINK, R. (2002). «Mammalian ABC transporters in health and disease». *Annual Reviews Biochemistry*, 71:537-592.
- DIESTRA, J. E. [*et al.*](2003). «Expression of multidrug resistance proteins P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, breast cancer resistance protein, and lung resistance-related protein in locally advanced bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy: biological and clinical implications». *J. Urology*, 170:1383-1387.
- FERNÁNDEZ, E. [*et al.*](2001). «Evolución de la mortalidad por cáncer en Cataluña (1975-1998)». *Med. Clin. (Bar.)*, 116:605-609.
- GIMÉNEZ-BONAFÉ, P. [*et al.*](2004). «YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increases P-Glycoprotein expression». *The Prostate*, 59(3):337-49.
- GOTTESMAN, M. [*et al.*](2002). «Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters». *Nature reviews, cancer*, 2:48-58.
- LESLIE, E. [*et al.*](2001). «Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters». *Toxicology*, 167:3-23.
- VAN BRUSSEL, J.; MICKISH, G. (2003). «Multidrug resistance in prostate cancer». *Onkologie*, 23:175-181.
- VAN BRUSSEL, J. [*et al.*](2001). «Expression of multidrug resistance related proteins and proliferative activity is increased in advanced clinical prostate cancer». *The Journal of Urology*, 165:130-135.
- (1999). «Chemosensitivity of Prostate cancer cell lines and expression of multidrug resistance-related proteins». *European Journal of Cancer*, 35:664-671.
- ZURITA, A. J.; DIESTRA, J. E. [*et al.*](2003). «Lung resistance-related protein as a predictor of clinical outcome in advanced testicular germ-cell tumours». *Br. J. Cancer*, 88:879-886.

AVALUACIÓ DE L'EFICIÈNCIA DEL COLCEMID, NOCODAZOLE I VINBLASTINA PER A L'ENUCLEACIÓ QUÍMICAMENT ASSISTIDA D'OÒCITS DE RATOLÍ I DE CABRA

Nuno Costa-Borges,¹ Maria Teresa Paramio,² Josep Santaló,³ Elena Ibáñez^{4*}

^{1,3,4} Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.

08193 Bellaterra. Tel. 935 811 112. Fax 935 812 295. Adreça electrònica: elena.ibanez@uab.es.

² Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona.

08193 Bellaterra. Tel. 935 811 456. Fax 935 811 494.

Resum

L'enucleació de l'oòcit és un dels aspectes clau de la tècnica de clonatge per transferència nuclear (NT). El citoplast preparat ha de ser competent per a reprogramar el nucli transferit i assegurar el correcte desenvolupament de l'embrió reconstruït. Oòcits en metafase II (MII) són habitualment enucleats pel mètode tradicional d'enucleació física, però aquest és un procés invasiu i tècnicament complex. Amb l'objectiu de simplificar aquest procés, en aquest treball s'examina la capacitat de diferents drogues antimítotiques per a induir la formació d'una protuberància en el còrtex de l'oòcit que contingui tots els cromosomes de l'oòcit i permeti la seva ràpida localització. Per a això es van utilitzar oòcits de ratolí CD1 i B6CBAF1, i oòcits de cabra, que es van tractar amb colcemid, nocodazole i vinblastina a diferents temps. Els millors tractaments van permetre obtenir un percentatge d'oòcits amb protuberància per sobre del 80 % en les dues espècies, i es va observar un clar efecte de la durada del tractament en els oòcits de ratolí. En els oòcits de cabra, l'eficiència dels tractaments va ser dependent de l'addició de sacarosa 0,05 M al medi de cultiu.

Paraules clau Enucleació, clonatge, transferència nuclear, antimítotics.

Abstract

Evaluation of the efficiency of demecolcine, nocodazole and vinblastine for chemically assisted enucleation of mouse and goat oocytes. Oocyte enucleation is one of the key factors in mammalian cloning by nuclear transfer (NT). The cytoplasm prepared must be competent to reprogram the transferred nucleus and to ensure the correct development of the reconstructed embryo. Metaphase II (MII) oocytes are generally enucleated by the classical mechanical method, which is invasive and technically demanding. With the aim of simplifying this process, here we examine the ability of several antimitotic drugs to induce a cortical protrusion that contains all the oocyte chromosomes and allows for their rapid localization. Mouse CD1 and B6CBAF1 oocytes and goat oocytes were treated with demecolcine, nocodazole and vinblastine for various times. The best treatments resulted in more than 80% of the oocytes of both species showing a cortical protrusion, and the efficiency was clearly dependent on the duration of the treatment in mouse oocytes. In goat oocytes, the presence of 0,05 M sucrose in the incubation medium was a key factor for protrusion formation.

Key words Enucleation, cloning, nuclear transfer, antimitotics.

INTRODUCCIÓ

Des del naixement, l'any 1996, del primer mamífer clonat a partir d'una cèl·lula somàtica adulta (Wilmot *et al.*, 1997), animals de diferents espècies de mamífer han estat clonats amb la tècnica de transferència nuclear (NT). Aquesta tecnologia és de gran interès per a la producció d'animals modificats genèticament,

la multiplicació d'animals amb característiques genètiques úniques o l'obtenció de cèl·lules mare embrionàries (Wolf *et al.*, 2001), però actualment la seva aplicació és encara limitada a causa de la baixa eficiència. L'enucleació de l'oòcit receptor és un pas crucial de la tècnica, ja que el citoplast preparat ha de ser competent per a reprogramar el nucli transferit i assegurar el correcte desenvolupament de l'embrió reconstruït

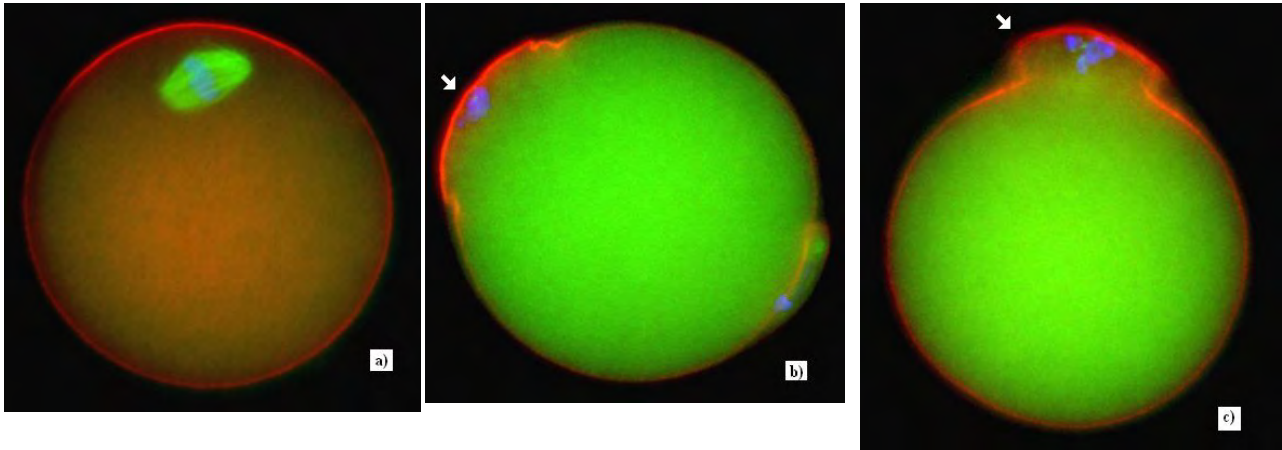


Figura 1 Oòcits de ratolí de la soca CD1. **(a)** Oòcit MII sense tractar (control). **(b)** Protuberància de tipus A (fletxa), en un oòcit CD1 tractat 30 min amb nocodazole 0,3 µg/ml. **(c)** Oòcit CD1 tractat 60 min amb vinblastina 0,1 µg/ml, amb una protuberància de tipus B (fletxa). Els microtúbuls apareixen en verd, els microfilaments en vermell i la cromatina en blau.

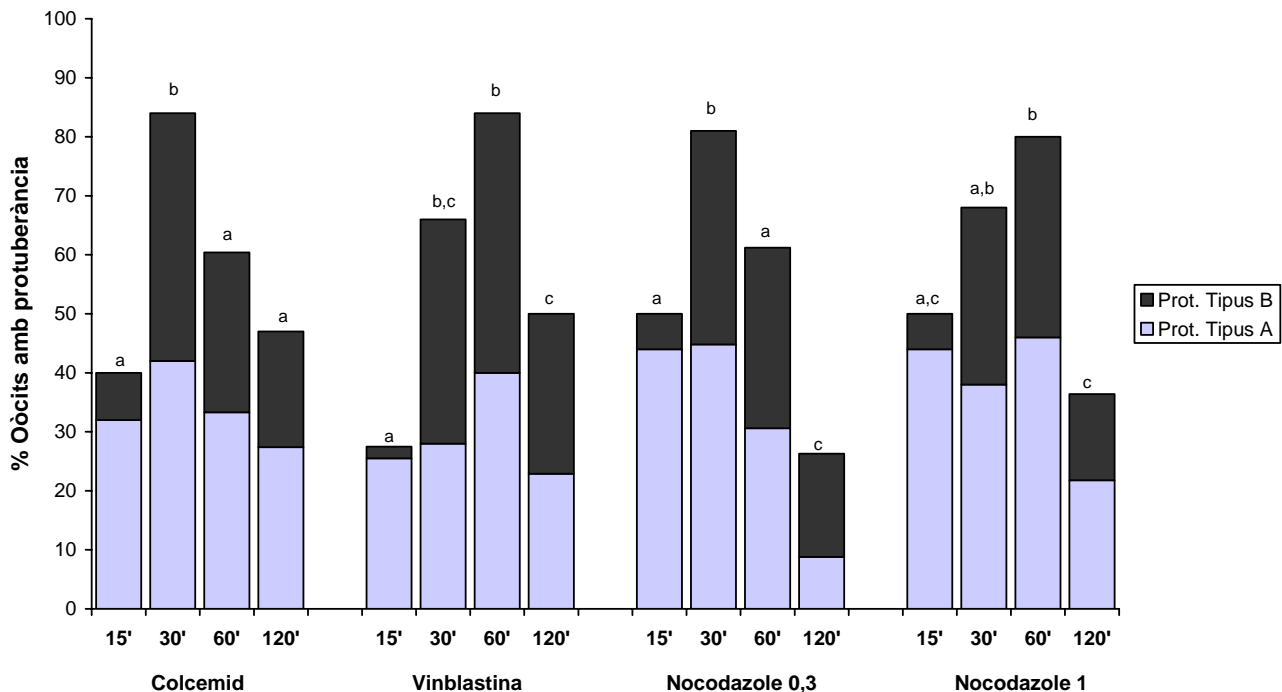


Figura 2 Percentatge d'oòcits amb protuberància i tipus de protuberància en oòcits de ratolí de la soca CD1 sotmesos a diferents tractaments amb antimitòtics.

(Fulka *et al.*, 2004). El protocol estàndard d'enucleació física és clarament invasiu i traumàtic per a l'oòcit. A més de comportar l'eliminació del fus meiótic i dels factors que hi estan associats, resulta en una reducció significativa del volum citoplasmàtic. Tot això pot comprometre la competència de l'oòcit i, per tant, el posterior desenvolupament de l'embrí reconstruït per NT (Tsunoda i Kato, 2000). Per altra banda, la impossibilitat de detectar la localització del fus meiótic en els oòcits de la majoria d'espècies d'interès ramader fa necessari tenyir-los amb Hoechst 33342, per

marcar la cromatina, i irradiar-los amb llum ultravioleta (UV) abans de dur a terme l'enucleació. Aquesta irradiació UV, malgrat que és breu, provoca una disminució significativa de la capacitat de desenvolupament embrionari a causa principalment d'alteracions en la membrana i en components intracel·lulars dels oòcits i de lesions en el DNA mitocondrial, que poden alterar el metabolisme dels embrions reconstruïts (Smith *et al.*, 1993).

Amb l'objectiu de millorar i simplificar els protocols d'enucleació d'oòcits, s'han desenvolupat diver-

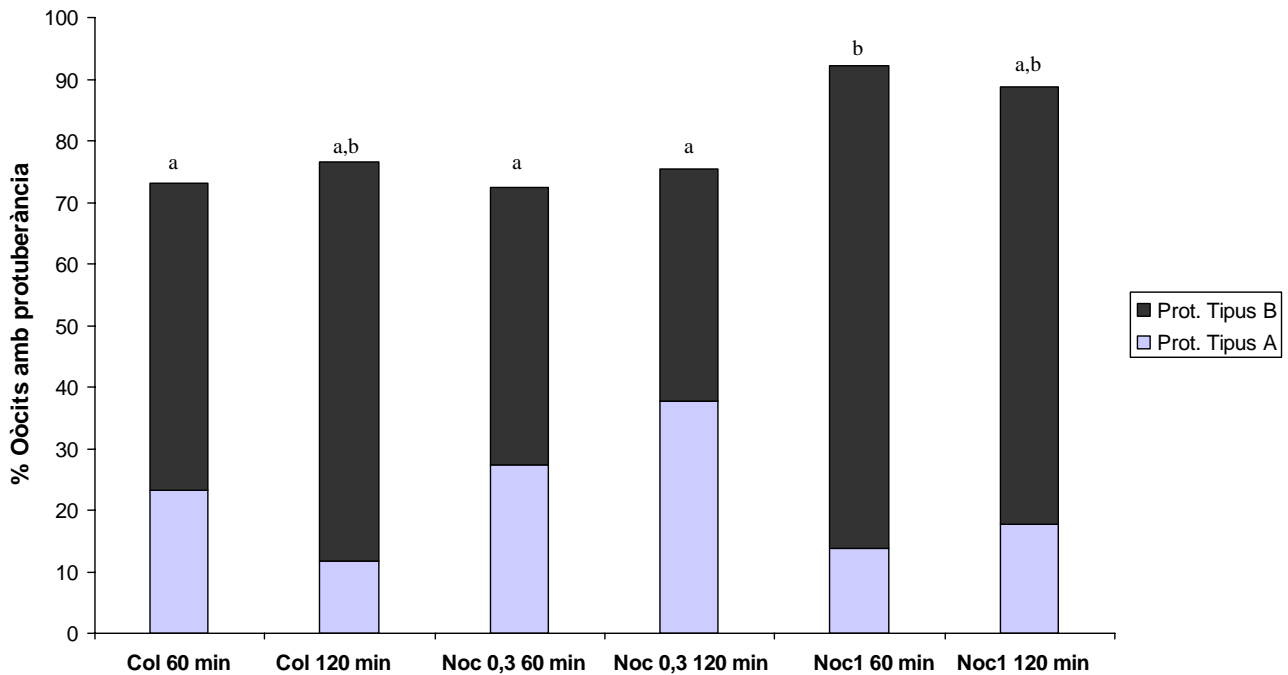


Figura 3 Percentatge d'òocits amb protuberància i tipus de protuberància en òocits de cabra sotmesos a diferents tractaments amb antimetòtics.

ses alternatives a l'enucleació física convencional (Li *et al.*, 2004; Fulka *et al.*, 2004). Una de les més atractives, per la seva simplicitat tècnica, és la preparació de citoplasts receptors a partir d'òocits preactivats i tractats amb colcemid. Aquesta tècnica, anomenada *enucleació química induïda*, resulta en l'expulsió de tota la cromatina de l'òocit en el segon corpuscle polar, a causa de l'activació de l'òocit i la despolimerització del fus meiótic, sense que sigui necessària l'aplicació de tècniques de micromanipulació. La seva eficiència ha estat demostrada en òocits de ratolí (Baguisi i Overström, 2000; Ibáñez *et al.*, 2003), cabra (Ibáñez *et al.*, 2002) i vaca (Fischer *et al.*, 2002) i ha permès l'obtenció de ratolins clonats a partir de cèl·lules del cúmulus (Baguisi i Overström, 2000) i de cèl·lules mare embrionàries (Gasparrini *et al.*, 2003). Tot i els prometedors resultats d'aquesta tècnica, però, el fet que sigui necessària l'activació prèvia de l'òocit podria comprometre la posterior competència del citoplast per a reprogramar el nucli transferit. De fet, alguns estudis suggereixen que la capacitat dels òocits activats per la reprogramació genètica del nucli transferit seria més limitada que la dels òocits en MII, a causa de la disminució dels nivells d'activitat de les cinases MPF (*maturation promoting factor*) i MAPK (*mitogen activated protein kinase*) després de l'activació (Kono, 1997). Una manera d'evitar aquest problema és aplicar el tractament amb antimetòtics en òocits en MII, no activats. En aquest cas, la despolimerització del fus

meiótic induïda per l'antimetòtic induïx la formació d'una protuberància a la superfície de l'òocit on es localitza la cromatina condensada. Tot i que, igual com en l'enucleació física, continua sent necessari eliminar aquesta protuberància per micromanipulació per a enuclear l'òocit. El fet que la protuberància sigui fàcilment visible al microscopi facilita enormement el procés. Aquesta variació de la tècnica, anomenada *enucleació químicament assistida*, ha estat recentment aplicada en òocits de porc i de vaca (Yin *et al.*, 2002b; Kawakami *et al.*, 2003; Vajta *et al.*, 2003), usant com a antimetòtics tant el colcemid com el nocodazole, i ha permès obtenir vaques i porcs clonats.

L'objectiu d'aquest treball és desenvolupar un protocol eficient per a l'enucleació químicament assistida d'òocits de ratolí i de cabra. Per aquest motiu, òocits en MII de dues soques diferents de ratolí i de cabra s'han tractat amb diferents drogues antimetòtiques (colcemid, nocodazole i vinblastina) i s'han analitzat per immunofluorescència per a determinar la taxa de formació de protuberàncies.

MATERIALS I MÈTODES

Obtenció d'òocits de ratolí i de cabra

Els òocits de ratolí es van obtenir de femelles (6-12 setmanes d'edat) de la soca no consanguïna CD1 i

de la soca híbrida B6CBAF1 (C57BL/6JxCBA/J), prèviament sotmeses a un protocol de superovulació (5 IU PMSG i 5 IU hCG 48 h més tard). Els oòcits en MII es van recollir a les 14-15 h després d'hCG i, després d'un tractament de cinc minuts a 37° C amb hialuronidasa (156 U/ml) per a dispersar les cèl·lules del cúmulus, els oòcits es van rentar dues vegades en medi mKSOM-H (Biggers *et al.*, 2000).

Els oòcits de cabra es van obtenir a partir d'ovaris de cabres prepúbere recollits en un escorxadore. Es va fer *slicing* dels ovaris per a alliberar els complexos cúmulus-oòcits (COC) que, després de rentats, es van posar a madurar en medi TCM-199 complementat amb 275 µg/ml de piruvat sòdic, 146 µg/ml d'L-glutamina, 50 µg/ml de gentamicina, 10% de sèrum de vedell castrat, 10 µg/ml d'LH, 10 µg/ml de FSH, 1 µg/ml de 17β-estradiol i 400 µg/ml de cisteamina (Urdaneta *et al.*, 2003). Després de 27 h de maduració a 38,5° C, els oòcits es van alliberar de les cèl·lules del cúmulus mitjançant un tractament de cinc minuts a 37° C en hialuronidasa (600 U/ml) i es van rentar en medi mKSOM-H.

Tractament i fixació dels oòcits

Els oòcits de ratolí de la soca CD1 es van tractar amb els antimitòtics colcemid (0,4 µg/ml), nocodazole (0,3 i 1 µg/ml) i vinblastina (0,1 µg/ml) durant 15, 30, 60 i 120 min a 37° C en medi KSOMaag. Els oòcits B6CBAF1 es van sotmetre únicament a aquells tractaments que millor resultat van donar en la soca CD1 (30 min en colcemid 0,4 µg/ml o nocodazole 0,3 µg/ml; 60 min en vinblastina 0,1 µg/ml). Immediatament després del tractament els oòcits es van fixar durant 30 min a 37° C en *microtubule stabilizing buffer-extraction fixative* (MTSB-XF) compost per 100 mM de PIPES, 5 mM de MgCl₂, 2,5 mM d'EGTA, 1 mM de ditiotretol, 1 µM de taxol, 0,01% d'aprotinina, 45% d'òxid de deuteri, 3,7% de formaldehid i 1% de Triton X-100 (Messinger i Albertini, 1991).

Els oòcits de cabra es van tractar amb colcemid (0,4 µg/ml) i nocodazole (0,3 i 1 µg/ml) durant 60 i 120 min a 38,5° C en medi KSOMaag amb 0,05 M de sacarosa. Seguidament es van fixar en 2% de paraformaldehid 5 min a 37° C i en MTSB-XF 30 min a 37° C.

Els oòcits fixats es van guardar a 4° C en solució *block* composta per 0,2% d'azida sòdica, 1% de BSA, 0,2% de llet descremada en pols, 2% de sèrum de cabra desactivat, 0,1 M de glicina i 0,01% de Triton X-100 (Wickramasinghe i Albertini, 1992). Cadascun dels tractaments es va repetir al menys tres vegades i es van analitzar aproximadament cinquanta oòcits per grup.

Anàlisi per immunofluorescència

Els oòcits fixats es van sotmetre a un protocol de triple tinció per a la detecció simultània dels microtúbuls, els microfilaments i la cromatina per microscòpia de fluorescència. Els oòcits de ratolí es van incubar durant una hora a 37° C en una barreja d'anticossos de ratolí anti-α/β-tubulina (1:1000). Després es van rentar dues vegades en PBS+1% de BSA durant 5 min a temperatura ambient i es van incubar durant 30 min a 37° C en solució *block*, seguit d'una incubació de 30 min a 37° C en anticòs secundari contra IgG de ratolí conjugat amb Alexa Fluor 488 (6 µg/ml). Es van rentar un altre cop en PBS+1% BSA i es van incubar a 37° C durant 30 min en faloidina conjugada amb Alexa Fluor 594 (1,5 U/ml) per a la visualització dels microfilaments. Finalment, es van rentar dues vegades més en PBS+1% BSA i es van incubar en Hoechst 33258 (10 µg/ml) durant 15 min a temperatura ambient per a la detecció de la cromatina. Els oòcits de cabra es van sotmetre al mateix protocol de tinció, però amb les següents diferències: incubació tota la nit a 4° C amb l'anticòs primari contra la tubulina, incubació durant 3 h amb l'anticòs secundari, incubació durant 20 min en faloidina conjugada amb Alexa Fluor 594 (1 U/ml), i rentats en solució *block* (tres rentats: 5, 5, i 15 min).

Un cop tenyits els oòcits es van muntar en portaobjectes en una solució de 50% glicerol/PBS amb 25 mg/ml d'azida sòdica i es van guardar a 4° C. Les preparacions es van examinar en un microscopi d'epifluorescència *Olympus BX60* equipat amb filtres específics i amb un sistema de captura i anàlisi d'imatges (programari Genux versió 3.0).

Anàlisi estadística

Els resultats es van analitzar mitjançant el test de χ^2 o el test exacte de Fisher. Valors de $P < 0,05$ es van considerar estadísticament significatius.

RESULTATS

Per a cada oòcit es va analitzar el grau de despolimerització dels microtúbuls del fus meiótic, l'estat dels cromosomes i la presència o no de protuberància a la superfície de l'oòcit. Les protuberàncies induïdes pel tractament amb antimitòtics es van classificar en dos tipus: *a* o *b* (vegeu la figura 1). Les protuberàncies del tipus *a* es caracteritzen per un àrea relativament extensa de la membrana de l'oòcit que es projecta cap enfora, però no molt pronunciada. Les protuberàncies del tipus *b* són més pronunciades, amb un àrea de projecció més delimitada i de menor volum que les del

Taula 1 Formació i tipus de protuberàncies induïdes per diferents tractaments amb antimetabòlics en oòcits de ratolí de les soques CD1 i B6CBAF1.

Tractament	Soca	n	% -P (n)	% PA (n)	% PB (n)
Colcemid 30 min	CD-1	50	16 % (8) ^a	42 % (21) ^a	42 % (21) ^a
B6CBAF1	52	28,8 % (15) ^a	28,8 % (15) ^a	42,4 % (22) ^a	
Vinblastina 60 min	CD-1	50	16 % (8) ^a	40 % (20) ^a	44 % (22) ^a
B6CBAF1	55	25,5 % (14) ^a	21,8 % (12) ^a	52,7 % (29) ^a	
Nocodazole 0,3 µg/ml 30 min	CD-1	58	19 % (11) ^a	44,8 % (26) ^a	36,2 % (21) ^a
B6CBAF1	49	28,6 % (14) ^a	40,8 % (20) ^a	30,6 % (15) ^a	
Nocodazole 1 µg/ml 30 min	CD-1	50	32 % (16) ^a	38 % (19) ^a	30 % (15) ^a
B6CBAF1	46	52,2 % (24) ^a	17,4 % (8) ^b	30,4 % (14) ^a	

-P: sense protuberància; PA: protuberància de tipus A; PB: protuberància de tipus B.

Els diferents superíndexs indiquen diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) entre les dues soques de ratolí per a cadascun dels tractaments.

tipus *a*. En tots dos tipus, els cromosomes es localitzen dins la protuberància, generalment en forma d'una massa compacta.

Resultats en oòcits de ratolí CD1

Per a totes les drogues testejades, els oòcits fixats als 15 min de tractament presentaven un fus meiótic poc despolimeritzat, amb una densitat de tubulina més reduïda en la part central del fus, i els cromosomes poc compactats. Només un 27,5-50 % (segons el tractament) d'aquests oòcits presentaven protuberàncies, que majoritàriament eren del tipus *a* (vegeu la figura 2). Els oòcits tractats durant 30 o 60 min amb antimetabòlic presentaven un fus meiótic pràcticament despolimeritzat per complet i els cromosomes força compactats. De fet, aquests tractaments van resultar ser els més eficients pel que fa a la taxa de formació de protuberàncies. Concretament, el percentatge d'oòcits amb protuberància en els tractaments de 30 min amb colcemid (84 %) i nocodazole 0,3 µg/ml (81 %) van ser significativament superiors als de més curta (15 min) o més llarga durada (60 i 120 min). Pel que fa a la vinblastina i al nocodazole 1 µg/ml, els tractaments de 30 (66 % i 68 %, respectivament) i de 60 min (84 % i 80 %, respectivament) van resultar superiors a la resta i estadísticament similars entre si, tot i que amb una tendència més elevada en els de 60 min (vegeu la figura 2). Independentment del tipus de droga, aproximadament un 50 % dels oòcits amb protuberància als 30 o 60 min de tractament presentaven una protuberància de tipus *b*.

Tractaments més llargs, de 120 min, van resultar en una reducció significativa en el nombre final d'oòcits amb protuberància per a totes les drogues (vegeu la figura 2), comparat amb els tractaments de 30 i 60 min, tot i que els percentatges relatius d'oòcits amb

protuberàncies de tipus *a* o *b* continuava mantenint-se al voltant del 50 %. Així, el temps de tractament clarament influeix en el nombre total de protuberàncies formades però no el seu tipus. De fet, la disminució del nombre d'oòcits amb protuberància en allargar el temps de tractament podria ser atribuïble a la dispersió dels cromosomes. Un percentatge pròxim als 50 % d'oòcits tractats amb qualsevol dels antimetabòlics durant 120 min mostraven els cromosomes dispersos per tot el citoplasma, fet que no s'observava en els tractaments més curts (dades no mostrades).

Resultats en oòcits de ratolí B6CBAF1

Els tractaments amb millors resultats en la soca CD1 es van provar en els oòcits B6CBAF1. En estudis anteriors amb la tècnica d'enucleació química induïda s'havia demostrat com el fons genètic dins d'una mateixa espècie influïa en els resultats (Ibáñez *et al.*, 2003). La comparació estadística del mateix tractament entre les dues soques de ratolí va indicar que en aquest cas el fons genètic no sembla ser important. No es van detectar diferències estadísticament significatives per a cap tractament entre les dues soques de ratolins pel que fa referència al percentatge d'oòcits amb protuberància o a la tendència a formar protuberàncies del tipus *a* o *b* (vegeu la taula 1).

D'altra banda, la comparació entre els diferents tractaments aplicats en els oòcits B6CBAF1 va revelar que no existeixen diferències significatives quant al percentatge d'oòcits amb protuberància entre els tractaments amb colcemid (71,2 %), vinblastina (74,5 %) i nocodazole 0,3 µg/ml (71,4 %), però sí entre aquests i el nocodazole 1 µg/ml (47,8 %), que sembla ser el menys eficaç. Els millors tractaments, pel que fa al percentatge final d'oòcits amb protuberàncies de tipus *b*, van ser els de vinblastina 60 min (52,7 %), superior als

tractaments amb nocodazole, i de colcemid 30 min (42,4 %).

Resultats en oòcits de cabra

Els oòcits de cabra són morfològicament diferents als oòcits de ratolí. Una de les diferències és el reduït espai perivitellí que presenten. Estudis previs fets al nostre laboratori amb les drogues antimitòtiques diluïdes en medi KSOMAag van revelar la impossibilitat que es formessin protuberàncies en un espai tan reduït. L'addició de sacarosa 0,05 M al medi d'incubació KSOMAag augmenta l'espai perivitellí, i facilita la formació de protuberàncies, tal i com havia estat demostrat en treballs amb oòcits de porc (Yin *et al.*, 2002b).

El tractament més efectiu per a la formació de protuberàncies en els oòcits de cabra va ser el de 60 min amb nocodazole 1 µg/ml (92,2 %), tot i que les diferències amb el tractament de 120 min (88,7 %) o fins i tot amb el de 120 min amb colcemid (76,5 %) no van ser significatives (vegeu la figura 3). Cal dir, però, que el nombre d'oòcits analitzats en aquest darrer grup ($n = 17$) és encara insuficient per a treure conclusions definitives. Fent la comparació estadística entre el percentatge d'oòcits amb protuberàncies de tipus *b* en cada tractament, s'observa com els tractaments amb nocodazole 1 µg/ml de 60 i 120 min són significativament els més eficaços (78,4 % i 71 %, respectivament).

DISCUSSIÓ

Tal com s'ha demostrat prèviament en oòcits de porc i de vaca (Yin *et al.*, 2002b; Kawakami *et al.*, 2003; Vajta *et al.*, 2003), el tractament d'oòcits en MII amb drogues antimitòtiques com el colcemid o el nocodazole indueix la formació d'una protuberància en la superfície de l'oòcit que facilita la localització del DNA durant el procés d'enucleació previ a la NT. A més, el volum citoplasmàtic que s'elimina durant el procés d'enucleació és inferior que quan s'utilitza el mètode d'enucleació física convencional, de manera que presumiblement la competència de l'oòcit no es veu tant afectada. Si bé aquesta estratègia no elimina la necessitat d'utilitzar tècniques de micromanipulació per a enuclear l'oòcit, simplifica bastant aquest procés.

L'optimització de les taxes de formació de protuberàncies és un pas fonamental abans d'aplicar l'enucleació química assistida en la preparació de citoplasts per a ser usats com a receptors en la NT. En treballs previs amb la tècnica d'enucleació química induïda s'observà que l'eficiència de la tècnica varia en funció del fons genètic dels oòcits i que el protocol ha de ser adaptat per a cada espècie amb la que es treballa

(Ibáñez *et al.*, 2002, 2003; Fischer *et al.*, 2002). Per aquest motiu, l'objectiu principal del present treball era optimitzar el protocol d'enucleació química assistida en oòcits de ratolí i de cabra, dues espècies on aquesta tècnica encara no ha estat aplicada. Al mateix temps, es pretenia investigar si existeixen diferències específiques o dependents del tipus d'antimitòtic emprat pel que fa a l'eficiència de la tècnica.

Els resultats obtinguts demostren que tots els antimitòtics emprats són capaços d'induir la formació de protuberàncies en els oòcits en MII, tant de ratolí com de cabra. Les protuberàncies de tipus B són les més interessants, ja que són fàcils de localitzar i contenen un petit volum de citoplasma, on es troben tots els cromosomes de l'oòcit. Aquest és un aspecte molt important, ja que a l'hora d'enuclear s'evitarà l'eliminació de grans quantitats de citoplasma amb possibles factors importants per al posterior desenvolupament dels embrions reconstruïts. En aquest estudi es conclou que el temps d'actuació de cada droga és determinant per a la formació de protuberàncies però, excepte en els tractaments més curts (15 min) en ratolí, no sembla influir en el tipus de protuberàncies que formen. D'altra banda, el temps de tractament depèn clarament de l'espècie d'oòcit amb la qual es treballa. Així, els tractaments més efectius en oòcits de ratolí són de 30 o 60 min, i els tractaments més llargs (120 min) perden eficiència, possiblement a causa d'una dispersió dels cromosomes amb el temps. En els oòcits de cabra, en canvi, els tractaments de 60 i 120 min són els que proporcionen un major percentatge d'oòcits amb protuberància.

A diferència del que s'observa quan el tractament amb antimitòtics s'aplica en oòcits activats (Ibáñez *et al.*, 2003), en els oòcits MII no s'observen diferències significatives en l'eficiència de la tècnica entre les dues soques de ratolí. Malgrat això, sí que hi ha diferències en funció de l'espècie. Així, si es considera el percentatge final d'oòcits amb protuberància de tipus B, els valors són força més elevats en els oòcits de cabra (màxim del 78,4 %) que en els de ratolí (màxim del 52,7 %). Taxes superiors al 70 % han estat descrites en oòcits de porc (Kawakami *et al.*, 2003) i de vaca (Li *et al.*, 2004).

Per finalitzar, cal destacar que la utilitat dels antimitòtics en l'enucleació química assistida és evident sempre i quan es comprovi que l'efecte d'aquestes drogues és reversible i no afecta el potencial de desenvolupament de l'oòcit. En aquests moments al nostre laboratori s'estan duent a terme estudis de reversibilitat dels tractaments aquí presentats i, per tant, el tractament més eficient per a l'enucleació química assistida serà el que, entre els que tenen major capacitat per a formar protuberàncies del tipus *b*, sigui més reversible.

AGRAÏMENTS

Els autors agraeixen Begoña Anguita i Ana Jiménez-Macedo per proporcionar els oòcits de cabra madurats *in vitro*. Aquest treball s'ha realitzat amb el finançament d'un projecte per a grups emergents de la Universitat Autònoma de Barcelona (EME2004-24).

BIBLIOGRAFIA

- BAGUISI, A.; OVERSTRÖM, E. W. (2000). «Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals». *Theriogenology*, 54:209.
- BIGGERS, J.; MCGUINNIS, L. K.; RAFFIN, M. (2000). «Amino acids and preimplantation development of the mouse in the protein-free KSOM». *Biol. Reprod.*, 63:281-293.
- FISCHER, D.; IBÁÑEZ, E.; CIBELLI, J.; ALBERTINI, D. F.; OVERSTRÖM, E. W. (2002). «Activated bovine cytoplasts produced by induced enucleation support development of bovine nuclear transfer embryos *in vitro*». *Biol. Reprod.* 66(supl. 1):238.
- FULKA, J. JR.; LOI, P.; FULKA, H.; PTAK, G.; NAGAI, T. (2004). «Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts». *Trends Biotechnol.*, 22:279-283.
- GASPARRINI, B.; GAO, S.; AINSLIE, A.; FLETCHER, J.; MCGARRY, M.; RITCHIE, W. A.; SPRINGBETT, A. J.; OVERSTRÖM, E. W.; WILMUT, I.; DE SOUSA, P. A. (2003). «Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation». *Biol. Reprod.*, 68:1259-1266.
- IBÁÑEZ, E.; SANFINS, A.; COMBELLES, C.; ALBERTINI, D. F.; OVERSTRÖM, E. W. (2002). «Induced enucleation of mouse and goat oocytes: kinetic and phenotypic characterizations». *Theriogenology*, 57:421.
- IBÁÑEZ, E.; ALBERTINI, D. F.; OVERSTRÖM, E. W. (2003). «Demecolcine-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion». *Biol. Reprod.*, 68:1249-1258.
- KAWAKAMI, M.; TANI, T.; YABUUCHI, A.; KOBAYASHI, T.; MURAKAMI, H.; FUJIMURA, T.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. (2003). «Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes». *Cloning Stem Cells*, 5:379-387.
- KONO, T. (1997). «Nuclear transfer and reprogramming». *Rev. Reprod.*, 2:74-80.
- LI, G. P.; WHITE, K. L.; BUNCH, T. D. (2004). «Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: State of the art». *Cloning Stem Cells*, 6:5-13.
- MESSINGER, S. M.; ALBERTINI, D. F. (1991). «Centrosome and microtubule dynamics during meiotic maturation of the mouse oocyte». *J. Cell. Sci.*, 100:289-298.
- SMITH, L. C. (1993). «Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured *in vitro*». *J. Reprod. Fertil.*, 99:39-44.
- TSUNODA, Y.; KATO, Y. (2000). «The recent progress on nuclear transfer in mammals». *Zool. Sci.*, 17:1177-1184.
- URDANETA, A.; JIMENEZ-MACEDO, A. R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T. (2003). «Supplementation with cysteamine during maturation and embryo culture on embryo development of prepubertal goat oocytes selected by the brilliant cresyl blue test (BCB)». *Zygote*, 11:347-354.
- VAJTA, G.; LEWIS, I. M.; TROUNSON, A. O. (2003). «Hand-made somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency *in vitro*». *Biol. Reprod.*, 68:571-578.
- WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. (1997). «Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells». *Nature* 385:810-813.
- WOLF, D. P.; MITALIPOV, S.; NORGREN, JR., R. B. (2001). «Nuclear transfer technology in mammalian cloning». *Archives of Medical Research*, 32:609-613.
- WICKRAMASINGHE, D.; ALBERTINI, D. F. (1992). «Centrosome phosphorylation and the developmental expression of meiotic competence in mouse oocytes». *Dev. Biol.*, 170:62-74.
- YIN, X. J.; TANI, T.; YONEMURA, I.; KAWAKAMI, M.; MIYAMOTO, K.; HASEGAWA, R.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. (2002b). «Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes». *Biol. Reprod.* 67:442-446.

FREQÜÈNCIA DE LES MICRODELECCIONS *gr/gr*, *b1/b3* i *b2/b3* DE LA REGIÓ AZFc DEL CROMOSOMA Y HUMÀ

Cristina Gázquez,¹ Josep Oriola,¹ Lourdes Mengual,² José Luis Ballecà,³ Rafael Oliva^{1*}

¹ Human Genetics Laboratory, Grup de Genètica Humana. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona, IDIBAPS. Casanova, 143. 08036, Barcelona. Adreça electrònica: roliva@ub.edu.

² Laboratori de Biologia Molecular. Fundació Puigvert. Barcelona.

Assisted Reproduction Units, ICGON. Hospital Clínic, IDIBAPS. Barcelona.

Resum

El cromosoma Y conté moltes seqüències repetides, anomenades *amplicons*, que fan que puguin produir-se deleccions. També conté diversos gens necessaris per a una espermatogènesi correcta. Concretament, la regió AZFc del cromosoma Y humà és essencial per a una espermatogènesi normal. Recentment, s'han caracteritzat tres tipus de microdeleccions de la regió AZFc: la microdelecció *gr/gr*, la microdelecció *b1/b3* i la microdelecció *b2/b3*. En aquest estudi s'han analitzat les freqüències d'aquestes tres microdeleccions en pacients amb problemes d'infertilitat, que eren candidats a ICSI. El cribratge de la regió AZFc s'ha realitzat mitjançant vuit *sequence-tagged site* (STS) en quatre-cents dos pacients i trenta-cinc controls. S'han trobat dinou pacients amb microdeleccions *gr/gr* (4,73 %), dos amb microdeleccions *b2/b3* (0,5 %), cap amb microdelecció *b1/b3* i un amb una nova microdelecció (sY1191 i sY1291 delecionats; 0,25 %). Cap control ha presentat microdeleccions. La delecció *gr/gr* és un factor de risc de defectes espermatogènics. La delecció *b1/b3* té una freqüència molt baixa i no s'ha trobat la relació que existeix entre la presència de la microdelecció i l'efecte a l'espermatogènesi. A més, s'ha identificat un pacient amb un nou tipus de microdelecció del qual encara es desconeix el mecanisme molecular.

Paraules clau STS, microdeleccions parcials, regió AZFc, cromosoma Y.

Abstract

Frequency of microdeletions *gr/gr*, *b1/b3* and *b2/b3* of the AZFc region in human Y chromosome. Y chromosome contains many repetitive sequences (called amplicons) that result in increased susceptibility of reorganizations. It also contains several genes that are essential for spermatogenesis. Specifically, the AZFc region in human Y chromosome is critical as its complete microdeletion results in azoospermia. Recently, three different type of partial microdeletions of the AZFc region have been characterized: the *gr/gr* deletion, the *b1/b3* deletion and the *b2/b3* deletion. In the present work we have analyzed the frequencies of these three types of microdeletions in infertile patients who were ICSI candidates through the screening with eight sequence-tagged site (STSs) along the AZFc region. A total of 402 patients and 35 controls have been studied. 19 patients have been found with the *gr/gr* microdeletion (4.73%), 2 with the *b2/b3* microdeletion (0.5%), none with the *b1/b3* microdeletion and one with a new type of microdeletion (negative for sY1191 and sY1291; 0.25%). No microdeletions have been detected in any of the control samples. The *gr/gr* microdeletion is a risk factor for spermatogenic failure. The *b1/b3* microdeletion occurs at a very low frequency and its clinical consequences are so far unknown. No molecular explanation is yet available for the new type of microdeletion detected.

Key words STSs, partials microdeletions, AZFc region, Y chromosome.

INTRODUCCIÓ

La infertilitat masculina afecta el 5-10 % de la població. L'error espermatogènic és la forma més comuna,

de la qual, aproximadament el 10 % són Yq microdeleccions (Oliva *et al.*, 1998; Moro *et al.*, 2002; Foresta *et al.*, 2001; Yen, 2001; Tyler-Smith i Mc Vean, 2003). El

cromosoma Y conté molts amplicons que fan que puguin aparèixer delecions. També conté diversos gens necessaris per a una espermatogènesi correcta. Les microdelecions en Yq, que eliminen un o diversos d'aquests gens són les responsables d'alguns casos d'infertilitat masculina. Concretament, la regió AZFc del cromosoma Y humà és essencial per a una espermatogènesi normal. La delecio b2/b4 elimina tota aquesta regió AZFc, cosa que provoca un error espermatogènic. L'interès en l'anàlisi de les microdelecions del cromosoma Y deriva de la possibilitat de la transmissió d'aquestes microdelecions mitjançant ICSI. Aquesta anàlisi s'ha convertit en una eina diagnòstica d'utilitat per a poder donar un consell genètic adequat abans de realitzar un tractament de reproducció assistida.

Recentment, s'han caracteritzat tres tipus de microdelecions de la regió AZFc: la microdelecio gr/gr, la microdelecio b1/b3 i la microdelecio b2/b3 (Repping *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2004). S'ha vist que microdelecions de la regió AZFc són comunes en homes infèrtils, però de moment la seva anàlisi molecular no forma part de les anàlisis de rutina. En aquest estudi s'han analitzat les freqüències d'aquestes tres microdelecions en pacients amb problemes d'infertilitat amb un cribratge de la regió AZFc amb vuit *sequence-tagged site* (STS) (Repping *et al.*, 2004; De Llanos *et al.*, 2004).

MATERIAL I MÈTODES

Pacients

Els pacients provenen de la Unitat de Reproducció Assistida de l'Hospital Clínic de Barcelona i són candidats per a ICSI. Les mostres utilitzades en aquest estudi són mostres de DNA aïllat a partir de la sang

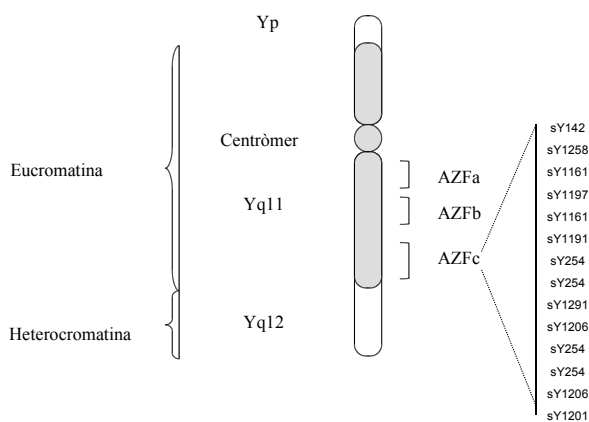


Figura 1 Detall de la regió AZFc analitzada i els STS utilitzats en el cribratge ordenats segons Skaletsky (2003).

dels pacients en la Unitat de Genètica, de l'Hospital Clínic de Barcelona, mitjançant mètodes estàndards.

Les mostres analitzades en aquest estudi provenen d'un estudi anterior on es va avaluar si el pacient estava afectat d'una delecio total d'una de les tres regions AZF (AZFa, b i c) del cromosoma Y. Si el resultat va donar una absència de delecio, la mostra s'ha inclòs en el present estudi. D'aquesta manera, s'han estudiat quatre-cents dos pacients i trenta-cinc controls. S'ha analitzat la presència de microdelecions en la regió AZFc.

Anàlisi molecular de microdelecions en la regió AZFc del cromosoma Y

Per a analitzar la presència de microdelecions en la regió AZFc, s'han estudiat vuit STS localitzats en aquesta regió del Yq (vegeu la figura 1). Tots els primers utilitzats ja s'havien descrit. En una primera etapa s'han coamplificat els STS sY1191 i sY1291 mitjançant PCR (vegeu la taula 1). En el cas que algun o ambdós d'aquests marcadors hagi estat negatiu ens indica una possible microdelecio en la regió estudiada. Per tal de determinar la mida i el tipus d'aquesta microdelecio, la mostra s'analitza amb sis STS addicionals: sY142, sY1258, sY1161, sY1197, sY1206 i sY1201. Els marcadors sY142 i sY1161 es coamplifiquen en la mateixa reacció de PCR, mentre que els quatre marcadors restants s'amplifiquen en reaccions independents.

Cada reacció de PCR consisteix en 25 µl de volum final i els següents components: 2,5 µl de tampó 10X (+Mg), 4 µl dNTPs, 2 µl de primer sentit a 10 pm/µl, 2 µl de primer antisentit a 10 pm/µl, 0,2 µl de Taq polimerasa, 1 µl de DNA genòmic; es completa fins a

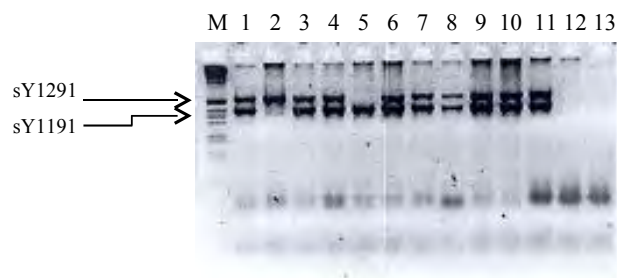


Figura 2 Fotografia d'un gel d'agarosa al 3% dels productes d'amplificació corresponents als STS sY1191 i sY1291. El carril M conté el marcador de pes molecular d'1 Kb. Els carrils 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9 i 10 corresponen a pacients sense cap microdelecio en la zona estudiada. El carril 2 correspon a un pacient amb l'sY1191 delecionat i el carril 5 a un pacient amb l'sY1291 delecionat. El carril 11 és el control positiu, el carril 12 és el control negatiu (DNA de dona) i el 13 és el blanc (aigua).

25 µl amb aigua destil·lada. (Quan es posa més d'una parella de primers es resta el volum afegit de més de l'aigua). Les condicions d'amplificació per a cadascun dels STS es detallen a la taula 1.

En tots els casos es realitzen trenta-cinc cicles d'amplificació amb una desnaturalització inicial a 95° C durant cinc minuts i una extensió final a 72° C durant deu minuts. Els productes de l'amplificació se separen en gels d'agarosa al 3 % tenyits amb bromur d'etidi i es visualitzen en un transil·luminador. Després es fa la fotografia (vegeu la figura 2).

RESULTATS

La taula 2 recull el resum dels resultats. S'han trobat dinou pacients amb la microdelecció gr/gr (4,73 %), 2 amb la b2/b3 (0,5 %), cap amb la microdelecció b1/b3 i un amb una nova microdelecció (sY1191 i sY1291 delecionats; 0,25 %) (vegeu la figura 3). Totes aquestes microdeleccions s'han trobat en el grup de pacients i no s'ha trobat cap microdelecció en el grup control. En total, vint-i-dos homes dels quatre-cents dos pacients amb un defecte espermatogènic (5,47 %) tenen microdeleccions en la regió AZFc.

DISCUSSIÓ

En aquest estudi s'analitzen les microdeleccions de la regió AZFc de quatre-cents dos pacients candidats per a ICSI. En total s'han trobat vint-i-dos pacients amb microdelecció dels quatre-cents dos pacients analitzats (5,47 %) mentre que no s'ha trobat cap microdelecció en el grup control ($n = 35$).

Pel que fa a la microdelecció gr/gr, és la més abundant en els pacients que presenten un defecte esperma-

togènic (De Llanos *et al.*, 2004). Aquesta microdelecció elimina més de la meitat de la regió AZFc, concretament, dues còpies de les quatre còpies existents del gen DAZ. Afecta unes 1,6 Mb (Repping *et al.*, 2003). En el grup control no s'ha trobat cap pacient amb aquesta microdelecció, cosa que concorda amb els resultats de Repping *et al.* (2003), ja que en un grup de cent quaranta-vuit homes amb espermatogènesi normal no van trobar cap microdelecció gr/gr. La freqüència de gr/gr que obtenim en els nostres pacients (4,73 %) és superior a la freqüència que obtenen Repping *et al.* (3,18 %; 15/471 en el cribratge inicial i 3,66 %; en l'estudi d'associació). La diferència entre freqüències pot ser deguda a diferències entre les poblacions estudiades o bé a diferències entre els tipus de pacients inclosos en els dos estudis. Els resultats obtinguts són consistents amb la idea que l'existència de microdeleccions en el cromosoma Y causa defectes espermatogènics greus, però la microdelecció gr/gr, com que elimina només dues còpies del gen DAZ, és només un factor de risc de defectes espermatogènics.

Només un 0,5 % de pacients estudiats presenten la microdelecció b2/b3. Aquesta microdelecció s'originaria a partir d'una inversió gr/rg i després tindria lloc una delecció entre els amplicons b2 i b3 (Repping *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2004). Elimina una regió de 1,8 Mb; per tant, la delecció és més gran que la delecció gr/gr.

La delecció b1/b3 no s'ha trobat en cap pacient. La seva freqüència és molt baixa i no s'ha trobat la relació que existeix entre la presència de la microdelecció i l'efecte a l'espermatogènesi, tot i que alguns autors (Hucklenbroich *et al.*, 2004) diuen que el seu paper seria irrellevant en aquest procés. No es pot, però, assegurar aquesta afirmació, ja que com que és tan poc freqüent resulta difícil establir una relació.

En el nostre estudi hem trobat un pacient que tenia delecionats els STS sY1191 i sY1291; per tant, no seria ni una microdelecció gr/gr (tindria el sY1191) ni una microdelecció b2/b3 (tindria l'sY1291), ni una microdelecció b1/b3 (no tindria ni l'sY1161 ni l'sY1197). En un estudi anterior (Hucklenbroich *et al.*, 2004) aquesta microdelecció també s'ha presentat. Es tracta d'una nova microdelecció que es desconeix com s'origina i quins efectes pot tenir a l'espermatogènesi. Per tant, resultarà interessant aprofundir en el seu possible mecanisme com a extensió del present treball.

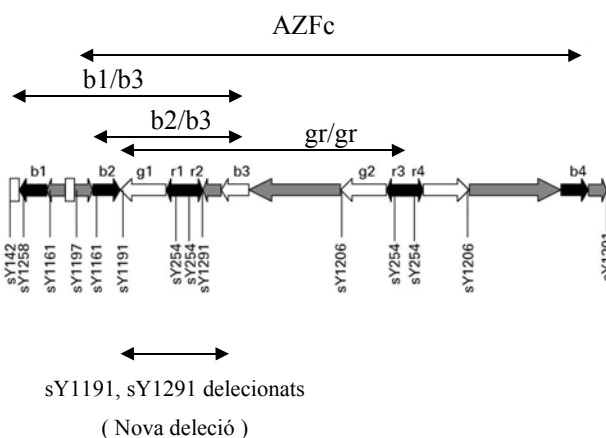


Figura 3 Esquema descriptiu de les diferents regions delecionades.

AGRAÏMENTS

Subvencionat amb projecte de recerca de la Generalitat de Catalunya (2001SGR00382), Ministerio de Ciencia y Tecnología (Plan Nacional de I+D, MC2003-03937)

Taula 1 Condicions de PCR per als vuit STS utilitzats en el cribratge de microdeleccions de la regió AZFc del cromosoma Y.

STS	Desnaturalització 94° C	Hibridació	Extensió 72° C
sY1191 + sY1291			
sY1258 sY1197 sY1201	1 min	1 min a 61° C	1 min
sY142 + sY1161	30 s	30 s a 64° C	30 s
sY1206	30 s	30 s a 60° C	30 s

Taula 2 Descripció de la mida de cada microdelecció, amb els STS que no han amplificat (-) i el nombre de pacients que presenten la delecció (n).

Tipus delecció n	142	1258	1161	1197	1161	1191	254	254	1291	1206	254	254	1206	1201
gr/gr	19	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
b1/b3	0	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
b2/b3	2	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Nova delecció	1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+

i Fondo de Investigaciones Sanitarias (V-2003-RED CO7A-0) a R. O.

BIBLIOGRAFIA

- FERNANDES, S.; PARACCHINI, S.; MEYER, L. H.; FLORIDIA, G.; TYLER-SMITH, C.; VOGT, P. H. (2004). «A large AZFc deletion removes DAZ3/DAZ4 and nearby genes from men in haplogroup N». *Am. J. Hum. Genet.*, 74:180-187.
- FORESTA, C.; MORO, E.; FERLIN, A. (2001). «Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis». *Endocr. Rev.*, 22:226-239.
- MORO, E.; FERLIN, A.; YEN, P. H.; FRANCHI, P. G.; PALKA, G.; FORESTA, C. (2000). «Male infertility caused by a de novo partial deletion of the DAZ cluster on the Y chromosome». *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85:4069-4073.
- OLIVA, R.; MARGARIT, E.; BALLESCA, J. L.; CARRIO, A.; SANCHEZ, A.; MILA, M.; JIMENEZ, L.; ALVAREZ-VIJAN, J. R.; BALLESTA, F. (1998). «Prevalence of Y chromosome microdeletions in oligospermic and azospermic candidates for intracytoplasmic sperm injection». *Fertil. Steril.*, 70:506-510.
- REPPING, S.; SKALETSKY, H.; BROWN, L.; VAN DAALLEN, S. K.; KORVER, C. M.; PYNTIKOVA, T.; KURODA-KAWAGUCHI, T.; DE VRIES, J. W.; OATES, R. D.; SILBER, S. [*et al.*](2003). «Polymorphism for a 1.6Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection». *Nat. Genet.*, 35:247-251.
- REPPING, S.; VAN DAALLEN, S. K.; KORVER, C. M.; BROWN, L.; MARSZALEK, J. D.; GIANOTTEN, J.; OATES, R. D.; SILBER, S.; VAN DER VEEN, F.; PAGE, D. C.; ROZEN, S. (2004). «A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azospermia factor c region». *Genomics.*, 83:1046-1052.
- SKALETSKY, H.; KURODA-KAWAGUCHI, T.; MINX, P. J.; CORDUM, H. S.; HILLIER, L.; BROWN, L. G.; REPPING, S.; PYNTIKOVA, T.; ALI, J.; BIERI, T. [*et al.*](2003). «The male specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes». *Nature*, 423:825-837.
- TYLER-SMITH, C.; MCVEAN, G. (2003). «The comings and goings of a Y polymorphism». *Nat. Genet.*, 35:201:202.
- YEN, P. (2001). «The fragility of fertility». *Nat. Genet.* 29:243-244.

ANÀLISI PROTEÒMICA D'ESPERMATOZOIDES DE PACIENTS ASTENOZOOSPÈRMICS I NORMOZOOSPÈRMICS

Juan Martínez,¹ Núria Torregrosa,¹ David Domínguez,¹ Josep M. Estanyol,⁴ Lourdes Mengual,³ Jose Luis Balleascà,² Rafael Oliva^{1*}

¹ Human Genetics Laboratory, Grup de Genètica Humana, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, IDIBAPS. Casanova, 143. 08036 Barcelona. Adreça electrònica: roliva@ub.edu. Tel. 934 021 877.

² Assisted Reproduction Unit, ICGON, Hospital Clínic, IDIBAPS. Adreça electrònica: balleasca@clinic.ub.es.

³ Laboratori de Biologia Molecular, Fundació Puigvert. Barcelona. Adreça electrònica: lmengual@fundacio-puigvert.es.

⁴ Unitat de Proteòmica, Facultat de Medicina, SCT-PCB-IDIBAPS. Adreça electrònica: jmestanyol@ub.edu.

Resum

En aquest estudi s'han utilitzat les tècniques proteòmiques per a identificar i determinar les variacions de proteïnes presents entre dos grups de pacients infèrtils, tretze normozoospermics i onze astenozoospermics. S'han realitzat gels en dues dimensions per a cada pacient, i ha resultat que les electroforesis bidimensionals detectaven prop d'un miler de proteïnes. No obstant això, només s'ha analitzat la possible variació en catorze proteïnes detectades en les electroforesis bidimensionals seleccionades per la seva constància en els vint-i-quatre individus analitzats. No s'ha trobat cap diferència substancial en la quantitat de proteïna entre el grup normozoospermic i el grup astenozoospermic. No obstant això, s'han identificat diverses proteïnes noves fins ara no descrites com a presents en l'espermatozoide humà. Aquest treball obre la possibilitat d'estudiar una quantitat més elevada de proteïnes, per tal de buscar diferències entre els diversos grups de pacients i d'aprofundir en la funció de les noves proteïnes identificades.

Paraules clau Proteòmica, espermatozoide, proteïnes, infertilitat.

Abstract

Proteomic analysis of spermatozoa from astenozoospermic or normozoospermic patients. In this work we have used the powerful present proteomics approach to identify proteins with quantitative variations between two groups of infertile patients, thirteen normozoospermics and eleven astenozoospermics. Two-dimensional gel electrophoresis of proteins have been performed on the sample corresponding to each patient. Subsequently, several proteins have been identified by mass spectrometry. The results indicate that about a thousand proteins can be detected. However, we have focussed our initial analysis in only fourteen of the proteins selected because of its constancy in all of the twenty-four samples analysed. No substantial differences among the protein levels was found between the normozoospermic and the astenozoospermic groups. Nevertheless, several novel proteins have been identified in the spermatozoa. This work opens the possibility to study a higher number of proteins and to study the function of novel proteins identified.

Key words Proteomics, spermatozoa, protein, infertility.

INTRODUCCIÓ

La infertilitat és un problema que afecta aproximadament el 10-15 % de les parelles en edat reproductiva, i aproximadament la meitat dels casos són deguts a factors masculins (Oliva i Ballejà, 1999). L'OMS ha establert una sèrie de paràmetres seminals per a diferenciar entre mostres normals i patològiques (OMS, 1999). No obstant això, aquests paràmetres són fonamentalment de tipus morfològic i no expliquen els casos d'infertilitat idiopàtica. Per exemple, la causa de la infertilitat en la majoria de pacients normozoospermics continua sent desconeguda. És molt probable que una proporció important sigui deguda a mutacions recessives (Lilford *et al.*, 2001) que poden provocar alteracions en les proteïnes, alteracions que avui dia són susceptibles de ser trobades. Per exemple, en treballs previs hem demostrat la presència d'una baixada o absència de protamina P2 en espermatozoides de pacients infèrtils (de Yebra *et al.*, 1993, 1998). Però la P2 només és una dels milers de proteïnes presents en l'espermatozoide humà (Oliva i Dixon, 1991). És previsible que variacions en multitud de proteïnes addicionals puguin explicar bona part de les infertilitats masculines actualment d'etiologia desconeguda.

El present estudi aborda aquesta situació explotant la capacitat de les eines actuals de la proteòmica. Les tècniques de proteòmica permeten obtenir un gran volum d'informació a partir de quantitats molt minses de mostres biològiques. Nosaltres ens hem centrat inicialment en dos grups de pacients, els astenozoospermics (mobilitat reduïda) i els normozoospermics (tots els valors normals), per intentar trobar resultats diferencials entre els dos. Metodològicament, s'han utilitzat les tècniques d'electroforesi bidimensional (l'isoelectroenfocament i la 2D-SDS-PAGE) seguides de l'anàlisi informàtica amb el programa PDQuest (Bio-Rad) i la posterior identificació de les proteïnes mitjançant el MALDI-TOF.

MATERIAL I MÈTODES

Es van obtenir les mostres de semen de vint-i-quatre pacients de la Unitat de Reproducció Assistida de l'Hospital Clínic de Barcelona, amb consentiment previ informat d'aquests. Les mostres van ser processades segons el mètode descrit per Pixton *et al.* (2004) amb variacions. Les mostres se separen inicialment en un gradient de Percoll del 50 % per a separar els espermatozoides dels altres tipus de cèl·lules presents a la mostra (Mengual, 2003). El sediment aconseguit es resuspèn amb el medi de lisi descrit per Pixton *et al.* (2004), perquè quedi a

una concentració de 230×10^6 espermatozoides/ml (concentració òptima determinada empíricament al nostre laboratori). La lisi s'aconsegueix incubant les mostres una hora a temperatura ambient en agitació.

Una vegada lisades les mostres es procedeix a la separació electroforètica. La primera dimensió es realitza amb l'IPGPhor de BioRad Laboratories, Inc. (EUA), en unes tires de pH 5-8 i una llargada de 17 cm. Les condicions de voltatge i temps són les recomanades per BioRad (BioRad, 2004). La segona dimensió es realitza en un sistema Protean II, amb gels fabricats al mateix laboratori (concentració d'acrilamida del 12 %). Les condicions d'electroforesi són 300 V durant 2.45 h. La tinció dels gels es realitza amb tinció argèntica (Blum *et al.*, 1987).

Els gels tenyits s'escanegen a alta resolució amb un sistema GS800. Les imatges es guarden en el format requerit pel programa PDQuest i l'anàlisi posterior es fa amb aquest mateix programa. Els punts interessants són picats manualment i enviats a la Unitat de Proteòmica del campus Casanova de la Plataforma de Proteòmica SCT-PCB-IDIBAPS (Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona). Allà les mostres són processades per a la identificació per masses (sistema MALDI-TOF).

RESULTATS

S'han estudiat un total de vint-i-quatre pacients, dividits en normozoospermics (tretze) i astenozoospermics (onze). Els vint-i-quatre gels resultants han rebut el mateix tractament, amb les mateixes condicions en tot el procediment. A la figura 1 es mostra un exemple d'un dels gels bidimensionals analitzats.

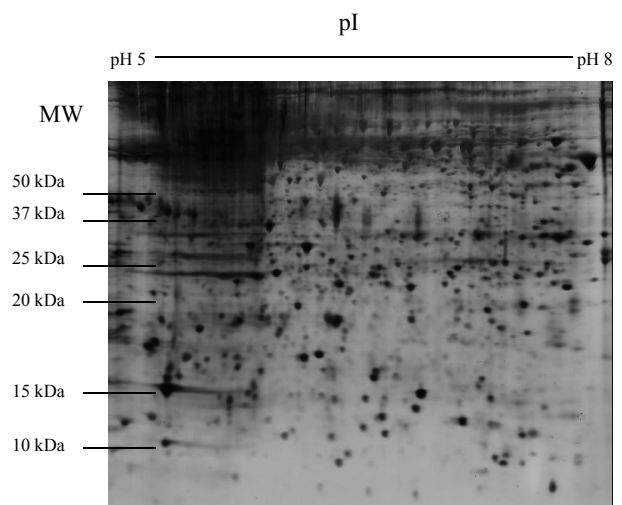


Figura 1 Exemple de gel realitzat al nostre laboratori.

Atesa la complexitat d'una cèl·lula sencera, en aquest treball ens hem centrat només en una fracció de tota la informació que es pot obtenir d'un gel bidimensional. S'han seleccionat un total de seixanta-dos punts del miler aproximat que el programa permet detectar. D'aquests seixanta-dos, s'ha mirat la possible variació entre grups de només catorze dels punts. Aquests catorze punts s'han seleccionat per la seva facilitat a l'hora de ser reconeguts entre els diferents gels. Els valors normalitzats s'obtenen d'aplicar la següent fórmula: Valor normalitzat = valor sense normalitzar × factor d'escala / factor de normalització.

El factor de normalització en aquest cas ha estat la quantitat total en tots els punts. La normalització s'ha fet respecte als seixanta-dos punts, per reduir l'efecte de l'absència d'un punt respecte de la resta. Els resultats es presenten a la figura 2.

DISCUSSIÓ

L'anàlisi de la mitjana i la desviació estàndard dels valors normalitzats de les proteïnes marcades com a *a* fins a *n* (vegeu la figura 2) revela que no hi ha diferències substancials entre els dos grups respecte a aquestes proteïnes. L'elevada desviació estàndard que trobem també ens indica que hi ha molta variació

entre mostres diferents i que, possiblement, aquesta heterogeneïtat suggereix que no hi ha un únic factor majoritari d'infertilitat, sinó possiblement molts factors diferents.

Una possible explicació a la detecció de l'elevada uniformitat entre grups és que l'elecció dels punts no ha estat arbitrària, sinó que, per tal de facilitar l'anàlisi, s'han estudiat punts fàcilment reconeixibles i presents en totes les bidimensionals. La presència confirmada de tots els punts en tots els gels estudiats podria explicar la poca variació entre grups que trobem. També podria ser un indicador que aquests punts corresponen a proteïnes amb una funció important en l'espermatozoide, i per això es troben valors tan conservats. Queda ara oberta la porta a analitzar un major nombre de punts i de grups de pacients, i a aprofundir en les funcions de les noves proteïnes identificades.

AGRAÏMENTS

Subvencionat amb projecte de recerca de la Generalitat de Catalunya (2001SGR00382), Ministeri de Ciència i Tecnologia (Plan Nacional de I+D BMC2003-03937) i Fondo de Investigaciones Sanitarias (V-2003-RED CO7A-0) a R. O.; N. T. i D. D. estan subvencionats amb una beca de l'IDIBAPS.

BIBLIOGRAFIA

- BIO RAD (2004). *2D electrophoresis for proteomics. A methods and product manual*. www.bio-rad.com.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. (1987). «Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels». *Electrophoresis*, 8:93-99.
- DE YEBRA, L.; BALLESCA, J. L.; VANRELL, J. A.; BASSAS, L.; OLIVA, R. (1993). «Complete selective absence of protamine P2 in humans». *J. Biol. Chem.*, 268:10 553-10 557.
- DE YEBRA, L.; BALLESCA, J. L.; VANRELL, J. A.; CORZETT, M.; BALHORN, R.; OLIVA, R. (1998). «Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels». *Fertil. Steril.*, 69:755-759.
- LILFORD, R.; JONES, A. M.; BISHOP, T. D.; *et al.* (1994). «Case-control study of whether subfertility in men is familial». *Br. Med. J.*, 309:570-573.
- MENGUAL, L. (2003). *Infertilitat masculina: causes, factors de risc genètic i caracterització molecular dels espermatozoides*. Tesi Doctoral.
- OLIVA, R.; BALLESCÀ, J. L. (1999). *Valoración genética de la pareja estéril o infértil*. Madrid: Asociación Española de Andrología.
- OLIVA, R.; DIXON, G. H. (1991). «Protamine genes and the histone to protamine replacement reaction». *Progress in*

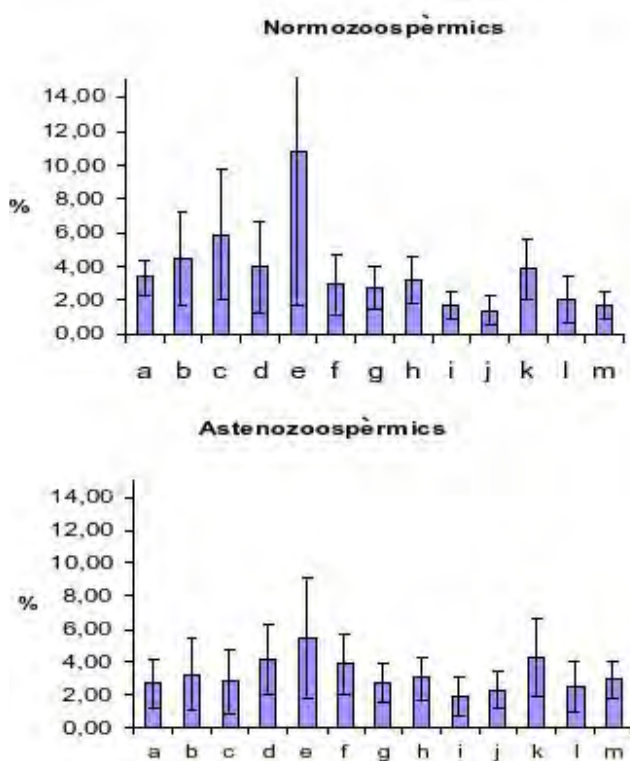


Figura 2 Mitjanes de les diferents proteïnes.

- Nucleic Acids Research and Molecular Biology*, 40:25-94.
- ORGANITZACIÓ MUNDIAL DE LA SALUT (1999). *WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction*. Cambridge: Cambridge University Press, 4a ed.
- PIXTON, K. L.; DEEKS, E. D.; FLESCHE, F. M.; MOSELEY, F. L.; BJORNDAL, L.; ASHTON, P. R.; BARRATT, C. L.; BREWIS, I. A. (2004). «Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: case report». *Hum. Reprod.*, 19(6):1438-1447.

DETECCIÓ DE PRECURSORS DE LA PROTAMINA P2 EN CÈL·LULES D'ESPERMATOZOIDES DE PACIENTS INFÈRTILS

Núria Torregrosa,¹ Juan Martínez,¹ José Luis Ballejà,² Marvin Meistrich,³ Rafael Oliva^{1*}

¹ Laboratori de Genètica Humana, Grup de Genètica Humana. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona, IDIBAPS. Casanova, 143. 08036 Barcelona. Adreça electrònica: roliva@ub.edu.

² Unitat de Reproducció Assistida, ICGON. Hospital Clínic, IDIBAPS. Barcelona.

³ Departament of Experimental Radiation Oncology. The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center. Houston, Texas 77030, EUA.

Resum

Estudis previs demostren que en els espermatozoides de determinats pacients infèrtils hi ha una disminució en els nivells de protamina P2. També, s'ha observat, utilitzant anticossos contra la protamina P2, que aquesta disminució podria ser deguda a una manca de processament provada a través de l'augment en els nivells de precursors de P2 (preP2). L'objectiu de l'actual projecte és detectar i confirmar la presència de precursors de protamina P2 en espermatozoides humans utilitzant un anticòs específic per a la part precursora de la protamina P2 del ratolí. Els resultats assolits en l'anàlisi per *Western blot* indiquen la presència de precursor de la P2 en dues mostres de testicles humans. A més, en les anàlisis per *Western blot* de les mostres de proteïnes aïllades d'espermatozoides de diferents ejaculacions es detecten bandes amb diferents mobilitats relatives en moltes de les mostres i aquest senyal varia en les diferents mostres d'ejaculació humana. Aquests resultats suggereixen que l'anticòs reconeix els precursors de la protamina P2 humana i que hi ha diferents nivells d'aquest en les diverses mostres. S'obre, per tant, la possibilitat d'analitzar mostres addicionals i de detectar la presència de precursors de la protamina P2 a través d'immunocitoquímica.

Paraules clau Infertilitat, protamina P2, precursor de la protamina P2 (preP2), *Western blot*, anticòs.

Abstract

Detection of protamine P2 precursors in the spermatozoa of infertile patients. Previous studies have reported decreased protamine 2 levels in the sperm cells of infertile patients. Subsequently, using anti protamine P2 antibodies, evidence has been presented that patients with a decreased amount of P2 may have increased levels of P2 precursors (preP2). We have initiated a project to detect and confirm the presence of protamine P2 precursors using an antibody specific for the precursor part of the mouse protamine P2. Western analysis indicates the presence of potentially specific signals in samples from two human testis. Furthermore, Western analysis of protein samples isolated from human sperm from infertile patients also indicate the presence of bands with different mobility in many of the samples. There are also marked differences in the signal detected in the different human sperm samples. These results suggests that the antibody is recognising human P2 precursors and that different levels of P2 precursors are presents in different human sperm samples. The possibility is now open to analyse additional samples and to detect the presence of P2 precursors through immunocytochemistry.

Key words Infertility, protamine P2, P2 precursor (preP2), Western blot, antibody.

INTRODUCCIÓ

El reemplaçament, pràcticament complet, de les histones del nucli de l'espermatozoide per les protamines té lloc en la majoria de vertebrats mitjançant un pro-

cés d'elevada complexitat (Subirana, 1985; Poccia, 1986; Mezquita *et al.*, 1985; Oliva i Dixon, 1991). Les protamines estan presents en totes les espècies de mamífers (Oliva i Dixon, 1991). En alguns mamífers (com ara la rata, el ratolí o l'home) s'ha descrit que

l'organització inicialment nucleosòmica és reemplaçada per un conjunt de proteïnes de transició (TP1 i TP2) i posteriorment per la formació de complexos de nucleoprotamina que originen una cromatina altament condensada (Dadoune, 1995).

Les protamines són proteïnes molt carregades positivament a causa de l'elevada quantitat d'arginines que contenen; en humans se'n coneixen dues formes: la protamina 1 (P1) i la protamina 2 (P2), en una raó normalment regulada i aproximada d'1/1 (Corzett *et al.*, 2002). Diversos estudis han demostrat la correlació entre una raó anormal de P1/P2 i la infertilitat masculina (Chevaillier *et al.*, 1987; Balhorn *et al.*, 1988; de Yebra *et al.*, 1993, 1998; Carrell i Liu, 2001; Aoki *et al.*, 2005). Específicament s'ha vist una reducció en el contingut de la protamina P2 en alguns pacients infèrtils i un augment del seu precursor (de Yebra *et al.*, 1998). També s'ha observat un augment en la quantitat de precursor de la P2 en ratolí *knock out* per a les proteïnes de transició (Tnp1 i Tnp2) (Zhao, *et al.*, 2004).

En aquest estudi ens hem proposat analitzar la quantitat de precursor de protamina P2 en espermatozoides humans i determinar la possible correlació de variacions en els seus nivells amb problemes d'infertilitat masculina.

MATERIAL I MÈTODES

Preparació de les mostres i extracció de protamines

L'extracció de proteïnes nuclears de testicle es va fer tal i com està descrit a partir de testicle congelat homogeneïtzat (de Yebra, 1995). El mètode d'extracció de proteïnes nuclears dels espermatozoides d'ejaculació dels pacients infèrtils es va fer a partir de mostres fresques. Es va partir d'un volum d'ejaculació de cada mostra corresponent aproximadament a 14×10^6 espermatozoides i es va rentar amb Ham F10 1X dues vegades. Seguidament el sediment es va rentar amb Tritó X-100, Tris 1M pH 8, 1 M de $MgCl_2$, i finalment un rentat amb H_2O amb PMSF 1 mM. Es continuà amb el protocol descrit (de Yebra, 1995).

Separació i anàlisi de proteïnes

La separació de les proteïnes es va dur a terme mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida àcid (de Yebra *et al.*, 1998). Els gels van ser tenyits amb blau de Comassie o transferits (75 V, una hora) a membranes Immobilon-P (Millipore) tal i com està descrit (de Yebra *et al.*, 1998). Una vegada hibridades les membranes amb l'anticòs anti-preP2 i després de detectar

el senyal per *Western blot* (vegeu més avall), van ser tenyides amb vermell de Ponceau (BioRad) per tal de detectar la quantitat total de proteïna transferida a la membrana.

Immunotinció Western blot

Les membranes van ser bloquejades amb solució 1 (1XTBS-0,1 % Tween 20) + llet desnatada al 5 % durant una hora a temperatura ambient i agitació constant i després rentades amb solució 1 tres vegades. A continuació les membranes van ser incubades amb anticòs primari contra el precursor de la P2 (Zhao *et al.*, 2004) O/N a 4° C a dilució 1:5000 o 1:2000. Es prosseguí amb tres rentats en solució 1 + 5 % de llet desnatada. S'hibridà amb anticòs secundari (ECLTM, Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody from Donkey; Amersham Biosciences) durant una hora a temperatura ambient i es revelà mitjançant el substrat de la peroxidasa (ECLTM, Western Blotting Analysis System Amersham Biosciences).

RESULTATS

L'anàlisi *Western* de proteïnes de testicle de ratolí, control positiu, i una mostra de protamines humanes aïllades d'espermatozoides hibridat amb l'anticòs anti-preP2 demostren la presència de senyal en els dos casos (vegeu la figura 1).

L'anàlisi *Western* de set mostres de testicle humà amb anticòs contra el precursor de la protamina P2

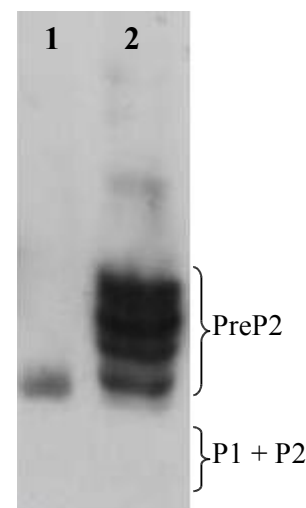


Figura 1 Anàlisi *Western* hibridat amb l'anticòs contra el precursor de la protamina P2 (preP2). Carril 1: protamines humanes aïllades de nuclis d'espermatozoides. Carril 2: extracció de proteïnes de testicle de ratolí, control positiu.

va detectar senyal a dos dels testicles corresponents a individus de disset i quaranta-tres anys, respectivament (no mostrat). La resta de mostres sense senyal corresponen a pacients d'edats més avançades, entre cinquanta-cinc i vuitanta-quatre anys, que van requerir una orquiectomia per càncer de pròstata.

Respecte a les mostres d'ejaculació, també es van observar possibles precursors de la protamina P2 en diferents quantitats i mobilitat electroforètica en les diferents mostres analitzades (vegeu la figura 2, carrils 1-6 i la figura 3). A més, també es va observar que la mobilitat relativa electroforètica dels precursors variava a les mostres de testicle respecte del senyal obtingut a partir de proteïnes d'espermatozoides de l'ejaculació.

DISCUSSIÓ

La detecció de senyal amb l'anticòs anti protamina P2 de ratolí en mostres de testicle de ratolí, de proteïnes humanes aïllades de nuclis d'espermatozoides (vegeu la figura 1) i de proteïnes extreïdes de testicle humà (vegeu la figura 2, carril 8) indiquen que l'anticòs de ratolí reconeix també les protamines humanes, malgrat que té tres aminoàcids diferents. Tot i així, en cinc de les mostres de teixit testicular no s'han detectat precursors. L'edat avançada d'aquests cinc pacients podria ser la raó per la qual no ha estat possible detectar evidència d'aquests precursors possiblement ja processats.

La disminució en la mobilitat de precursors de la

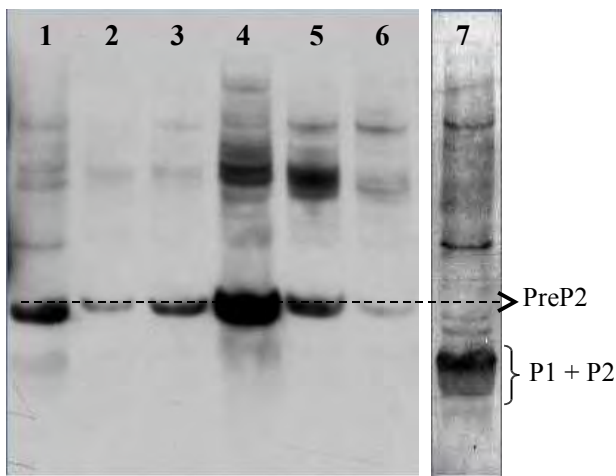


Figura 2 Carrils 1-6: anàlisi *Western* hibridat amb l'anticòs contra el precursor de la protamina P2 (preP2) de sis mostres independents de proteïnes aïllades de nuclis d'espermatozoides de diferents mostres d'ejaculació de pacients infèrtils. Carril 7: membrana tenyida amb vermell de Ponceau amb el total de proteïnes de la mostra corresponent al carril 2.

protamina P2 en el teixit testicular respecte als precursors de la P2 presents en espermatozoides seria deguda a un inferior processament del precursor de manera que tindria una major grandària i, per tant, menys mobilitat electroforètica.

A la figura 3 es poden observar grans diferències en el senyal de *Western* en dues de les mostres analitzades. En el carril 1 es detecta precursor, mentre que a la mostra del carril 2 no hi ha cap senyal. Al tenyir la membrana amb vermell de Ponceau (carrils 3 i 4), es detecta el total de proteïna de cada carril i s'observa que el carril 3 té bandes amb menys mobilitat electroforètica que les formes madures de les protamines P1 i P2, mentre a la mostra del carril 4 la majoria de bandes corresponen a protamines madures. Així, sembla que a la mostra de l'esquerra (figura 3, carril 1), menys processada, el precursor de la protamina P2 pot ser detectat mitjançant l'anàlisi *Western* a diferència de la mostra de la dreta (carril 2) que no tindria precursors, ja que s'han processat i, per tant, s'han obtingut formes madures de la protamina P2 que s'observen al carril 4.

Respecte a les bandes detectades per l'anàlisi *Western*, amb menys mobilitat electroforètica, podrien detectar diferents grups de precursors de les protamines

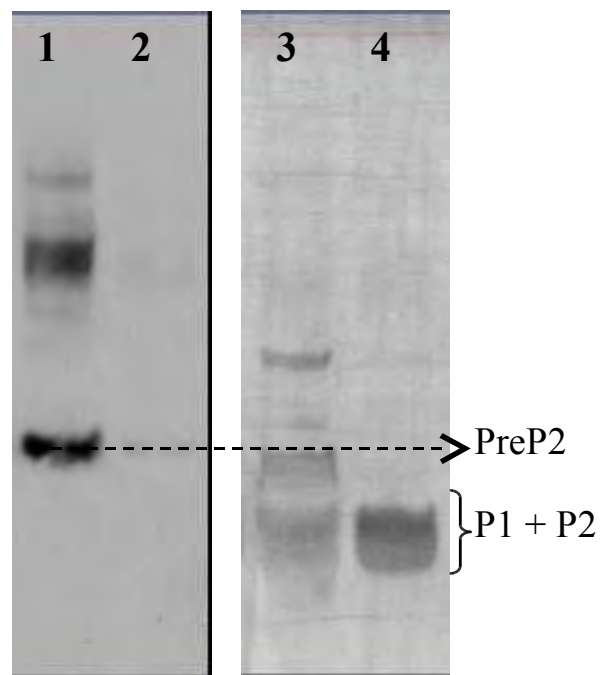


Figura 3 Carrils 1 i 2: anàlisi *Western* hibridat amb l'anticòs contra el precursor de la protamina P2 (preP2) de dues mostres independents de proteïnes aïllades de nuclis d'espermatozoides de dos pacients infèrtils. Carrils 3 i 4: membrana tenyida amb vermell de Ponceau amb el total de proteïnes de les mostres corresponents als carrils 1 i 2, respectivament.

P2 o ser unions inespecífiques, de manera que és necessari estudiar-ho més detalladament.

Tot i que aquest treball és preliminar, els resultats assolits reafirmen que determinats pacients infèrtils presenten menys processament del precursor de la protamina P2, que esdevé en una producció inferior de protamina P2 (de Yebra *et al.*, 1998). En propers experiments s'analitzaran els precursors de la protamina de diferents mostres addicionals d'ejaculacions de pacients infèrtils i s'intentarà correlacionar problemes d'infertilitat amb l'existència de precursors de la protamina P2 no processats. Així doncs, en aquest treball s'ha obert la possibilitat d'analitzar mostres addicionals i, a més, de detectar la presència de precursors de la protamina P2 a través d'immunocitoquímica.

AGRAÏMENTS

Subvencionat amb projectes de recerca de la Generalitat de Catalunya (2001SGR00382), Ministerio de Ciencia y Tecnología (Plan Nacional de I+D) BMC2003-03937 i Fondo de Investigaciones Sanitarias (V-2003-RED CO7A-0) a R. O. N. T. està subvencionada amb una Beca de l'IDIBAPS.

BIBLIOGRAFIA

- AOKI, V. W.; LIU, L.; CARREL, D. T. (2005). «Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males». *Hum. Reprod.* [Advance Access published February 10]
- BALHORN, R.; REED, S.; TANPHAICHITR, N. (1988). «Aberant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males». *Experientia*, 44:52-55.
- CARRELL, D. T.; LIU, L. (2001). «Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis». *J. Androl.*, 22:604-610.
- CHEVAILLIER, P.; MAURO, N.; FENEUS, D.; JOUANNET, P.; DAVID, G. (1987). «Anomalous protein complement of sperm nuclei in some infertile men». *Lancet.*, 2:806-807.
- CORZETT, M.; MAZRIMAS, J.; BALHORN, R. (2002). «Protamine 1:protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals». *Mol. Reprod. Dev.*, 61:519-527.
- DADOUNE, J. P. (1995). «The nuclear status of human sperm cells». *Micron.*, 26:323-345.
- DE YEBRA, M. (1995). *Alteracions del contingut de nucleoproteïnes de les cèl·lules espermàtiques. Relació amb la infertilitat en l'home*. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.
- DE YEBRA, L. L.; BALLESCÀ, J. L.; VANRELL, J. A.; BASSAS, L. L.; OLIVA, R. (1993). «Complete selective absence of protamine P2 in humans». *J. Biol. Chem.*, 268:10553-10557.
- DE YEBRA, L. L.; BALLESCÀ, J. L.; VANRELL, J. A.; CORZETT, M.; BALHORN, R.; OLIVA, R. (1998). «Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels». *Fertil. Steril.*, 69:755-759.
- MEZQUITA, C. (1985). «Chromatin proteins and chromatin structure in spermatogenesis». Dins: REEK, G. R.; GOODWIN, G. H.; PUIGDOMENECH, P. *Chromosomal Proteins and Gene Expression*. Nova York: Plenum Press, p. 315-332.
- OLIVA, R.; DIXON, G. H. (1991). «Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction». *Prot. nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 40:25-94.
- POCCIA, D. (1996). «Remodelling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early development». *International Review of Cytology*, 105:1-65
- SUBIRANA, J. A. (1982). «Nuclear proteins in spermatozoa and their interactions with DNA». Dins: ANDRÉ, J. *The Sperm Cell*. L'Haia: Martinus Nijhoff, p. 197-213.
- ZHAO, M.; SHIRLEY, C. R.; HAYASHI, S.; MARCON, L.; MOHAPATRA, B.; SUGANUMA, R.; BEHRINGER, R. R.; BOISSONNEAULT, G.; YANAGIMACHI, R.; MEISTRICH, M. L. (2004). «Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development». *Genesis*, 38:200-213.

ESTANDARDITZACIÓ DE LA TÈCNICA DE TUNEL EN ESPERMATOZOIDES. ANÀLISI DE FACTORS QUE PUGUIN PROVOCAR VARIACIONS EN ELS RESULTATS

David Domínguez,¹ María Isabel Camejo,² José Luís Ballecà,³ Cristóbal Mezquita,⁴ Rafael Oliva ^{1*}

¹ Laboratori de Genètica Humana. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona.

Casanova, 143. 08036 Barcelona. Tel. 934 021 877. Fax 934 035 260. Adreça electrònica: oliva@medicina.ub.es.

² Departamento de Biología de Organismos. Universidad Simón Bolívar.

Baruta, Estado Miranda. Venezuela. Tel. 58-212-9063077. Adreça electrònica: mcamejo@usb.ve.

³ Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia. Hospital Clínic de Barcelona.

Villarroel, 170. 08036 Barcelona. Tel. 932 279 763. Adreça electrònica: balleca@clinic.ub.es.

⁴ Laboratori de Genètica Molecular. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona.

Casanova, 143. 08036 Barcelona.

Resum

S'ha descrit una associació entre la fragmentació al DNA dels espermatozoides i la incidència de fracàs reproductiu. Actualment, l'anàlisi rutinària del semen en els laboratoris de reproducció assistida inclou paràmetres com el recompte, mobilitat o morfologia dels espermatozoides, però no l'anàlisi de la integritat del DNA. Un dels mètodes per a l'anàlisi de la integritat del DNA és el TUNEL. L'objectiu del treball ha estat estandarditzar si existeixen diferències entre el nombre d'espermatozoides positius per TUNEL en les següents condicions: *a*) avaluació per microscopia òptica o per citometria de flux, *b*) forma de seleccionar per citometria de flux la població d'espermatozoides, *c*) depenent del moment d'avaluació i forma de conservació de la mostra. Es va observar una correlació positiva entre els valors d'espermatozoides TUNEL positiu en ser avaluats per microscòpia de fluorescència i per citometria de flux. Quant a l'efecte sobre el percentatge d'espermatozoides TUNEL positiu després del procés de refrigeració a 4° C i congelació a -20° C es va observar que ambdós processos augmentaren de forma important la fragmentació del DNA. Els resultats d'aquest treball demostren la necessitat d'estandarditzar la tècnica TUNEL en espermatozoides, tant per a recerca com per a l'anàlisi de rutina dins dels laboratoris de reproducció assistida.

Paraules clau TUNEL, espermatozoides, citometria de flux, fragmentació DNA, infertilitat.

Abstract

TUNEL assay standardization in spermatozoa. Analysis of factors that may result in variation in the results.

An association between DNA fragmentation in the spermatozoa and incidence of reproductive failure has been described. At present the routine analysis of semen samples in assisted reproduction laboratories includes parameters such as count, mobility and morphology, but not analysis of the integrity of DNA. One of the methods to analyze DNA integrity is TUNEL. The objective of the present work is to standardize if there are differences in the number of TUNEL positive spermatozoa depending on the following conditions: 1. evaluation by optical microscopy or by cytometry, 2. procedure to select the population of spermatozoa in the analysis by cytometry, 3. timing of determinations and procedure to preserve samples. A positive correlation has been detected in the TUNEL results derived from cytometry or microscopy. The percentage of TUNEL positive spermatozoa increases substantially upon maintenance of the samples at 4° C or -20°C. The results from this work indicate the importance to standardize TUNEL assays either for research purposes or towards the routine analysis in assisted reproduction laboratories.

Key words TUNEL assay, spermatozoa, flow cytometry, DNA fragmentation, infertility.

INTRODUCCIÓ

En els últims anys han tingut lloc avenços molt importants en les tècniques de reproducció assistida per a ajudar les parelles amb problemes d'infertilitat. La utilització de tècniques com la injecció intracitoplasmàtica de l'espermatozoide (ICSI) han suposat un gran avenç en aquest sentit. No obstant això, en aquesta tècnica se selecciona l'espermatozoide d'acord amb la seva morfologia i motilitat però sense conèixer la seva qualitat biològica. És a dir, amb aquesta tècnica, s'eludeixen molts dels processos naturals de selecció de l'espermatozoide.

La selecció basada en morfologia i motilitat tampoc no té en compte la composició proteica o la integritat en el nucli de l'espermatozoide. L'espermatogènesi és un procés en què tenen lloc grans canvis en la composició de la cromatina (Mezquita, 1985; Roca i Mezquita, 1989; Oliva i Dixon, 1991). Alteracions en els nivells de protamina P2 s'han descrit en diversos pacients infèrtils (Balhorn, 1988; de Yebra, 1993). Els mecanismes implicats en el manteniment de la integritat en el genoma i la seva correlació amb els canvis de composició dels espermatozoides humans tampoc no són del tot coneguts.

A més s'ha observat que hi ha una associació entre la fragmentació al DNA dels espermatozoides i una major incidència de fracàs en la fertilització. També s'especula que podria produir danys al fetus i càncer en nounats (Fraga *et al.*, 1996; Ji *et al.*, 1997; Sorahan *et al.*, 1997). Per això es fa necessari el desenvolupament de noves tècniques que consideren altres paràmetres no avaluats en l'espermatograma convencional, com és el dany al DNA.

Existeixen diferents metodologies per a avaluar el dany al DNA. Una de les més àmpliament estudiades és la tècnica del TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT]-mediated dUTP [deoxyuridine triphosphate] nick end labeling*), que avalua la fragmentació del DNA, en ser capaços els dUTP marcats d'unir-se als trencaments del fil de DNA gràcies a la presència de l'enzim TdT. S'ha tractat de considerar el test de TUNEL com una mesura de la qualitat del semen en els laboratoris de reproducció assistida (Oosterhuis *et al.*, 2000). Per això seria primer necessari l'estandardització de la tècnica perquè els resultats siguin comparables entre els diferents laboratoris.

Entre els aspectes a estandarditzar es troba determinar si existeixen diferències entre el nombre d'espermatozoides positius per TUNEL en les següents condicions: *a)* depenent si la mostra s'avalua per microscopia òptica o per citometria de flux, *b)* forma de seleccionar per citometria de flux la població d'espermatozoides que serà avaluada, per exemple, per forma

(SSC) i mida (FSC) o per positivitats per iodur de propidi (IP), *c)* depenent del moment d'avaluació de la mostra: immediata o conservació en la fase de permeabilització de la tècnica de TUNEL a 4° C i -20° C. En aquest treball es presenten els resultats de l'avaluació de les mostres per TUNEL en les condicions anteriorment presentades.

MATERIALS I MÈTODES

Recollida i preparació de les mostres

Un total de quinze mostres de semen van ser recollides de l'Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia de l'Hospital Clínic de Barcelona. Les mostres de semen van ser recollides després d'almenys una abstinència sexual de quaranta-vuit hores. Després de trenta minuts de líquüefacció les mostres es preparen per a poder ser avaluades per la tècnica de TUNEL.

Assaig de TUNEL

Una quantitat de semen equivalent a $7,5 \times 10^6$ espermatozoides van ser rentats per centrifugació dues vegades a 800 g durant cinc minuts amb PBS/BSA 1 % per a cadascuna de les condicions a avaluar. Un cop fets els rentats, els espermatozoides van ser fixats en paraformaldehid al 4 % en PBS, pH 7,4 durant una hora en agitació a temperatura ambient. Posteriorment es van realitzar dos rentats per centrifugació amb PBS/BSA 1 % i van ser permeabilitzats amb una solució 0,1 % Triton X-100 en 0,1 % de citrat de sodi durant dos minuts en gel. Les mostres van tornar a rentar-se i van ser repartides en tres alíquotes: *a)* alíquota que es continua processant pel mètode del TUNEL, *b)* alíquota resuspensa en 300 µl d'etanol al 70 % i conservada a 4° C per la seva posterior anàlisi a la setmana vinent, *c)* alíquota resuspensa en 300 µl d'etanol al 70 % i conservada a -20° C per a la seva anàlisi posterior la setmana vinent prèvia descongelació i rentada amb PBS/BSA 1 %.

Totes les mostres i el control positiu van ser incubats durant una hora a 37° C i en obscuritat amb 50 µl de solució de marcatge (es va realitzar un control negatiu sense l'enzim TdT) seguint les instruccions del *kit* comercial (In Situ Death Detection Kit AP (TUNEL kit; Roche Diagnostic Corp. Indianapolis, IN, EUA). Després del marcatge es van realitzar dos rentats i els espermatozoides van ser resuspesos en 500 µl de PBS per a la seva anàlisi posterior per microscòpia òptica i citometria de flux.

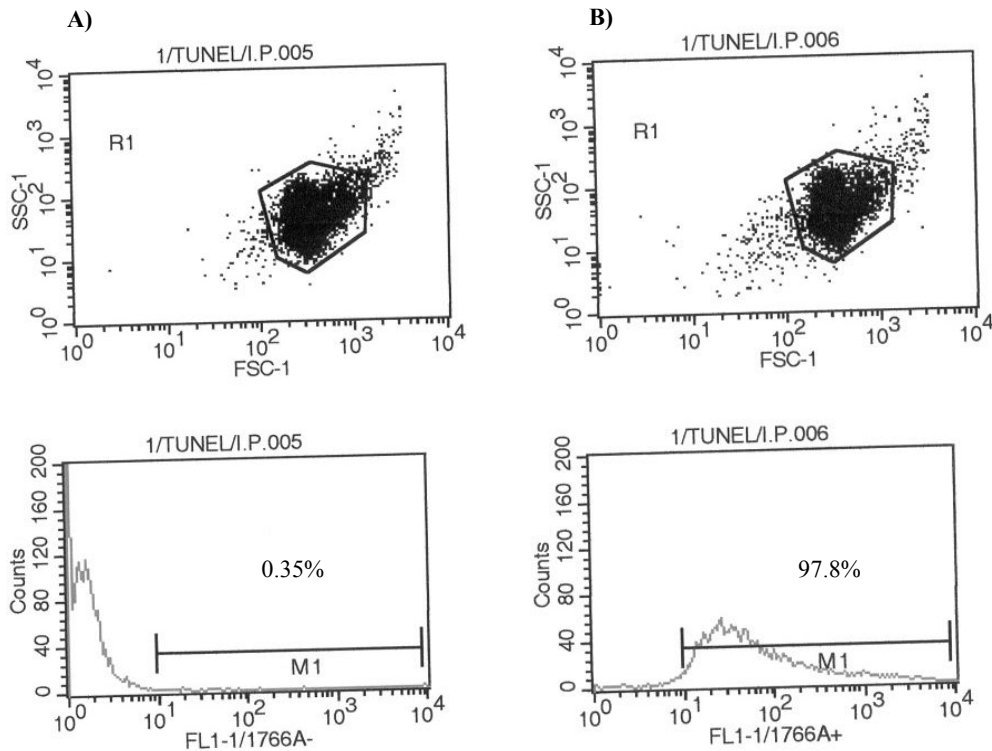


Figura 1 Representació gràfica per citometria de flux del percentatge d'espermatozoides TUNEL positius: a) control negatiu i b) control positiu.

Citometria de flux i microscòpia de fluorescència

La determinació del percentatge d'espermatozoides TUNEL positius per microscòpia òptica va ser realitzada per dos observadors, i posteriorment es va fer la mitjana. Es van comptar un mínim de dos-cents espermatozoides en contrast de fase i es va observar quin percentatge presentaven fluorescència verda forta al filtre *wide interference blue* (WIB).

Per a l'avaluació per citometria de flux es van acumular un mínim de deu mil esdeveniments per a cada mesura al citòmetre de flux (FACS Calibur; Becton Dickinson) amb un flux d'aproximadament dos-cents esdeveniments. Les dades van ser processades amb el programari analític CELLQUEST (Becton Dickinson).

RESULTATS

A la figura 1 es poden observar els resultats dels controls positiu i negatiu per a la tècnica de TUNEL per citometria de flux seleccionant la població a avaluar per forma i mida (SSC/FSC). El control positiu (figura 1b) va ser tractat amb DNAsa I. La figura 2 presenta els resultats de dues mostres de semen; una amb baixa po-

sitivitat de espermatozoides TUNEL positiu (figura 2a) i l'altra amb un percentatge elevat (figura 2b). A més, es mostren els resultats d'espermatozoides TUNEL positiu quan en la població a estudiar se seleccionen segons forma i mida o per espermatozoides marcats amb iodur de propidi posterior a la permeabilització (figura 2a: 11,5 % vs. 9,03 % i figura 2b: 39,92 % vs. 32,42 %).

Quant a l'efecte sobre el percentatge d'espermatozoides TUNEL positiu, després del procés de refrigeració a 4° C i congelació a -20° C posterior a la permeabilització amb etanol al 70 % es va observar que ambdós processos augmentaren de forma important la fragmentació del DNA, com es pot observar a la figura 3, en relació amb la mostra avaluada el mateix dia (figura 2b).

Es va observar una correlació positiva entre els valors d'espermatozoides TUNEL positiu en ser avaluats per microscòpia de fluorescència i per citometria de flux (no mostrat). No obstant això, utilitzant microscòpia de fluorescència en tots els casos el percentatge d'espermatozoides TUNEL positiu va ser inferior en comparació amb l'observat per citometria de flux.

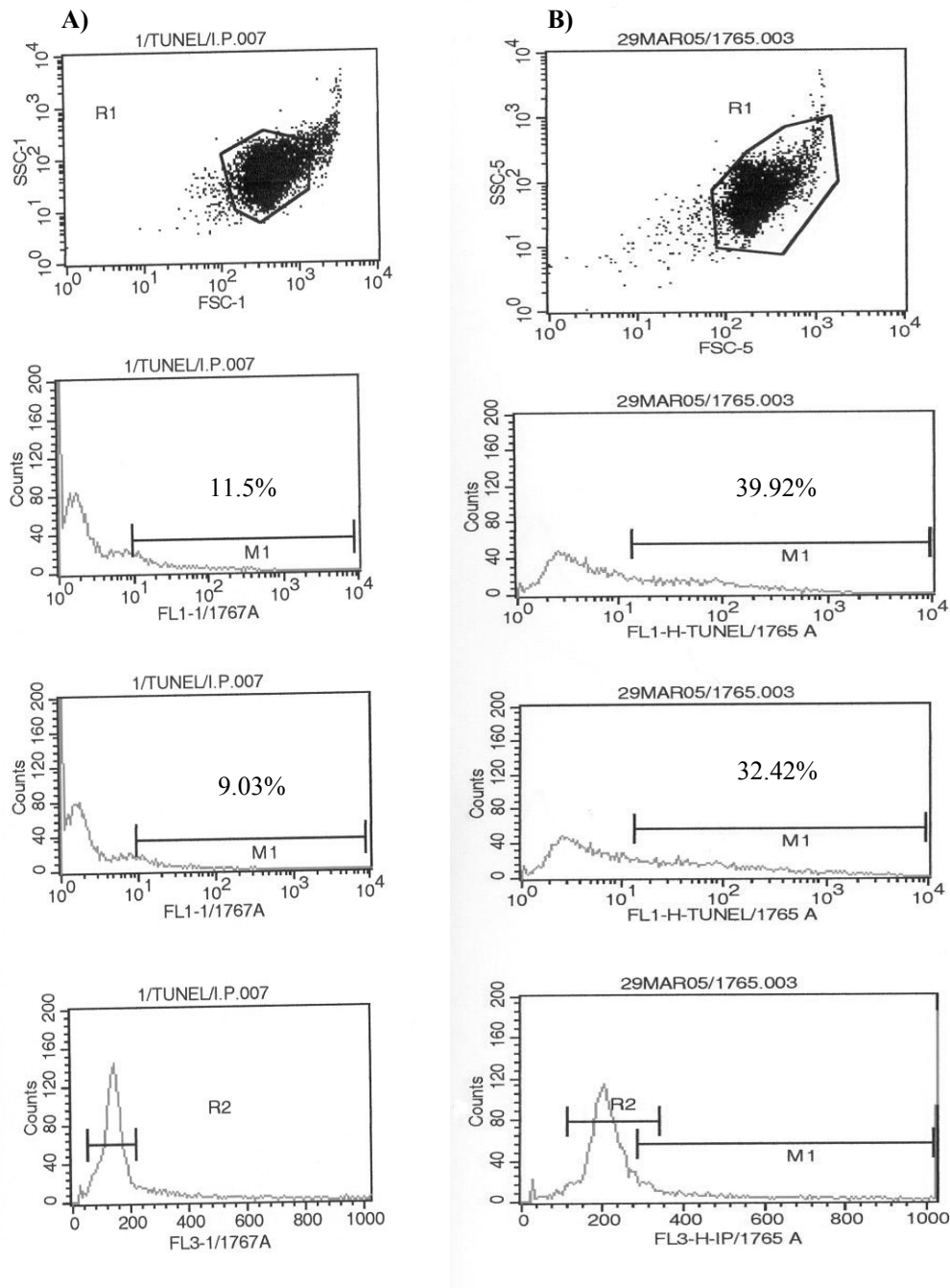


Figura 2 a) Mostra de semen amb un percentatge baix de fragmentació del DNA. b) Mostra de semen amb un percentatge elevat de fragmentació del DNA.

DISCUSSIÓ

Resultats previs demostren que els espermatozoides amb dany al DNA seleccionats per a ICSI podrien impedir el procés normal de descondensació, i donarien lloc a una fertilització errònia. Lopes *et al.* (1998) van observar que els varons amb una població espermàtica amb trencaments al DNA > 25 % tenien una taxa de fertilització < 20 % després de la ICSI. A més, aquests tenen un percentatge més petit d'embrions que

evolucionen a blastòcits quan són comparats amb els pacients que segueixen un tractament per FIV. (Shoukir *et al.*, 1998). Alguns autors han proposat que la tècnica TUNEL podria ser un assaig per a mesurar la qualitat biològica del semen (Oosterhuis *et al.*, 2000) Per aquests motius, queda clara la importància de desenvolupar un mètode estandaritzat per a mesurar els trencaments en el DNA dels espermatozoides dels pacients com a tècnica de rutina en qualsevol clínica de reproducció assistida.

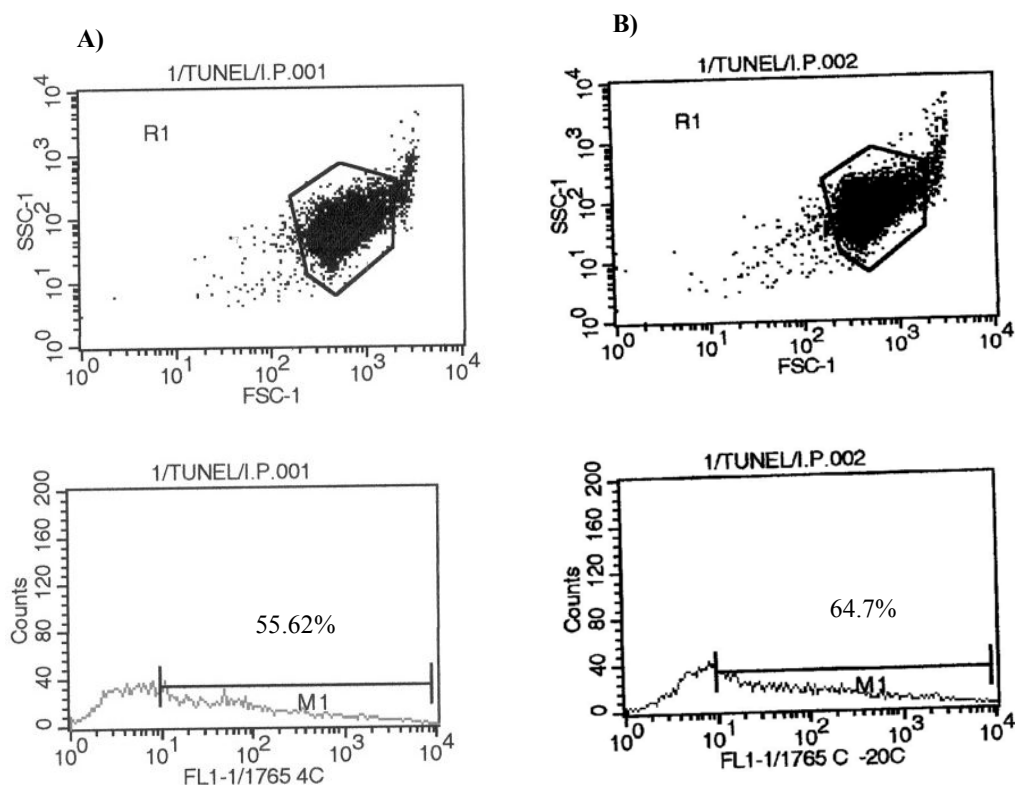


Figura 3 a) Espermatozoides TUNEL positiu posteriors a la conservació de la mostra a 4° C. b) Espermatozoides TUNEL positiu posteriors a la conservació de la mostra a -20° C.

D'altra banda, s'ha demostrat que les tècniques de selecció espermàtica per gradient contribueixen a disminuir el nombre d'espermatozoides amb DNA fragmentat (Ramos i Wetzels, 2001; Donnelly *et al.*, 2000; Weng *et al.*, 2002), i això indica que a més hauria d'estandarditzar-se sobre quina població espermàtica seria convenient realitzar l'estudi.

Es va observar que existeix una correlació positiva entre la determinació d'espermatozoides TUNEL positiu per microscòpia de fluorescència i citometria de flux, similar al que s'ha descrit (Muratori *et al.*, 2000). No obstant això, en aquesta última tècnica els valors de positivitat són majors que els de la primera, cosa que podria dificultar la comparació de resultats entre laboratoris que utilitzen un dels dos mètodes com a tècnica d'elecció.

Pel que fa a la utilització de la citometria de flux, la selecció de la població espermàtica, per forma i mida o per incorporació de IP un cop permeabilitzats, podria provocar variacions en els resultats entre laboratoris, factor que hauria d'estudiar-se en major profunditat per a arribar a resultats conclouents.

Una forma de facilitar la feina d'aquells laboratoris que utilitzin TUNEL seria poder reunir les mostres dels pacients i guardar-les en fred o congelades per a poder analitzar-les posteriorment d'un cop. En canvi,

els nostres resultats demostren que tant la conservació a 4° C com a -20° C en etanol al 70 % provoquen augments considerables en la fragmentació del DNA de les mostres. Seria convenient repetir aquest mateix estudi amb un nombre major de mostres per a poder confirmar aquest resultat i provar també aquest mateix efecte en mostres congelades en nitrogen líquid (Duru *et al.*, 2001)

Els resultats d'aquest treball demostren la necessitat d'estandarditzar la tècnica TUNEL en espermatozoides si en un futur es volgués implementar com a part de les anàlisis de rutina dins dels laboratoris de reproducció assistida.

AGRAÏMENTS

Subvencionat amb projecte de recerca de la Generalitat de Catalunya (2001SGR00382), Ministerio de Ciencia y Tecnología (Plan Nacional de I+D) BMC2003-03937) i Fondo de Investigaciones Sanitarias (V-2003-RED CO7A-0) a R. O. D. D. està subvencionat amb una beca de l'IDIBAPS.

BIBLIOGRAFIA

- BALHORN, R.; REED, S.; TANPHAICHITR, N. (1988). «Aberant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males». *Experientia*, 44:52-55.
- DE YEBRA, L. L.; BALLESCÀ, J. L.; VANRELL, J. A.; BASSAS, L. L.; OLIVA, R. (1993). «Complete selective absence of protamine P2 in humans». *J. Biol. Chem.*, 268:10553-10557.
- DONNELLY, E. T.; O'CONNELL, M.; McCLURE, N.; LEWIS, S. E. (2000). «Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa». *Hum. Reprod.*, 15:1552-1561.
- DURU, N. K.; MORSHEDI, M. S.; SCHUFFNER, A.; OEHNINGER, S. (2001) «Cryopreservation-Thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation». *J. Androl.*, 22:646-651.
- FRAGA, C. G.; MOTCHNIK, P. A.; WYROBEK, A. J.; REMPEL, D. M.; AMES, B. N. (1996). «Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA». *Mutat. Res.*, 351:199-203.
- JI, B. T.; SHU, X. O.; LINET, M. S.; ZHENG, W.; WACHOLDER, S.; GAO, Y. T.; YING, D. M.; JIN, F. (1997). «Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers». *J. Natl. Cancer Inst.*, 89(3):238-244.
- LOPES, S.; SUN, J. G.; JURISCOVA, A.; MERIANO, J.; CASPER, R. F. (1998). «Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor quality sperm samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection». *Fertility and Sterility*, 69:528-532.
- MEZQUITA, C. (1985). «Chromatin composition, structure and function in spermatogenesis». *Revis. Biol. Celular*, 5(V-XIV):1-124. Review.
- MURATORI, M.; PIOMBONI, P.; BALDI, E.; FILIMBERTI, E.; PECCHIOLI, P.; MORETTI, E.; GAMBERA, L.; BACCETTI, B.; BIAGIOTTI, R.; FORTI, G.; MAGGI, M. (2000). «Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm». *J. Androl.*, 21:903-912.
- OLIVA, R.; DIXON, G. H. (1991). «Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction». *Prot. nucleic. Acid Res. Mol. Biol.*, 40:25-94.
- OOSTERHUIS, G. J.; MULDER, A. B.; KALSBEEK-BATENBURG, E.; LAMBALK, C. B.; SCHOEMAKER, J.; VERMES, I. (2000). «Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality?» *Fertil. Steril.* 74:245-250.
- RAMOS, L.; WETZELS, A. M. (2001). «Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay». *Hum. Reprod.*, 16:1703-1707.
- ROCA, J.; MEZQUITA, C. (1989). «DNA topoisomerase II activity in nonreplicating, transcriptionally inactive, chicken late spermatids». *EMBO J.*, 8(6):1855-1860.
- SHOUKIR, Y.; CHARDONNENS, D.; CAMPANA, A.; SAKKAS, D. (1998). «Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence?» *Human Reproduction*, 13:1632-1637.
- SORAHAN, T.; LANCASHIRE, R. J.; HULTEN, M. A.; PECK, I.; STEWART, A. M. (1997). «Childhood cancer and parental use of tobacco: deaths from 1953 to 1955». *Br. J. Cancer*, 75:134-138.
- WENG, S. L.; TAYLOR, S. L.; MORSHEDI, M.; SCHUFFNER, A.; DURAN, E. H.; BEEBE, S.; OEHNINGER, S. (2002). «Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm». *Mol. Hum. Reprod.*, 8:984-991.

EFFECTE DELS DIFERENTS XOCS OSMÒTICS EN LES EJACULACIONS DE MASCLES REPRODUCTORS PORCINS (*Sus domesticus*)

Marc Yeste,* M. Dolors Briz, Elisabeth Pinart, Sílvia Sancho, Núria Garcia-Gil, Elena Badia, Anna Pruneda, Eva Bussalleu, Isabel Casas, Sergi Bonet

Bioteconologia de la Reproducció Porcina. Departament de Biologia. Universitat de Girona.
Campus Montilivi, s/n. 17071 Girona. Tel. 972418366. Fax 972418150. Adreça electrònica: marc.yeste@udg.es.

Resum

Els espermatozoides es veuen sotmesos a lleugers canvis del seu entorn durant el seu trànsit. L'objectiu d'aquest estudi ha estat determinar l'efecte dels canvis osmòtics en la integritat espermàtica. Les dosis seminals procedents de mascles Piétrain Sans foren sotmeses a dos tractaments hipotònics i hipertònics diferents: hipotònic suau (275 mOsm), hipotònic fort (225 mOsm), hipertònic suau (325 mOsm) i hipertònic fort (375 mOsm). La qualitat espermàtica fou avaluada mitjançant les anàlisis de la vitalitat, la motilitat i la morfologia espermàtiques, abans i després d'aplicar els tractaments. Els tractaments hipotònic i hipertònic forts produeixen una disminució significativa de la vitalitat i la motilitat espermàtiques, però no n'afecten la morfologia. En canvi, els tractaments hipertònic i hipotònic suaus no afecten cap dels tres paràmetres esmentats. En definitiva, l'espermatozoide de porcí és molt sensible als canvis hipotònics i hipertònics severos, mentre que lleugers canvis en la pressió osmòtica no l'afecten tant.

Paraules clau Pressió osmòtica, qualitat espermàtica, tractament hipertònic i hipotònic.

Abstract

Effects of osmotic shocks on boar sperm quality Spermatozoa are submitted to soft environment changes during its transit. The aim of this study was to determine the effects of different osmotic changes on sperm integrity. Sperm samples from healthy Pietrain boars were submitted to two different hypotonic and hypertonic treatments: soft hypotonic (275 mOsm), strong hypotonic (225 mOsm), soft hypertonic (325 mOsm) and strong hypertonic (375 mOsm). Sperm quality was evaluated in terms of sperm vitality, sperm motility and sperm morphology, before and after applying the treatments. Both strong hypotonic and hypertonic treatments produced a significant decrease of sperm motility and sperm vitality, but did not affect the sperm morphology. In contrast, soft hypertonic and hypotonic treatments did not affect significantly sperm vitality, sperm motility and sperm morphology. In conclusion, boar spermatozoa are very sensitive to strong hypertonic and hypotonic changes, whereas small changes in osmotic pressure do not affect the sperm function.

Key words Osmotic pressure, sperm integrity, hypotonic and hypertonic treatments.

INTRODUCCIÓ

La demanda de dosis seminals de mascles reproductors porcins de la raça Piétrain, refrigerades i destinades a la inseminació artificial, ha augmentat moltíssim en els darrers anys. Tanmateix, tant els centres d'inseminació artificial com els de selecció han constatat que la qualitat espermàtica de les ejaculacions d'aquests mascles no es manté constant al llarg de la seva vida reproductiva útil. Les explotacions porcines observen,

sovint, que semen fresc amb una qualitat espermàtica relativament bona es comporta de manera molt diferent en refrigeració, i disminueix sobtadament la seva qualitat seminal.

Encara que la criopreservació de semen porcí no sigui una pràctica habitual, atesa la reduïda qualitat del semen descongelat (si es compara amb el rendiment en d'altres espècies), es coneix que determinats mascles presenten una aptitud major per a congelar el seu semen que d'altres. Durant el protocol de congela-

ció i descongelació del semen de porc es produeixen un conjunt de canvis en la pressió osmòtica del medi en el qual es troben els espermatozoides. Encara que inicialment la qualitat del semen ejaculat sigui bona, la seva resposta pot ésser variable quan se sotmet al procés de criopreservació.

De manera tradicional, la valoració de la qualitat espermàtica s'ha dut a terme mitjançant l'anàlisi de la seva vitalitat, motilitat i morfologia espermàtiques. Tanmateix, poques vegades s'examina acuradament la qualitat d'aquest semen moments abans de la inseminació. En general, les anàlisis sobre la qualitat del semen no tenen en compte que aquest, des que és ejaculat i fins que entra en contacte amb l'oòcit, es troba amb un conjunt de diversos canvis osmòtics com a conseqüència de les variacions de tonicitat dels medis que l'espermatozoide haurà de travessar. Per això, la qualitat espermàtica s'hauria d'avaluar no solament quan el semen és fresc sinó també després d'aplicar xocs osmòtics com als quals es veurà sotmès posteriorment.

MATERIAL I MÈTODES

Les mostres seminals per a dur a terme aquest estudi s'han obtingut a partir de cent sis mascles reproductors porcins de la raça Piétrain, sexualment madurs, sans, confinats en naus climatitzades amb control de temperatura i humitat relativa, i sotmesos a un règim alimentari controlat i ajustat.

Les mostres s'obtingueren mitjançant la muntada sobre maniquí i masturbació manual. Del semen ejaculat se'n recollí només la fracció espermàtica (rica en espermatozoides), i es van descartar les fraccions pre i postespermàtiques, en un termo a 37° C en el qual s'havia col·locat prèviament una gasa per a eliminar la fracció de mucina.

Les fraccions espermàtiques van ésser diluïdes amb diluent CIDOSA (Tecnovit) en una relació 1:5 i es van distribuir en dosis seminals de 80 ml cadascuna, que foren transportades a 15° C en un recipient termoïllat des de les granges fins al laboratori de la Universitat de Girona.

La vitalitat, la morfologia i la motilitat espermàtiques de les mostres es van valorar abans i després d'aplicar els tractaments i es realitzà una classificació de la qualitat seminal atenent als criteris establerts per Bonet *et al.* (1995) i Pinart *et al.* (1999).

Per a valorar la motilitat i morfologia espermàtiques s'emprà el microscopi òptic de contrast de fases amb els objectius de deu i vint augments, respectivament, conjuntament amb el programa CASA (SCA production 2002, Microptic SL). La vitalitat espermàtica, la integritat de la beina mitocondrial i de l'acrosoma es

van avaluar mitjançant la tècnica de la triple tinció amb fluorocroms.

Atenent als resultats obtinguts per a aquests paràmetres, s'establiren quatre grups diferents: el primer grup de quaranta mascles amb una bona qualitat espermàtica, perquè els tres paràmetres eren superiors als valors l·lindar; el segon grup de vint mascles amb una bona motilitat espermàtica però amb una morfologia i una vitalitat espermàtiques inferiors als l·lindars respectius; el tercer grup de tretze mascles amb bones motilitat i morfologia espermàtiques però mala vitalitat espermàtica i el quart grup de trenta-tres mascles amb bona motilitat i vitalitat espermàtiques però amb un percentatge d'espermatozoides madurs del 80 %.

Es van definir dos tipus de xocs osmòtics, hipotònics i hipertònics, segons si s'augmentava o es disminuïa l'osmolaritat del diluent inicial (300 mOsm), i també dues variants d'aquests: suau i forta (225 i 275 mOsm i 325 i 375 mOsm, respectivament). El tractament hipotònic s'aconseguí a partir de l'addició d'aigua miliQ i els hipertònics mitjançant clorur de sodi, glucosa, fructosa i sorbitol,

Els resultats foren analitzats mitjançant el test estadístic de l'anàlisi de la variància (ANOVA) d'un factor (el tractament) i amb una variable dependent (els diferents paràmetres que defineixen la qualitat seminal). Prèviament a l'aplicació del test de l'ANOVA les variables foren transformades amb l'arcsinus ($y = \arcsin \sqrt{x}$). El tractament de les dades es va dur a terme mitjançant el paquet estadístic SPSS per a Windows, versió 12.0 amb un nivell de significació (α) de 0,05.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Els espermatozoides es troben, durant el seu trànsit, tant en l'aparell reproductor masculí com en el femení, amb lleugeres variacions de la pressió osmòtica dels fluids que han de travessar. Per això, en aquest treball es van assajar xocs osmòtics, tant hipotònics com hipertònics, amb un rang de variació en la tonicitat bastant petita (de 225 a 375 mOsm), perquè el que es pretenia era no solament conèixer la resistència de les cèl·lules espermàtiques enfront d'aquest estrès osmòtic, sinó també mimetitzar *in vitro* les condicions fisiològiques.

S'ha establert, també, un altre nivell de comparació analitzant la resposta que oferien ejaculacions de qualitats espermàtiques diferents (quatre tipus) respecte els tractaments aplicats.

En experiments precedents, efectuats tant en porcí com en altres espècies de mamífers domèstics, també s'havien aplicat xocs osmòtics per tal d'observar quina

Taula 1 Resultats obtinguts al grup de mascles amb bona qualitat espermàtica.

Tractament (% esp. mòbils)	Motilitat espermàtica	Morfologia espermàtica (% esp. madurs)	Vitalitat espermàtica (% esp. vius amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes)
Control 300 mOsm	89,5 ± 5,24 %	89,7 % ± 4,44 %	79,8 ± 9,06 %
Hipotònic 225 mOsm	70,1 ± 6,35 %*	85,1 % ± 5,23 %	63,6 ± 10,48 %*
Hipotònic 275 mOsm	79,3 ± 5,86 %	86,0 % ± 4,99 %	78,4 ± 9,75 %
Hipertònic NaCl 325 mOsm	85,0 ± 5,53 %	83,4 % ± 5,55 %	75,8 ± 9,06 %
Hipertònic NaCl 375 mOsm	71,2 ± 6,06 %*	84,2 % ± 4,87 %	65,5 ± 10,25 %*
Hipertònic glucosa 325 mOsm	86,2 ± 5,54 %	88,3 % ± 5,01 %	77,3 ± 8,87 %
Hipertònic glucosa 375 mOsm	72,4 ± 5,78 %*	86,2 % ± 4,58 %	67,9 ± 10,13 %*
Hipertònic fructosa 325 mOsm	87,8 ± 5,17 %	89,1 % ± 4,05 %	79,0 ± 8,91 %
Hipertònic fructosa 375 mOsm	79,6 ± 6,10 %	88,5 % ± 4,82 %	73,3 ± 9,23 %
Hipertònic sorbitol 325 mOsm	87,0 ± 5,31 %	88,0 % ± 4,63 %	78,7 ± 8,56 %
Hipertònic sorbitol 375 mOsm	73,7 ± 5,95 %*	87,9 % ± 4,77 %	72,8 ± 9,92 %

era la resistència dels espermatozoides a l'estrès osmòtic, encara que les variacions de tonicitat dels medis assajats eren molt superiors als d'aquest treball (Fraser *et al.*, 2001).

En tots aquests experiments es va observar que quan l'osmolaritat del medi es troba al voltant dels 300 mOsm, és a dir, quan la naturalesa del medi era isotònica, les mostres seminals presentaven una major qualitat que en condicions anisotòniques. Així, quan l'osmolaritat del medi s'allunya considerablement de 300 mOsm (especialment quan és inferior a 270 o superior a 360 mOsm) els espermatozoides esdevenen immòbils i en alguns casos es veuen malmeses les seves membranes plasmàtiques (Pommer *et al.*, 2002; Guthrie *et al.*, 2002).

Els experiments amb medis hipotònics són més abundants que els experiments amb medis hipertònics, atesa la importància d'algunes proves que analitzen la resistència dels espermatozoides enfront a importants disminucions en l'osmolaritat dels medis en condicions fisiològiques (inferiors a 200 mOsm). Hi ha, doncs, una gran varietat de treballs que estudien els tests HOS i ORT (Pérez-Llano *et al.*, 2003).

Tanmateix, el nombre de treballs que tracten els xocs hipertònics és significativament inferior. Els soluts que s'afegeixen amb més freqüència són monosacàrids, com la glucosa, la fructosa i el sorbitol (Rigau *et al.*, 2001; Agca *et al.*, 2002; Koshimoto *et al.*, 2002), el glicerol i l'etilenglicol, especialment per a observar la resistència osmòtica dels espermatozoides que després hauran d'ésser sotmesos a congelació/descongelació (Gilmore *et al.*, 1998, Guthrie *et al.*, 2002), el clorur de sodi (Caiza de la Cueva *et al.*, 1997) i el citrat de sodi (Fraser *et al.*, 2001).

La motilitat espermàtica és un dels paràmetres que més s'utilitza per a valorar la qualitat seminal de les

ejaculacions de porcí, especialment en els centres de producció de les dosis seminals, on una anàlisi de la motilitat espermàtica és fonamental per a descartar o no una ejaculació. En aquest estudi s'ha constatat que en aplicar xocs osmòtics de diferent naturalesa, la freqüència d'espermatozoides mòbils disminueix. A més, sucres presents en el plasma seminal com la glucosa i la fructosa (Williams *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2002) són els que menys danys produeixen als espermatozoides.

Un altre aspecte observat és que el semen fresc de major qualitat és el més sensible als canvis osmòtics, perquè en la resta de casos la qualitat de l'ejaculació és d'antuvi inferior en els controls, de manera que les diferències observades respecte als tractaments són menors. Aquestes dades permeten constatar que el semen de porcí és molt làbil i que, per tant, petites variacions en el plasma seminal o en el diluent n'afecten, freqüentment, la qualitat.

En toros s'ha comprovat que les variacions de tonicitat del medi, tant si aquestes són superiors com inferiors a les condicions isotòniques, afecten la qualitat espermàtica de la seva ejaculació, encara que de manera lleugerament inferior a l'observada per a l'ejaculació de porcí. Això és conseqüència de la major sensibilitat de l'ejaculació de porcí a petites variacions del medi respecte d'altres mamífers domèstics. Així doncs, l'estratègia reproductora de l'espècie porcina ha estat augmentar preferentment el volum de l'ejaculació i mantenir una baixa qualitat espermàtica.

També, el fet que les diferències entre els tipus de xocs siguin més aviat baixes, de manera que el que s'observa quan s'apliquen xocs hipotònics i hipertònics són danys similars, indica que és l'efecte de la variació de la pressió osmòtica, més que el solut afegit per aconseguir-la, el que més afecta els espermatozoides. Aquestes consideracions estan d'acord amb altres

treballs precedents que s'han ocupat d'aquesta qüestió tant en porcí (Zeng *et al.*, 2002), como en cavalls (Pommer *et al.*, 2002), en toros (Guthrie *et al.*, 2002), en ratolins (Willoughby *et al.*, 1996), en gossos (Rigau *et al.*, 2001) i en humans (Rossato *et al.*, 2002).

En aquest i en altres experiments s'ha observat que els danys produïts per l'estrès osmòtic s'esdevenen durant el canvi inicial de les condicions de tonicitat de l'ambient en el qual es troben els espermatozoides, des del medi isotònic al medi hipotònic o hipertònic (Gilmore *et al.*, 1996). Això explicaria perquè sempre que es produeix un xoc hipotònic o hipertònic la motilitat espermàtica i, en alguns casos, la vitalitat, es veuen reduïdes, perquè quan s'aplica un retorn al medi isotònic no s'observa cap millora de la motilitat, car els danys ja han estat produïts i són irreversibles. Si es comparen els efectes que els xocs osmòtics produeixen en la motilitat espermàtica respecte els efectes produïts sobre la morfologia i la vitalitat espermàtiques i sobre la integritat de les membranes plasmàtiques, pot comprovar-se el que, prèviament, havien assenyalat alguns autors (Caiza de la Cueva *et al.*, 1997; Fraser *et al.*, 2001; Rigau *et al.*, 2001), i és que tant en porcí com en d'altres mamífers la motilitat és el paràmetre que resulta més afectat quan es produeixen canvis en la naturalesa osmòtica del medi. Això demostra que en condicions anisotòniques les membranes plasmàtiques són més resistents a l'estrès osmòtic que els mecanismes responsables de la motilitat espermàtica (Fraser *et al.*, 2001).

Els danys en la membrana plasmàtica es deuen al fet que les condicions hipotòniques i hipertòniques provoquen una reducció ràpida dels nivells intracel·lulars d'ATP, que tenen un paper clau en el manteniment de la motilitat espermàtica.

En relació als resultats obtinguts en l'anàlisi de la morfologia espermàtica, no s'ha observat que els xocs osmòtics produeixin cap efecte ni en la freqüència d'espermatozoides madurs ni en la d'immadurs o aberrants. D'aquesta manera es comproven alguns dels aspectes que ja s'havien observat en estudis anteriors, com, per exemple, que les variacions d'osmolaritat no milloren les freqüències d'espermatozoides amb malformacions primàries ni secundàries (Pinart *et al.*, 1999).

La vitalitat espermàtica, la integritat de la beina mitocondrial i l'estabilitat de l'acrosoma també es veuen afectades per aquests canvis, encara que en menor grau que la motilitat i en major grau que la morfologia dels espermatozoides. Els canvis més importants quant a la freqüència d'espermatozoides vius i amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes i, per tant, els efectes dels tractaments aplicats sobre algun d'aquests paràmetres s'han observat, com succeïa en l'anàlisi

de la motilitat espermàtica, en aquelles ejaculacions que tenen una qualitat seminal millor. En relació a les diferències entre tractaments, els xocs hipotònic i hipertònic amb clorur de sodi són els que més afecten la freqüència d'espermatozoides vius amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes. La disminució d'aquesta freqüència es deu als danys causats sobre el nucli i sobre l'acrosoma. L'acrosoma és l'òrganul més afectat pels canvis en l'osmolaritat del medi. La resistència de l'acrosoma enfront dels canvis de tonicitat és diferent en cadascuna de les espècies de mamífers estudiada, i és inferior en el porcí que en el toro o el boc (Petrunkina *et al.*, 2001). La composició de la membrana acrosòmica, tant per la seva riquesa en fosfolípids insaturats, com en relació amb la petita quantitat de canals de potassi activats pels canvis d'osmolaritat que presenta, és una de les principals raons de la poca resistència de l'espermatozoide de porcí enfront de variacions de tonicitat i de la seva labilitat.

La sensibilitat dels espermatozoides a l'estrès osmòtic representa un criteri addicional per a la selecció de les mostres seminals. En els programes genètics de selecció que duen a terme els centres especialitzats, es tenen en compte tant els caràcters fenotípics del mascle com la capacitat de transmetre'ls a la seva descendència, és a dir, la qualitat del seu semen.

Actualment, la qualitat seminal de l'ejaculació de porcí es valora mitjançant les proves clàssiques de vitalitat, motilitat i morfologia espermàtiques. A partir dels resultats obtinguts, es pot concloure que la resposta als xocs osmòtics en funció de la qualitat espermàtica és un paràmetre que s'ha d'assajar conjuntament amb la resta, a fi de conèixer la labilitat del semen i seleccionar aquell que, en ésser menys làbil, és més apte per a refrigerar i congelar.

Per això, aquests estudis poden aplicar-se a la criopreservació del semen porcí, perquè és necessari conèixer l'estabilitat i la resposta dels espermatozoides a l'estrès osmòtic, tant en relació amb la motilitat com amb la integritat de la membrana plasmàtica per a, d'una banda, optimitzar el protocol de congelació/descongelació i, per l'altra, descriure les característiques del semen que millor congela/descongela. Aquest darrer aspecte és considerablement important en l'espècie porcina, perquè el seu semen presenta un alt grau de variació quant a la criosupervivència espermàtica i una dificultat afegida a l'hora de conservar els espermatozoides mitjançant protocols de congelació, atesa la composició de la seva membrana plasmàtica, molt rica en fosfolípids insaturats i amb tendència a la difusibilitat de les proteïnes de la bicapa lipídica.

BIBLIOGRAFIA

- AGCA, Y.; GILMORE, J.; BYERS, M.; WOODS, E. J.; LIU, J.; CRITSER, J. K. (2002). «Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars». *Biology of Reproduction*, 67:1493-1501.
- BALL, B. A.; VO, A. (2001). «Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential». *Journal of Andrology*, 22:1061-1069.
- BONET, S.; BRIZ, M.; PINART, E.; CAMPS, R.; FRADERA, A.; CASADEVALL, M. (1995). «Light microscopy characterization of sperm morphology». *Microscopy and Analysis*, 9:29-31.
- CAIZA DE LA CUEVA, F. I.; RIGAU, T.; PUJOL, R.; PIEDRAFITA, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. (1997). «Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival». *Animal Reproduction Science*, 48:301-315.
- CARVAJAL, G.; CUELLO, C.; RUIZ, M.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E. A.; ROCA, J. (2004). «Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival». *Journal of Andrology*, 25:389-396.
- CHRISTOVA, Y.; JAMES, P. S.; MACKIE, A.; COOPER, T. G.; JONES, R. (2004). «Molecular diffusion in sperm plasma membranes during epididymal maturation». *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216:41-46.
- FRASER, L.; GORSZCZARUK, K.; STRZEZEK, J. (2001). «Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality». *Reproduction in Domestic Animals*, 36:325-329.
- GUTHRIE, H. D.; LIU, J.; CRITSER, J. K. (2002). «Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa». *Biology of Reproduction*, 67:1811-1816.
- KOSHIMOTO, C.; MAZUR, P. (2002). «The effect of the osmolality of sugar-containing media, the type of sugar, and the mass and molar concentration of sugar on the survival of frozen-thawed mouse sperm». *Cryobiology*, 45:80-90.
- PINART, E.; SANCHO, S.; BRIZ, M.; BONET, S.; GARCÍA-GIL, N. (1999). «Characterization of the semen quality of postpubertal boars with spontaneous unilateral abdominal cryptorchidism on the right side». *Animal Reproduction Science*, 55:269-278.
- POMMER, A. C.; RUTLLANT, J.; MEYERS, S. A. (2002). «The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function». *Theriogenology*, 58:1373-1384.
- RIGAU, T.; FARRE, M.; BALLESTER, J.; MOGAS, T.; PENÀ, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. (2001). «Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates». *Theriogenology*, 56:801-815.
- WILLOUGHBY, C. E.; MAZUR, P.; PETER, A. T.; CRITSER, J. K. (1996). «Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa».
- ZENG, W. X.; SHIMADA, M.; ISOBE, N.; TERADA, T. (2001). «Survival of boar spermatozoa frozen in diluents of varying osmolality». *Theriogenology*, 56:447-458.

CULTIU DE CÈL·LULES EPITELIALS EPIDIDIMÀRIES DE *Sus domesticus*

Judit Bassols,* Elisabeth Kàdar, M. Dolors Briz, Elisabeth Pinart, Silvia Sancho, Núria Garcia-Gil, Elena Badia, Anna Pruneda, Eva Bussalleu, Marc Yeste, Isabel Casas, Sergi Bonet

Biotecnologia de la Reproducció Porcina, Departament de Biologia. Universitat de Girona.
Campus Montilivi, s/n. 17071 Girona. Tel. 972 418 366. Fax 972 418 150. Adreça electrònica: judit.bassols@udg.es.

Resum

Aquest treball descriu un protocol per al cultiu de les cèl·lules epitelials del caput, corpus i cauda epididimaris de *Sus domesticus*. Uns trenta fragments de cadascuna de les regions de l'epidídim, obtinguts mitjançant dissecció i digestió enzimàtica amb collagenasa, es van cultivar en plaques de cultiu de vint-i-quatre pous amb medi RPMI-1640 suplementat a 37° C en 5 % de CO₂ i humitat del 100 %. Al cap de 12-16 dies es va formar una monocapa confluent que contenia un 80 % de cèl·lules epitelials, que es van mantenir *in vitro* durant seixanta dies. Observacions al microscopi electrònic de transmissió van indicar que les cèl·lules epitelials del caput, corpus i cauda epididimaris en cultiu mantenen les característiques pròpies de l'epiteli epididimari *in vivo*. Aquest sistema pot ser molt útil per a l'estudi dels mecanismes de maduració espermàtica *in vitro*.

Paraules clau *Sus domesticus*, cèl·lules epitelials, epidídim, cultiu *in vitro*.

Abstract

Culture of epididymal epithelial cells of *Sus domesticus* This work describes a protocol to culture epididymal epithelial cells from the caput, corpus and cauda regions of *Sus domesticus*. About 30 epididymal epithelial fragments from each epididymal region obtained after dissection and enzymatic digestion with collagenase were cultured in 24-well culture plates with supplemented RPMI-1640 medium at 37° C, 5% CO₂ in air and 100% humidity. A confluent monolayer containing 80% of epithelial cells was obtained after 12-16 days in culture and maintained *in vitro* for more than 60 days. Electron microscopy observations indicated that caput, corpus and cauda epididymal cells in culture retain some fundamental features that characterize the epididymal epithelium in the intact organ. This system might be a valuable tool for studying the mechanism of sperm maturation *in vitro*.

Key words *Sus domesticus*, epithelial cells, epididymis, *in vitro* culture.

INTRODUCCIÓ

La maduració espermàtica és el procés que té lloc durant el trànsit dels espermatozoides a través de les diferents regions de l'epidídim. Durant aquest procés els espermatozoides experimenten canvis per a adquirir la motilitat i la capacitat fecundant. Aquests canvis són el resultat de la interacció dels espermatozoides amb factors, principalment proteïnes, presents al fluid epididimari. El fluid epididimari resulta de les secrecions del testicle però és modificat per l'activitat secretora i absorbiva de l'epiteli de l'epidídim (Hinton i Palladino, 1995). Diferents autors han purificat i identificat moltes proteïnes secretades per l'epiteli epididimari de diverses espècies a partir del fluid epididimari (Gatti

et al., 2004), però el seu paper i importància en la maduració espermàtica són encara poc coneguts. Aquests mètodes fan difícil l'estudi de les activitats de l'epiteli epididimari sense interferència de factors testiculars i de teixits no epitelials. Una solució a aquest problema és l'ús de cultius primaris de cèl·lules epitelials epididimàries. Aquests mètodes proporcionen un model simple per a l'anàlisi de les activitats metabòliques de les cèl·lules epitelials epididimàries i la seva regulació, perquè es pot estudiar la síntesi i secreció de components específics en condicions definides. Fins al moment s'han desenvolupat sistemes de cultiu de cèl·lules epitelials epididimàries en humans (Akhondi *et al.*, 1997; Cooper *et al.*, 1990) i en diverses espècies animals com rosegadors (Byers *et al.*, 1992;

Carballada i Saling, 1997), boví (Gagnon *et al.*, 2000) i marsupials (Lin *et al.*, 2000), però no en porcí.

MATERIAL I MÈTODES

Animals

Masclles reproductors porcins de la raça Pietrain sans i sexualment madurs (8-12 mesos d'edat).

Obtenció i cultiu de les cèl·lules epitelials epididimàries

Al laboratori, sota condicions estèrils, es van identificar les tres regions epididimàries (caput, corpus i cauda) i es va agafar una mostra de cada regió, que es va tallar en fragments de 2-5 mm de longitud. Després de tres rentats amb PBS suplementat amb antibiòtics els fragments es van incubar amb 300 U ml⁻¹ de collagenasa (de tipus VII) en PBS suplementat amb antibiòtics a 37° C. Els fragments que procedien de les regions del caput i corpus es van incubar durant dues hores i els fragments que procedien de la regió caudal durant tres hores. La digestió enzimàtica es va aturar afegint medi de cultiu, format per medi RPMI 1640 suplementat amb 10% de sèrum fetal, 1 mM de sodi-piruvat, 100 nM d'insulina, 200 nM d'hidrocortisona, 200 nM de testosterona, 1 µM de dihidrotestosterona, 5 µg ml⁻¹ d'apotransferrina, 1 µg ml⁻¹ d'acetat retinol, 25 mM d'Hepes i 50 U ml⁻¹ de penicil·lina-estreptomicina. Després de tres rentats amb medi de cultiu, es va procedir a la segona digestió amb 150 U ml⁻¹ de collagenasa en medi de cultiu a 37° C. Els fragments de caput es van incubar durant una hora, els de corpus dues hores i els de cauda tres hores. Igual que abans, la digestió enzimàtica es va aturar afegint medi de cultiu i les mostres es van rentar tres vegades amb medi de cultiu per a treure les restes d'enzim, de teixit i d'espermatozoides. Uns trenta fragments de cada una de les regions es van transferir a plaques de cultiu de vint-i-quatre pous amb 1 ml de medi de cultiu per pou, i es van incubar a 37° C en 5% de CO₂ i humitat del 100%. El dia sisè de cultiu es van treure, per aspiració, els fragments que no s'havien adherit a les plaques de cultiu. El medi de cultiu es canviava cada quaranta-vuit hores

Microscòpia òptica

L'establiment i l'evolució dels cultius es va avaluar a partir de l'observació diària al microscopi de contrast de fases invertit. Els dies 4, 7, 10, 14, 21, 28 i 35 de cultiu es va estimar el percentatge de confluència

dels cultius i les característiques morfològiques de les cèl·lules. També es va determinar la viabilitat i la concentració cel·lular mitjançant la tinció amb blau tripà 0,1% i recompte en cambra de Neubauer.

Immunofluorescència

Un cop per setmana, des de l'inici del cultiu i fins al dia 49, les cèl·lules en cultiu es van marcar amb un anticòs anticitoceratines i es van observar al microscopi òptic de fluorescència per tal de determinar la presència de cèl·lules epitelials. Els percentatges de cèl·lules epitelials es van determinar per immunofluorescència indirecta de les cèl·lules en suspensió i lectura mitjançant el citòmetre de flux.

Microscòpia electrònica

Els dies 7, 14, 21, 28 i 35 de cultiu es va estudiar la ultraestructura de les cèl·lules en cultiu a partir de l'observació al microscopi electrònic de transmissió.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Després de la digestió amb collagenasa es va obtenir una suspensió formada per fragments del conducte epididimari. Els fragments de cauda epididimari van necessitar períodes més llargs de digestió amb collagenasa que els fragments de caput i corpus, possiblement a causa de la major quantitat de teixit connectiu que envolta el conducte, tal i com passa en humans (Akhondi *et al.*, 1997). Al cap de 36-72 hores els fragments de les tres regions van començar a adherir-se a la base de la placa de cultiu i, un cop ben adherits, les cèl·lules epitelials de l'interior dels fragments van migrar cap a l'exterior i es van adherir a la placa de cultiu, amb la formació de colònies de cèl·lules polygonals i aplanades. El nombre de cèl·lules de les colònies va augmentar durant els següents dies i es va formar una monocapa contínua de cèl·lules densament empaquetades que van adquirir una confluència del 80-90% després de 12-16 dies de cultiu (vegeu la figura 1a). Aquestes monocapes es van mantenir en cultiu durant dos mesos.

Les cèl·lules de la monocapa presentaven una morfologia semblant en els cultius de les tres regions de l'epidídim. Eren cèl·lules polygonals, amb un nucli central i ovalat, que contenien diversos nuclèols i un citoplasma ple de grànuls. Al citoplasma d'aquestes cèl·lules també s'observaven unes vesícules que augmentaven en nombre i mida a partir de 10-12 dies de cultiu. Després de trenta-cinc dies, la morfologia de les cèl·lules en cultiu de les tres regions de l'epidídim

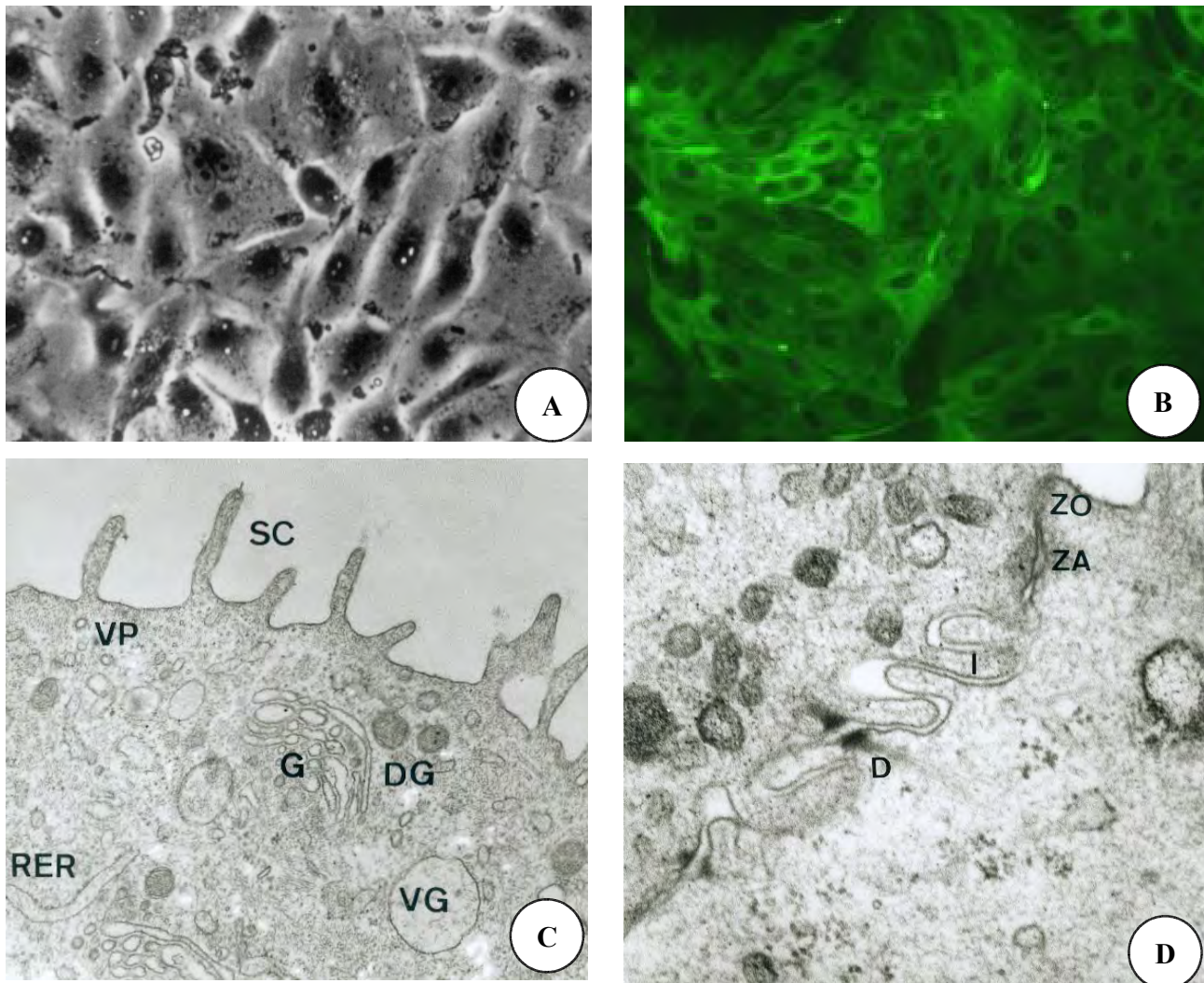


Figura 1 Aspecte de les cèl·lules epitelials del caput epididimari el dia 14 de cultiu al MO de contrast de fases (A), al MO de fluorescència després del marcatge amb anticòs anticitoceratina (B), i al ME de transmissió (D i E). Estereocilis (SC), vesícules petites (VP), vesícules de mida gran (VG), reticle endoplasmàtic rugós (RER), aparell de Golgi (G), mitocondris (M), ribosomes (R), interdigitacions (I) i complexos d'unió de tipus *zonula occludens* (ZO), *zonula adhaerens* (ZA) i desmosomes (D).

era similar a la morfologia que presentaven a l'inici, però les cèl·lules de la monocapa estaven més empaquetades i contenien una gran quantitat de vesícules al seu citoplasma.

L'ús de fragments epididimaris provoca la presència de cèl·lules epitelials i no epitelials als cultius. El percentatge de cèl·lules epitelials es va mesurar amb un anticòs contra citoceratines, un marcador específic de cèl·lules epitelials (Olson *et al.*, 1982). Tots els cultius epididimaris presentaven un 80 % de cèl·lules citoceratina positives durant quaranta-nou dies en cultiu (vegeu la figura 1b). Aquests resultats demostren que la majoria de cèl·lules de la monocapa eren epitelials i que no hi havia sobrecreixement de cèl·lules no epitelials.

Està ben establert que les monocapes de cèl·lules

epitelials epididimàries es formen per migració de les cèl·lules epitelials dels fragments epididimaris adherits. Alguns autors han demostrat que les monocapes també proliferen a causa de la divisió mitòtica d'aquestes cèl·lules (Carballada i Saling, 1997; Pera *et al.*, 1996). En el nostre estudi, la tinció simultània de les cèl·lules en cultiu amb l'anticòs anticitoceratines i amb bisbenzimidida va permetre observar nombroses figures mitòtiques en cèl·lules citoceratina positives en els cultius de les tres regions de l'epidídim, i això indica que les cèl·lules epitelials es dividien en cultiu. No es van observar nuclis en divisió a les cèl·lules citoceratina negatives. Igualment, l'activitat proliferant de les cèl·lules epitelials epididimàries en cultiu també es va comprovar mitjançant l'establiment de cultius secundaris de cèl·lules epitelials de caput, corpus i cauda

epididimaris. Es va observar que en tres dies es duplica el nombre de cèl·lules epitelials presents a cada pou.

Mitjançant el microscopi electrònic de transmissió s'observà que les característiques ultraestructurals de les cèl·lules epitelials de les tres regions de l'epidídim en cultiu eren similars i mantenien molts trets propis de les cèl·lules epitelials *in vivo* (vegeu les figures 1c i d). La superfície apical d'aquestes cèl·lules estava en contacte amb el medi de cultiu i es caracteritzava per la presència d'estereocilis, els quals són més curts que *in vivo*, tal i com s'ha descrit en altres espècies (Byers *et al.*, 1985). Les cèl·lules epitelials dels cultius es mantenen unides mitjançant interdigatacions i complexos d'unió situats a les seves membranes basals i laterals. El citoplasma contenia un reticle endoplasmàtic rugós abundant, un aparell de Golgi desenvolupat, nombrosos mitocondris allargats, ribosomes lliures sovint agrupats en forma de polisomes, fibres de filaments intermedis, cossos residuals i cossos multivesiculats. A partir del dia 21 de cultiu també s'observaven gotes lipídiques i grànuls densos. Les cèl·lules dels cultius de les tres regions també contenien vesícules de mida i electrodensitat variable. Es podien distingir unes vesícules petites i electrolúcides, que es localitzaven bàsicament al citoplasma apical, a la base dels estereocilis, i vesícules grans d'electrodensitat dèbil, que tenien una posició bàsicament perinuclear. La presència de ribosomes, reticle endoplasmàtic rugós, aparell de Golgi i vesícules perinuclears indica que les cèl·lules epitelials epididimàries mantenen la seva capacitat de sintetitzar i secretar proteïnes.

Aquest estudi demostra que les cèl·lules epitelials epididimàries es poden mantenir *in vitro* formant una monocapa durant dos mesos sense perdre les característiques morfològiques de les cèl·lules natives, i suggereix que també expressen les característiques funcionals. Els treballs que duem a terme en aquests moments al laboratori del nostre grup de recerca estan orientats a estudiar l'activitat secretora de les cèl·lules epitelials epididimàries en cultiu, per a verificar si mantenen les característiques fisiològiques. Si així fos, aquest sistema de cultiu seria de gran utilitat per a l'estudi de la maduració espermàtica. Els futurs experiments del grup de recerca estan enfocats a l'estudi de la maduració dels espermatozoides. Aquests estudis

es duren a terme mitjançant el cocultiu d'espermatozoides immadurs amb cultius de cèl·lules epitelials epididimàries de les diferents regions de l'epidídim.

BIBLIOGRAFIA

- AKHONDI, M. A.; CHAPPLE, C.; MOORE, H. D. (1997). «Prolonged survival of human spermatozoa when co-incubated with epididymal cell cultures». *Hum. Reprod.*, 12:514-522.
- BYERS, S. W.; CITI, S.; ANDERSON, J. M.; HOXTER, B. (1992). «Polarized functions and permeability properties of rat epididymal epithelial cells *in vitro*». *J. Reprod. Fertil.*, 95:385-396.
- BYERS, S. W.; DJAKIEW, D.; DYM, M. (1985). «Structural features of rat epididymal epithelial cells *in vitro*». *J. Reprod. Fertil.*, 75:401-411.
- CARBALLADA, R.; SALING, P. M. (1997). «Regulation of mouse epididymal epithelium *in vitro* by androgens, temperature and fibroblasts». *J. Reprod. Fertil.*, 110:171-181.
- COOPER, T. G.; YEUNG, C. H.; MEYER, R.; SCHULZE, H. (1990). «Maintenance of human epididymal epithelial cell function in monolayer culture». *J. Reprod. Fertil.*, 90:81-91.
- GAGNON, A.; SULLIVAN, R.; SIRARD, M. (2000). «Epididymal epithelial cells cultured *in vitro* prolong the motility of bovine sperm». *J. Androl.*, 21:842-907.
- GATTI, J. L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F.; ECROYD, H.; METAYER, S.; THIMON, V.; DACHEUX, J. L. (2004). «Post-testicular sperm environment and fertility». *Anim. Reprod. Sci.*, 82:321-339.
- HINTON, B. T.; PALLADINO, M. A. (1995). «Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment». *Microsc. Res. Tech.*, 30:67-81.
- LIN, M.; ZHANG, X.; MURDOCH, R.; AITKEN, R. J. (2000). «*In vitro* culture of brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) epididymal epithelium and induction of epididymal sperm maturation in co-culture». *J. Reprod. Fertil.*, 119:1-14.
- OLSON, G. E.; JONAS-DAVIES, J.; HOFFMAN, L. H.; ORGEBIN-CRIST, M. C. (1982). «Structural characterization of isolated rat epididymal epithelial cells». *Gamete Res.*, 6:161-178.
- PERA, I.; IVELL, R.; KIRCHHOFF, C. (1996). «Body temperature (37° C) specifically down-regulates the messenger ribonucleic acid for the major sperm surface antigen CD52 in epididymal cell culture». *Endocrinology*, 137:4451-4459.

MILLORA DE LA QUALITAT ESPERMÀTICA DE DOSIS SEMINALS DE MASCLES ASTENOTERATONECROSPÈRMICS PER FILTRACIÓ EN COLUMNES DE SEPHADEX NEUTRE

Eva Bussalleu*, Elisabeth Pinart, M. Dolors Briz, Sílvia Sancho, Núria Garcia-Gil, Elena Badia, Judit Bassols, Anna Pruneda, Marc Yeste, Isabel Casas, Sergi Bonet

Biotecnologia de la Reproducció Porcina. Departament de Biologia. Facultat de Ciències. Universitat de Girona. Campus Montilivi, s/n. 17071 Girona. Tel. 972 418 366. Fax 972 418 050. Adreça electrònica: eva.bussalleu@udg.es.

Resum

L'objectiu d'aquest estudi és millorar la qualitat espermàtica de mascles reproductors subfèrtils mitjançant la filtració de dosis seminals en columnes de Sephadex neutre. Amb aquest propòsit es van usar columnes de Sephadex G-25 Medium, G-50 Fine, G-50 Medium i Sephadex G-75 de 10+0,5 cm d'alçada. 10 ml de la fracció rica de l'ejaculació de cinquanta-vuit mascles Piétrain astenoteratonecrospermics diluïda 1:6 es van eluir a una velocitat d'1 ml/20 segons amb 40 ml de diluent BTS. La qualitat espermàtica es va analitzar abans i després de la filtració. Per a l'anàlisi de la motilitat i morfologia espermàtiques es va emprar el programa informàtic SCA®2002 Producció. La vitalitat es va analitzar a partir del triple marcatge amb fluorocroms per a la valoració conjunta de l'estat del nucli, l'acrosoma i la beina mitocondrial. Els resultats obtinguts mostren que la filtració de dosis seminals en columnes de Sephadex neutre augmenta la freqüència d'espermatozoides madurs i d'espermatozoides viables amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes, i disminueix la freqüència d'espermatozoides aberrants. De tota manera, la filtració en columnes de Sephadex neutre disminueix encara més la freqüència d'espermatozoides mòbils dels mascles porcons astenoteratonecrospermics.

Paraules clau Dosi seminal, astenoteratonecrospermia, Sephadex neutre, espermatozoide, *Sus domesticus*.

Abstract

Improvement of sperm quality of astenotheratonecrospermic boars by filtration in neuter Sephadex columns.

The aim of this study is to enhance the semen quality of subfertile boars by filtering their seminal doses in neuter Sephadex columns. For this purpose we used columns of Sephadex G-25 Medium, Sephadex G-50 Fine, Sephadex G-50 Medium and Sephadex G-75 of 10+0.5 cm of length. 10 ml of the sperm-cell rich fraction of 58 astenotheratonecrospermic Pietrain boars diluted at 1:6 were eluted with 40 ml of diluent BTS at a flow rate of 1 ml/20 seconds. Sperm quality was analysed before and after filtration. Sperm morphology and sperm motility were assessed using the computer analyzer SCA®2002 Producció. Sperm vitality was analyzed by fluorescence multistaining in order to evaluate the integrity of the nucleus, the acrosome and the mitochondrial sheath simultaneously. The results obtained showed that the filtration of sperm doses in columns of neuter Sephadex increases the frequency of mature spermatozoa and viable spermatozoa with intact acrosoma and mitochondrial sheath. The sperm filtration results in a decrease of the frequency of aberrant spermatozoa, but it also decreases the frequency of motile spermatozoa. In conclusion, neuter Sephadex columns improve the sperm morphology and sperm vitality of astenotheratonecrospermic boars, but do not enhance the low sperm motility.

Key words Seminal dose, astenotheratonecrospermia, Sephadex neuter, spermatozoa, *Sus domesticus*.

INTRODUCCIÓ

La presència d'una o diverses malalties espermàtiques a l'ejaculació dels mascles reproductors comporta importants pèrdues econòmiques a les granges i centres

d'inseminació artificial. A més, també s'ha demostrat que a l'ejaculació la presència d'espermatozoides morts o aberrants té efectes tòxics (Shannon i Curson, 1972) i lítics (Lindemann *et al.*, 1982) sobre la resta

d'espermatozoides, i conseqüentment, redueix la seva capacitat fecundant.

Per a la millora de la qualitat espermàtica de les dosis seminals s'han desenvolupat mètodes de filtració en columnes de llana de vidre, de boletes de vidre, de Leucosorb i de Sephadex, que permeten augmentar el nombre d'espermatozoides viables i mòbils, per bé que el seu efecte varia considerablement en funció de la reïna emprada i de l'espècie (Johnson *et al.*, 1996; Centola *et al.*, 1998; Adiga i Kumar, 2001). El principi de la filtració amb aquestes columnes es basa en el fet que els espermatozoides no viables són més susceptibles d'adherir-se a la reïna que no pas els espermatozoides mòbils i aparentment funcionals (Jeyendran, 2002); d'altra banda, els espermatozoides viables poden travessar la barrera de filtració sense modificar les seves característiques funcionals.

La filtració en columnes de llana de vidre i Sephadex ha permès millorar la qualitat espermàtica de les dosis seminals de mascles subfèrtils i s'aplica de forma habitual en braus (Anzar i Graham, 1995, 1996), en búfals (Ahmad *et al.*, 2003), en cavalls (Samper *et al.*, 1995; Alghamdi *et al.*, 2002) i en gossos (Mogas *et al.*, 1998).

L'objectiu d'aquest estudi és determinar l'efecte de la filtració en diferents columnes de Sephadex neutre sobre la qualitat espermàtica de dosis seminals de mascles porcs subfèrtils.

MATERIAL I MÈTODES

Per a les anàlisis es van utilitzar les ejaculacions procedents de cinquanta-vuit mascles porcs de raça Piétrain afectats d'astenoteratonecrospermia i que procedien de les empreses Semen Cardona (Cardona, el Bages) i Selecció Batallé (Riudarenes, la Selva).

L'extracció del semen es va realitzar pel mètode de la munta dels mascles sobre maniquí i masturbació manual. La fracció espermàtica es va recollir en un termo a 37° C en el qual prèviament s'havia col·locat una gasa per a eliminar la fracció de mucina. La fracció espermàtica es va diluir a la proporció 1:6 amb diluent Bestville (BTS) (Cidosa, Tecnovit, Espanya) i es va al·licuar en dosis seminals de 80 ml que van ser transportades al laboratori de Biotecnologia de la Reproducció Porcina de la Universitat de Girona refrigerades a 15° C.

Al laboratori les dosis seminals es van filtrar en quatre columnes diferents de Sephadex neutre: G-25 Medium, G-50 Fine, G-50 Medium i G-75 (Amersham Biosciences, Suècia). Per a totes les columnes l'alçada del llit de Sephadex es va establir en 10 + 0,5 cm, la temperatura de treball al laboratori de 23° C i el flux de

sortida en 1 ml/20 segons. Les dosis seminals filtrades es van eluir amb 40 ml del mateix diluent BTS.

L'anàlisi de la qualitat espermàtica de les dosis seminals es va realitzar abans i després de la filtració. Per a la valoració de la concentració espermàtica, la motilitat espermàtica i la morfologia espermàtica es va emprar el programa informàtic SCA®2002 Producció (Microptic, Barcelona, versió 2003). L'estudi de la vitalitat espermàtica es va basar en la valoració conjunta de l'estat del nucli, la integritat de la beina mitocondrial i l'estat de l'acrosoma mitjançant el mètode de la triple tinció fluorocròmica amb els fluorocroms iodur de propidi (Sigma, EUA)/bis-benzimida (Sigma, EUA), MitoTracker FM (Molecular Probes, EUA) i Alexa Fluor® 488 Conjugate (Molecular Probes, EUA) (Pinart *et al.*, 2005); l'observació es va realitzar en un microscopi d'epifluorescència Leica DMR-XA i amb els filtres DAPI, FITC i rodamina

Per a l'anàlisi estadística de l'efecte de les diferents columnes de Sephadex neutre sobre la qualitat espermàtica de les dosis seminals es va emprar el test ANOVA, inclòs al paquet estadístic SPSS per a Windows, versió 12.0, amb un nivell de significació de $P < 0,05$ i prèvia transformació $\sqrt{\text{variable}/100}$ de les variables.

RESULTATS

A la taula 1 es mostren els resultats obtinguts de l'anàlisi de la qualitat espermàtica de les dosis seminals abans i després de la filtració en columnes de Sephadex neutre.

La filtració en les quatre columnes de Sephadex neutre provoca un augment significatiu del nombre d'espermatozoides madurs respecte de les dosis no filtrades, i una disminució significativa de la freqüència d'espermatozoides amb gota distal i de la freqüència d'espermatozoides aberrants, per bé que no afecta la freqüència d'espermatozoides amb gota proximal. De totes maneres, la filtració en columnes de Sephadex G-25 Medium, G-50 Fine i G-75 també provoca un descens significatiu de la freqüència d'espermatozoides mòbils respecte de les dosis sense filtrar.

DISCUSSIÓ

Els mascles de la raça Piétrain són àmpliament utilitzats en els centres d'inseminació artificial del nostre país per a la inseminació de truges de diferents races, amb la finalitat d'aconseguir descendència amb unes determinades característiques càrniques i de creixement ràpid. Tot i la importància d'aquesta raça, molts

Taula 1 Qualitat espermàtica de les dosis seminals de mascles astenoteratonecrospermics abans i després de la filtració en columnes de Sephadex neutre.

PARÀMETRE	DOSIS		DOSIS FILTRADES		
	NO FILTRADES	Sephadex G-25 Medium	Sephadex G-50 Fine	Sephadex G-50 Medium	Sephadex G-75
Motilitat espermàtica					
% espermatozoides mòbils	57,98 % + 16,55	44,99 % + 22,49 ^a	48,67 % + 19,93	45,52 % + 20,61 ^a	46,61 % + 22,24 ^a
Vitalitat espermàtica					
% espermatozoides VBBAB ^(*)	49,77 % + 12,04	63,60 % + 8,54 ^a	62,98 % + 14,87 ^a	64,32 % + 8,94 ^a	63,87 % + 9,19 ^a
Morfologia espermàtica					
% espermatozoides madurs	64,33 % + 8,28	75,25 % + 8,01 ^a	75,26 % + 7,47 ^a	74,79 % + 7,25 ^a	75,28 % + 6,67 ^a
% espermatozoides amb gota proximal	5,54 % + 3,32	4,99 % + 2,07	4,55 % + 2,18	5,08 % + 2,59	4,75 % + 2,31
% espermatozoides amb gota distal	6,28 % + 5,00	3,49 % + 2,28 ^a	3,73 % + 2,59 ^a	3,76 % + 1,90 ^a	3,74 % + 2,72 ^a
% espermatozoides aberrants	23,85 + 3,33	16,27 + 5,92 ^a	16,46 + 5,90 ^a	16,37 + 5,46 ^a	16,23 + 5,95 ^a

(*): espermatozoide viu amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes.

Els resultats s'expressen com a mitjana % + SD.

^a valors significativament diferents respecte de la mostra no filtrada.

mascles manifesten anomalies en la qualitat espermàtica de les seues ejaculacions (Buxadé, 1984).

Sovint interessa mantenir la línia genètica d'un determinat mascle malgrat que la seva qualitat seminal sigui baixa. En aquests casos s'intenta millorar la qualitat espermàtica de les dosis seminals mitjançant l'aplicació de diferents tècniques, entre les quals destaquen la filtració en columnes de Sephadex, la filtració en llana de vidre, els gradients de Percoll, el *swim-up* i el *swim-down* (Zavos *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1996; Centola *et al.*, 1998; Adiga i Kumar, 2001).

El present estudi demostra que les columnes de Sephadex neutre milloren la qualitat espermàtica dels mascles Piétrain amb astenoteratonecrospermia, ja que augmenten la freqüència d'espermatozoides madurs i viables i disminueixen la freqüència d'espermatozoides amb gota distal i d'espermatozoides aberrants. De totes maneres, la majoria d'aquestes columnes, a excepció de la columna de Sephadex G-50 Fine, disminueixen la freqüència d'espermatozoides mòbils. Tant en boví com en porcí, s'ha demostrat que els espermatozoides han de tenir els acrosomes intactes per a poder travessar les columnes de Sephadex, ja que la integritat acrosòmica és essencial per a la interacció espermatozoide-Sephadex (Anzar *et al.*, 1995). La filtració en Sephadex neutre no altera la integritat de membrana dels espermatozoides, ja que la taxa de reacció acrosòmica espontània és molt baixa (Drobnis *et al.*, 1991). El percentatge d'espermatozoides amb l'acrosoma i la membrana intactes després de la filtració de semen de búfal en Sephadex G-10 i Sephadex G-10 + Sephadex G-10 amb intercanviadors iònics augmenta notablement (Ahmad *et al.*, 2003).

La disminució de la freqüència total d'espermatozoides aberrants en dosis seminals filtrades en Sephadex neutre també ha estat descrita en bovins (Graham i Graham, 1990). Aquests mateixos autors observen que la filtració en columnes de Sephadex neutre disminueix la freqüència d'espermatozoides amb la cua doblegada i d'espermatozoides amb anomalies cefàliques de les dosis seminals.

El descens de la freqüència d'espermatozoides mòbils es pot atribuir al fet que durant la filtració alguns substrats necessaris per a mantenir la motilitat dels espermatozoides queden retinguts, ja sigui per la mida dels porus dels diferents tipus de Sephadex o per la velocitat del flux de recollida. Fernández *et al.* (1985) consideren que els fluxos massa ràpids provoquen acomodaments del Sephadex que formen corrents d'alta velocitat que arrossegueuen els espermatozoides immòbils. Per tant, sembla que el flux emprat en el present estudi és massa ràpid; aquest flux ràpid impedeix la separació dels espermatozoides en funció de la motilitat. D'altra banda, alguns autors creuen que la temperatura a la qual es realitzen les filtracions té una influència cabdal sobre la motilitat espermàtica de les dosis eluïdes. Així, en búfals la filtració en columnes d'intercanvi iònic (Ahmad *et al.*, 2003) i en columnes de Sephadex (Heuer *et al.*, 1983) a una temperatura de 28-30° C permet obtenir una major freqüència d'espermatozoides mòbils que la filtració a 23° C. En aquest treball es va escollir una temperatura de 23° C perquè es va considerar que era fàcilment regulable amb qualsevol aparell d'aire condicionat, ja que en un futur, si els resultats són favorables, es pretén transferir a l'empresa aquest mètode de filtració per a millorar la

qualitat espermàtica de les dosis seminals de mascles subfèrtils de la raça Piétrain. Els resultats obtinguts fan pensar que serà necessari augmentar la temperatura de treball al laboratori.

Un altre factor que també pot afectar la motilitat espermàtica de les dosis eluïdes és l'alçada de les columnes (Cisale *et al.*, 2001). En el present estudi, l'alçada dels llits de Sephadex es va establir en 10 + 0,5 cm. Cisale *et al.* (2001) van provar columnes d'òxid de sílice, de boletes de vidre i de Sephadex amb diferents volums de matriu i diferents alçades. En tots els casos, un major volum de matriu permetia l'obtenció de dosis seminals de millor qualitat espermàtica. En la filtració en Sephadex, les columnes més altes proporcionaven dosis amb una elevada motilitat i vitalitat espermàtiques; l'alçada de les columnes de Sephadex no sembla tenir cap efecte sobre la integritat de l'acrosoma ni de la membrana plasmàtica ni sobre el percentatge de recuperació d'espermatozoides. Les matrius altes d'òxid de sílice també milloren la motilitat i la vitalitat espermàtiques, la integritat acrosòmica i l'estabilitat de les membranes, mentre que l'alçada de les matrius de boletes de vidre no modifica la qualitat espermàtica de les dosis recollides (Cisale *et al.*, 2001). En comparar aquestes tres reïnes amb una mateixa alçada, Sephadex dona millors resultats que les altres, possiblement com a conseqüència de les característiques de la superfície de les seves boletes (Cisale *et al.*, 2001). Per tant, sembla que existeix una certa independència del tipus de matriu, i que són els mecanismes de filtració els que tenen un paper més important en la millora de la qualitat seminal. Segons Cisale *et al.* (2001) les matrius de Sephadex, d'òxid de sílice i de boletes de vidre tenen un efecte similar en la millora de la qualitat espermàtica de les dosis, sempre i quan les condicions hidrodinàmiques estiguin controlades i s'aconsegueixin les condicions més òptimes de viscositat, temperatura i flux de cadascuna de les diferents matrius. Una rectificació en alguns d'aquests paràmetres comportaria una millora de la motilitat de les dosis filtrades, i és un aspecte a tenir en compte amb vista a futurs estudis.

Contràriament als resultats obtinguts en el present treball, en altres espècies com bovins (Anzar i Graham, 1993; Ahmad *et al.*, 2003) i búfals (Ahmad *et al.*, 2003) s'observa un augment de la freqüència d'espermatozoides mòbils després de la filtració de dosis seminals en columnes de Sephadex i en columnes d'intercanvi iònic. En bocs s'ha demostrat que les tècniques de filtració en Sephadex i els gradients de Percoll són efectius per a incrementar la motilitat espermàtica de les dosis seminals refrigerades i congelades, i fins i tot de les dosis de mascles amb astenospèrmia (Valcárcel *et al.*, 1996). En gossos, en canvi, la filtració

en Sephadex G-15 més un filtre de polipropilè produeix una disminució significativa de la motilitat total de les dosis eluïdes (Mogas *et al.*, 1998).

En conclusió, la filtració de dosis seminals de mascles Piétrain amb astenoteratonecrospermia en columnes de Sephadex neutre augmenta la morfologia i la vitalitat espermàtiques, de manera que es pot considerar un mètode efectiu per a la millora de la qualitat espermàtica de mascles subfèrtils d'interès productiu.

BIBLIOGRAFIA

- ADIGA, S.; KUMAR, P. (2001). «Influence of swim-up method on the recovery of spermatozoa from different types of semen samples». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 18(3):160-164.
- AHMAD, Z.; ANZAR, M.; SHAHAB, M.; AHMAD, N.; ANDRABI, S. M. H. (2003). «Sephadex and Sephadex ion-exchange filtration improves the quality and freezability of low-grade buffalo semen ejaculates». *Theriogenology.*, 59:1189-1202.
- ALGHAMDI, A. S.; TROEDSSON, M. H.; XUE, J. L.; CRABO, B. G. (2002). «Effect of seminal plasma concentration and various extenders on postthaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen». *Am. J. Vet. Res.*, 63(6):880-885.
- ANZAR, M.; GRAHAM, E. F. (1993). «Filtration of bovine semen. and. development of a Sephadex ion-exchange filter». *Anim. Reprod. Sci.*, 31:187-195.
- (1995). «Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen». *Theriogenology*, 43:439-449.
- (1996). «Role of sperm motility and acrosome integrity in the filtration of bovine semen». *Theriogenology.*, 45:513-520.
- BUXADÉ, C. (1984). *Ganado porcino*. Mundi Prensa.
- CENTOLA, G. M.; HERKO, R.; ANDOLINA, E.; WEISENSEL, S. (1998). «Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation». *Fertil. Steril.*, 70(6):1173-1175.
- CISALE, H. (1998). «Mejoramiento de la calidad seminal en especies de abasto. Revisión de los métodos físicos empleados sobre el semen». *Med. Vet.*, 15(9):445-453.
- CISALE, H. O.; FISCHMAN, K. L.; BLASI, C. D.; FERNÁNDEZ, H. A.; GLEDHILL, L. (2001). «Enrichment of high-quality spermatozoa in bovine semen: relative effectiveness of three filtration matrices». *Andrologia*, 33:143-150.
- DROBNIS, E. Z.; ZHONG, C. Q. I.; OVERSTREET, J. W. (1991). «Separation of cryopreserved human semen using Sephadex™ columns, washing, or Percoll gradients». *J. Androl.*, 12:201-208.
- FERNÁNDEZ, H. A.; CISALE, H.; AISEN, E. G. (1985). «Mecanismo de mejoramiento de semen bovino por filtración a través de Sephadex». *Vet. Arg.*, 2(2):144-148.
- GRAHAM, E. F.; GRAHAM, J. (1990). «The effect of whole

- ejaculate filtration on the morphology and fertility of bovine semen». *J. Dairy Sci.*, 73:91-97.
- HEUER, C.; TAHIR, N.; CRABO, B. G.; BADER, H.; SHAH, M.; SAJI, M. (1983). «A simple method for the assay of water buffalo semen by filtration through Sephadex». *Pak. Vet. J.*, 3:157-161.
- JEYENDRAN, S. R. (2002). *Interpretation of semen analysis results. A practical guide*. Cambridge University Press.
- (2002). *Sperm collection and processing methods. A practical guide*. Cambridge University Press.
- JOHNSON, D. E.; CONFINO, E.; JEYENDRAN, R. S. (1996). «Glass wool column filtration versus mini-Percoll gradient for processing poor quality semen samples». *Fertil. Steril.*, 66(3):459-62.
- JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. C. (2000). «Storage of boar semen». *Anim. Reprod. Sci.*, 62:143-172.
- LINDEMANN, C. B.; FISHER, M.; LIPTON, M. (1982). «A comparative study on the effect of freezing and frozen storage on intact and demembrated bull spermatozoa». *Cryobiol.*, 19:20-28.
- MOGAS, T.; RIGAU, T.; PIEDRAFITA, J.; BONET, S.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. (1998). «Effect of column filtration upon the quality parameters of fresh dog semen». *Theriogenology.*, 50:1171:1189.
- PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BRIZ, M.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; BASSOLS, J.; PRUNEDA, A.; CASAS, I.; BONET, S. (2005). «Assessment of the functional status of boar spermatozoa by multiple staining with fluorochromes». *ESDAR*. [Acceptat]
- SAMPER, J. C.; HAMILTON, D. W.; PRYOR, J. L.; LOSETH, H. J.; TROEDSSON, M. H. T.; CRABO, B. G. (1995). «Mechanism of Sephadex trapping of capacitated stallion spermatozoa». *Biol. Reprod. Monograph*, 1:729-737.
- SHANNON, P.; CURSON, B. (1972). «Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovine semen». *J. Dairy Sci.*, 55:615-620.
- VALCARCEL, A.; HERAS, M. A.; MOSES, D. F.; PÉREZ, L. J.; BALDASSARRE, H.; DE LAS HERAS, M. A. (1996). «Comparison between Sephadex G-10 and Percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen/thawed ram sperm». *Anim. Reprod. Sci.*, 41:215-224.
- ZAVOS, P. M. (1992). «Preparation of human frozen-thawed seminal specimens using the SpermPrep* filtration method: improvements over the conventional swim-up method». *Fertil. Steril.*, 57(6):1326-1330.

EFFECTES D'UNA ELEVADA FREQUÈNCIA D'EJACULACIÓ EN LA QUALITAT DE L'ESPERMA EPIDIDIMARI DE MASCLES REPRODUCTORS PORCINS

Anna Pruneda,* Elisabeth Pinart, M. Dolors Briz, Silvia Sancho, Núria Garcia-Gil, Elena Badia, Judit Bassols, Eva Bussalleu, Marc Yeste, Isabel Casas, Sergi Bonet

Biotecnologia de la Reproducció Porcina, Departament de Biologia. Universitat de Girona.
Montilivi, s/n. 17071 Girona. Tel. 972 418 366. Fax 972 418 150. Adreça electrònica: anna.pruneda@udg.es.

Resum

Per a determinar l'efecte d'una elevada freqüència d'ejaculacions sobre el procés de maduració espermàtica a l'epidídim s'han utilitzat tres mascles porcins postpuberals sotmesos a dues ejaculacions diàries durant quatre dies (mascles estressats) i tres mascles sotmesos a dues ejaculacions setmanals (mascles control). Per a cada mascle s'han analitzat la concentració, vitalitat, motilitat i morfologia espermàtiques al llarg del conducte epididimari; també s'ha determinat la reabsorció o secreció de fluid a cada regió epididimària a partir de la variació de la concentració espermàtica. En els mascles control s'observa una reabsorció de fluid al caput, un balanç net de secreció al corpus i un augment de la concentració espermàtica al cauda; en els mascles estressats es dona una menor reabsorció de fluid al caput, una reabsorció de fluid al corpus, i al cauda no es produeix l'acumulació d'espermatozoides. En els mascles estressats també s'observen anomalies en el desenvolupament de la motilitat espermàtica i el desplaçament de la gota citoplasmàtica al llarg del conducte epididimari. Així doncs, una elevada freqüència d'ejaculació produeix una alteració en el patró de secreció-reabsorció del fluid epididimari, que resulta en una maduració espermàtica defectiva i un desenvolupament anormal de la motilitat espermàtica.

Paraules clau *Sus domesticus*, epidídim, freqüència d'ejaculació, motilitat espermàtica, viabilitat espermàtica.

Abstract

Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from six epididymal regions in boars
This study examines the effect of a high semen-collection rhythm on epididymal sperm maturation. Three post-pubertal boars were submitted to 2 ejaculations daily for 4 days (stressed boars), and three males were ejaculated twice weekly (control males). Sperm concentration, sperm vitality, sperm motility and sperm morphology were analysed along the epididymal duct; moreover, either fluid resorption or fluid secretion was determined in each epididymal region from the variation in sperm concentration. In control boars, fluid resorption was found in the caput, a net secretory role was determined in the corpus and an increase in sperm concentration was observed in the cauda. On the other hand, in stressed boars less fluid resorption was found in the caput, fluid resorption was observed in the corpus and no accumulation of spermatozoa was determined in the cauda. Some anomalies in the development of sperm motility and the displacement of the sperm cytoplasmic droplet along the epididymal duct were also determined in stressed boars. From the results of this study, it can be concluded that a high semen-collection frequency brings about an altered resorption and secretion pattern of the epididymal fluid, which results in defective sperm maturation and abnormal development of sperm motility.

Key words *Sus domesticus*, epididymis, collection frequency, sperm motility, sperm viability.

INTRODUCCIÓ

En mamífers domèstics i en humans es coneix que hi ha diferents factors ambientals, fisiològics i de confinament, com ara el fotoperíode, la temperatura, el règim alimentari, l'estrès, les malalties i l'edat, que poden

afectar la capacitat reproductora dels mascles (Cameron, 1985; Dobson i Smith, 2000; Pinart *et al.*, 2002; Sancho *et al.*, 2004). Un dels factors de confinament que més afecten la qualitat espermàtica dels mascles reproductors és l'estrès produït per un elevat ritme d'extraccions de semen; així doncs, s'ha observat en

diferents espècies que el manteniment de mascles reproductors a una elevada freqüència d'ejaculacions es manifesta en un descens de la motilitat espermàtica i un augment de la freqüència d'espermatozoides immadurs i aberrants en l'ejaculació (Cameron, 1985; Schilling i Vengust, 1987; Bonet *et al.*, 1991; Strzezek *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 2000; Pruneda *et al.*, 2005). Aquesta disminució de la qualitat espermàtica de les ejaculacions de mascles estressats per un elevat ritme d'extraccions és conseqüència d'un trànsit accelerat dels espermatozoides a través del conducte epididimari (Schilling i Vengust, 1987; Bonet *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 2000; Pruneda *et al.*, 2005).

L'objectiu d'aquest estudi és determinar els efectes de l'estrès per l'elevat ritme d'extraccions de semen sobre el procés de secreció i reabsorció de fluid de les cèl·lules de l'epiteli epididimari, i sobre la maduració epididimària dels espermatozoides de *Sus domesticus*.

MATERIAL I MÈTODES

En aquest estudi s'han utilitzat sis mascles sans de la raça Piérain que es van mantenir a un ritme d'extraccions de dues per setmana fins a un any d'edat; posteriorment, tres es van sotmetre a dues ejaculacions diàries durant quatre dies consecutius (mascles estressats), mentre que els altres tres es van mantenir al mateix ritme d'ejaculacions (mascles control).

Passats els quatre dies de tractament es va procedir al sacrifici dels mascles. Immediatament després del sacrifici es van obtenir fragments de les sis regions epididimàries: caput proximal i distal, corpus proximal i distal, i cauda proximal i distal. Per a l'anàlisi de la motilitat, la morfologia i la vitalitat espermàtiques es van disposar fragments de les diferents regions epididimàries en plaques de Petri amb medi RPMI (Gibco, Invitrogen SA, Barcelona, Espanya) suplementat amb 10 % de sèrum fetal boví (PAA Laboratories, LabClinics, Barcelona, Espanya). La vitalitat espermàtica es va determinar mitjançant la tinció supravital d'eosina-nigrosina (Kvist i Björndahl, 2002) i l'anàlisi de la morfologia espermàtica es va realitzar a partir d'extensions tenyides amb el mètode Panòptic ràpid de QCA (Química Clínica Aplicada SA, Tarragona, Espanya) (OMS, 1999; Kvist i Björndahl, 2002). La motilitat espermàtica es va analitzar amb la cambra de Makler (Makler, 1980) després d'incubar els fragments durant quinze minuts a 37° C. Per a la determinació del percentatge de variació de la concentració espermàtica i de fluid reabsorbit a les diferents regions del conducte epididimari es disposen fragments de 30 mg en una placa de Petri amb 1 ml de PBS i es procedeix segons el protocol descrit per Goyal i Williams (1991): a)

seccionament de les mostres en fragments més petits d'1 mm³, que es mantenen en agitació suau durant 1 h; b) transferència del sobrenedant a un tub i posteriorment rentat dels fragments amb 1 ml de PBS net, que també és transferit al tub; c) centrifugació dels 2 ml de sobrenedant a 1.000 g durant deu minuts i resuspensió dels espermatozoides sedimentats amb 2 ml de PBS net; d) determinació de la concentració espermàtica per triplicat per a cada mascle en cadascuna de les regions epididimàries utilitzant la cambra de Makler (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) i la il·luminació de contrast de fases, a 125×. Els resultats s'expressen en nombre d'espermatozoides × 10⁶/ml.

A partir del recompte amb la cambra de Makler es va determinar el percentatge de variació de la concentració espermàtica i el percentatge de fluid reabsorbit entre regions, tal com s'explica a continuació:

Percentatge de variació de la concentració espermàtica entre regions:

$$\Delta CE = \frac{CE(rd) - CE(rp)}{CE(rp)} \times 100$$

on: CE(rd) = mitjana de la concentració espermàtica a la regió epididimària distal.

CE(rp) = mitjana de la concentració espermàtica a la regió epididimària proximal.

% ΔCE = percentatge de variació de la concentració espermàtica entre les dues regions.

Percentatge de fluid reabsorbit entre regions:

$$FR = \left(1 - \frac{CE(rp)}{CE(rd)}\right) \times 100$$

on: % FR = percentatge de fluid reabsorbit entre les dues regions

L'anàlisi estadística de les dades es va fer a partir del test de l'anàlisi de variància (ANOVA) per a dos factors, amb un nivell de significació de $P < 0,05$.

Per a cada grup de mascles i per a cada paràmetre espermàtic els resultats s'expressen com la mitjana ± SD ($n = 3$).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Per a tots els paràmetres analitzats es van observar diferències significatives entre els mascles control i els mascles estressats, i entre les diferents regions epididimàries (vegeu la taula 1).

Taula 1 Qualitat espermàtica al llarg del conducte epididimari dels mascles reproductors porcs control i estressats.

Paràmetres espermàtics	Mascles	Caput proximal	Caput distal	Corpus proximal	Corpus distal	Cauda proximal	Cauda distal
Percentatge de variació de la concentració espermàtica (%)	Controls	—	2,777,26 ± 311,12	-57,70 ± 2,53	23,17 ± 12,64	66,23 ± 14,03	97,59 ± 12,36
	Estressats	—	25,37 ± 12,52	19,57 ± 4,10	19,02 ± 3,20	-16,41 ± 2,12	-25,99 ± 0,81
Percentatge de fluid reabsorbit (%)	Controls	—	96,49 ± 0,40	-137,13 ± 14,03	17,34 ± 8,52	38,79 ± 5,52	49,09 ± 3,23
	Estressats	—	18,89 ± 7,83	14,95 ± 2,88	15,62 ± 2,31	-22,01 ± 3,38	-38,14 ± 0,81
Vitalitat espermàtica (%)	Controls	91,44 ± 1,64	89,11 ± 2,36	79,22 ± 2,04	88,33 ± 1,45	82,33 ± 0,67	83,67 ± 1,15
	Estressats	64,67 ± 1,76	79,44 ± 2,01	83,67 ± 1,45	84,89 ± 2,22	88,44 ± 2,83	86,00 ± 3,51
Motilitat espermàtica (%)	Controls	12,15 ± 2,08	38,84 ± 8,16	50,53 ± 8,36	56,45 ± 4,11	72,90 ± 2,86	82,44 ± 2,28
	Estressats	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	3,67 ± 1,67	8,00 ± 0,67	10,22 ± 0,51	13,00 ± 0,58
Morfologia espermàtica							
Esp. amb gota proximal (%)	Controls	90,56 ± 1,50	18,11 ± 5,70	9,67 ± 0,33	5,00 ± 1,73	7,00 ± 1,67	9,67 ± 1,00
	Estressats	62,00 ± 2,60	7,00 ± 0,88	5,44 ± 0,51	11,44 ± 1,83	9,78 ± 1,83	35,00 ± 2,52
Esp. amb gota medial (%)	Controls	0,44 ± 0,19	53,78 ± 7,60	2,22 ± 1,02	0,89 ± 0,51	1,22 ± 0,84	1,44 ± 0,84
	Estressats	2,00 ± 0,00	55,33 ± 3,84	3,22 ± 0,51	1,00 ± 1,00	1,67 ± 0,58	3,44 ± 1,35
Esp. amb gota distal (%)	Controls	0,00 ± 0,00	22,11 ± 4,76	70,89 ± 10,45	83,89 ± 1,68	79,78 ± 1,07	73,11 ± 3,6
	Estressats	0,11 ± 0,19	20,22 ± 2,34	69,00 ± 3,61	70,89 ± 3,40	68,33 ± 2,00	34,89 ± 4,53

Els resultats s'expressen com la mitjana ± SD ($n = 3$).

Per a tots els paràmetres analitzats es van observar diferències significatives entre ambdós tipus de mascles i entre les diferents regions epididimàries ($P < 0,05$).

Al caput epididimari dels mascles reproductors control s'observa un augment de la concentració espermàtica, que es correlaciona amb una intensa activitat de reabsorció de fluid; d'altra banda, al corpus epididimari la disminució de la concentració espermàtica s'atribueix a un balanç net de secreció de fluid, mentre que al cauda epididimari l'augment de la concentració espermàtica és conseqüència de la seva funció d'emmagatzematge. Aquest patró d'absorció i secreció de fluid epididimari és similar al descrit a la majoria d'espècies de mamífers (Crabo, 1965; Turner, 1984; Goyal i Williams, 1991). D'altra banda, en els mascles sotmesos a una elevada freqüència d'ejaculació es produeixen canvis en el patró de reabsorció/secreció de fluid al llarg del conducte epididimari. Així doncs, al caput epididimari la reabsorció de fluid és menor que en els mascles control; al corpus no s'observa un balanç net de secreció, i al cauda no es produeix una acumulació d'espermatozoides.

En els mascles control la freqüència d'espermatozoides vius es manté relativament estable al voltant del 85 % al llarg del conducte epididimari. D'altra banda, en els mascles sotmesos a dues ejaculacions diàries durant quatre dies s'observa una disminució de la vitalitat espermàtica, per bé que només al caput proximal. Contràriament, Strzezek *et al.* (1995) determinaren que el manteniment de mascles reproductors porcins a un ritme d'una ejaculació diària durant deu dies es manifestava en un increment del percentatge d'espermatozoides no viables en l'ejaculació. Aquestes divergències estan relacionades molt probablement amb els diferents mètodes emprats en l'anàlisi de la viabilitat espermàtica (Kvist i Björndahl, 2002), tot i que d'altres factors com la raça, l'edat i el confinament s'ha demostrat que tenen un efecte directe sobre la vitalitat espermàtica (Bonet *et al.*, 1991; Strzezek *et al.*, 1995).

En els mascles control la motilitat espermàtica augmenta de forma progressiva al llarg de l'epidídim, mentre que en els mascles estressats la motilitat espermàtica és inferior a totes les regions epididimàries. Estudis previs ja havien demostrat que una elevada freqüència d'ejaculacions provocava una disminució de la motilitat espermàtica en les ejaculacions de mascles porcins (Bonet *et al.*, 1991; Strzezek *et al.*, 1995). La disminució de la motilitat espermàtica és conseqüència del menor temps de residència dels espermatozoides al conducte epididimari (Schilling i Vengust, 1987; Bonet *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 2000) i també del canvi en el patró d'absorció i de secreció de fluid al llarg del conducte descrit al present estudi.

L'anàlisi de la morfologia espermàtica indica que en els mascles control la gota citoplasmàtica migra des d'una posició proximal a una posició distal durant

el seu trànsit a través del caput i el corpus epididimaris. Segons Harayama *et al.* (1996) i Pruneda *et al.* (2005), en els mascles porcins l'expulsió de la gota distal es produeix en el moment de l'ejaculació, i és induïda per la fructosa del fluid de les vesícules seminals (Harayama *et al.*, 1996). En els mascles sotmesos a un elevat ritme d'extraccions, en canvi, un 40 % dels espermatozoides presents al cauda distal mantenen la gota citoplasmàtica en posició proximal. Aquestes anomalies en la migració de la gota citoplasmàtica són conseqüència tant del menor temps de residència dels espermatozoides al conducte epididimari, com del diferent patró de secreció i reabsorció de fluid al caput i al corpus. Probablement, aquests canvis en el patró de secreció i reabsorció de l'epiteli epididimari provoquen alteracions en el balanç iònic i proteic del fluid epididimari, que interfereixen en la migració de la gota citoplasmàtica al llarg del conducte (Haidl *et al.*, 1993; Yeung *et al.*, 1993).

Així doncs, els resultats d'aquest estudi indiquen que una elevada freqüència d'ejaculació produeix una alteració en el patró de secreció-reabsorció del fluid al caput i al corpus epididimaris, que resulta en una maduració espermàtica defectiva i un desenvolupament anormal de la motilitat espermàtica.

BIBLIOGRAFIA

- BONET, S.; BRIZ, M.; FRADERA, A. (1991). «The sperm quality and fertility of boars after two different ejaculation frequencies». *Scientia Gerund.*, 17:77-84.
- CAMERON, R. D. (1985). «Factors influencing semen characteristics in boars». *Aust. Vet. J.*, 62:293-297.
- CRABO, B. (1965). «Studies on the composition of epididymal content in bulls and boars». *Acta Vet. Scand.*, 6(5):1-94.
- DOBSON, H.; SMITH, R. F. (2000). «What is stress, and how does it affect reproduction?» *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61:743-752.
- GOYAL, H. O.; WILLIAMS, C. S. (1991). «Regional differences in the morphology of the goat epididymis: a light microscopic and ultrastructural study». *Am. J. Anat.*, 190:349-369.
- HAIDL, G.; BADURA, B.; HISCH, K. D.; GHYCZY, M.; CARREIB, J.; SCHILL, W. B. (1993). «Disturbances of sperm flagella due to failure of epididymal maturation and their possible relationship to phospholipids». *Hum. Reprod.*, 8(7):1070-1073.
- HARAYAMA, H.; SHIBUKAWA, T.; MIYAKE, M.; KANNAN, Y.; KATO, S. (1996). «Fructose stimulates shedding of cytoplasmic droplets from epididymal boar spermatozoa». *Reprod. Fert. Dev.*, 8:1039-1043.
- KVIST, U.; BJÖRND AHL, L. (2002). *Manual on Basic Semen Analysis*. ESHRE Monographs. Oxford: Oxford University Press.

- MAKLER, A. (1980) «The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation». *Fertil. Steril.*, 33:337-338.
- OMS (1999). *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. 4a ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- PINART, E.; BONET, S.; BRIZ, M.; PASTOR, L. M.; SANCHO, S.; GARCÍA, N.; BADIA, E.; BASSOLS, J. (2002). «Histological study of the interstitial tissue in scrotal and abdominal boar testes». *Vet. J.*, 163:68-76.
- PRUNEDA, A.; PINART, E.; BRIZ, M.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; KÁDÁR, E.; BASSOLS, J.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. (2005). «Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars». *Theriogenology*. [En premsa]
- SANCHO, S.; PINART, E.; BRIZ, M.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; BASSOLS, J.; KADAR, E.; PRUNEDA, A.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; COLL, M. G.; BONET, S. (2004). «Semen quality of postpubertal boars during increasing and decreasing natural photoperiods». *Theriogenology*, 62:1271-1282.
- SCHILING, E.; VENGUST, M. (1987). «Frequency of semen collection in boars and quality of ejaculates as evaluated by the osmotic resistance of acrosomal membranes». *Anim. Reprod. Sci.*, 12:283-290.
- STRZEZEK, J.; KORDAN, W.; GLOGOWSKI, J.; WYSOCKI, P.; BORKOWSKI, K. (1995). «Influence of semen-collection frequency on sperm quality in boars, with special reference to biochemical markers». *Reprod. Dom. Anim.*, 30:85-94.
- TANAKA, A.; KUWABARA, S.; TAKAGI, Y.; NAKAGAWA, K.; FUJIMOTO, Y.; MURAI, M.; TSUTSUI, T. (2000). «Effect of ejaculation intervals on semen quality in cats». *J. Vet. Med. Sci.*, 62(11):1157-1161.
- TURNER, T. T. (1984). «Resorption versus secretion in the rat epididymis». *J. Reprod. Fertil.*, 72:509-514.
- YEUNG, C. H.; COOPER, T. G.; OBERPENNING, F.; SCHULZE, H.; NIESCHLAG, E. (1993). «Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis». *Biol. Reprod.*, 49:274-280.

CAPACITAT REDUÏDA DE FECUNDACIÓ I DE GESTACIÓ DELS OÒCITS MI QUE MADUREN A MII EL MATEIX DIA DE LA PUNCIÓ

Ivan Solvas, Mark Grossmann, M. Carme Pons,* Ivette Vanrell, Elena Coloma, Elena Castellanos, Javier Nadal

Unitat de Reproducció Assistida. Centro Médico Teknon.

Vilana, 12. 08022 Barcelona. Tel. 932 906 296. Fax 932 906 297. Adreça electrònica: ura@cmteknon.com.

Resum

Estudi retrospectiu de cent vint-i-dos cicles de FIV-ICSI en els quals, conjuntament amb els oòcits MII, també es microinjectaren oòcits que havien madurat de MI a MII. Els resultats indiquen una menor taxa de fecundació i de gestació dels embrions derivats d'aquests oòcits que evolucionen de MI a MII en el mateix dia de la punció.

Paraules clau Oòcits MI madurats, ICSI, desenvolupament embrionari *in vitro*.

Abstract

Reduced fertilization and pregnancy capacities of the oocytes recovered at MI-stage and that they reached the MII-stage before the moment of performing ICSI Retrospective study of 122 ICSI-IVF cycles in which oocytes matured from MI-stage to MII-stage were microinjected at the same time than their sibling MII oocytes. Our results show lower fertilization and pregnancy rate in the embryos which derived from this MI > MII oocytes.

Key words MI oocyte maturation, ICSI, embryo *in vitro* development.

INTRODUCCIÓ

Per a maximitzar l'èxit dels protocols de fecundació *in vitro* (FIV) és freqüent que les dones se sotmetin a tractaments hormonals d'estimulació ovàrica per tal d'obtenir més oòcits. Però atès que els oòcits estan presents en els ovaris en estadis immadurs, no solament cal obtenir-ne un bon nombre, sinó que cal que aquests oòcits es trobin en el moment apropiat del seu cicle maduratiu. La rutina diària demostra que no tots els oòcits que es recuperen d'una punció ovàrica es troben en el mateix estadi maduratiu.

D'ençà de la introducció de la tècnica d'ICSI (Palermo *et al.*, 1992), és imprescindible alliberar els oòcits de les cèl·lules del cúmul i de la corona que els envolten (procés de denudació). Aquest procés permet visualitzar amb detall els oòcits i classificar-los en tres categories en funció del seu estadi maduratiu: oòcits de metafase II, metafase I o profase I.

Hom considera que només són aptes per a ser fecundats els oòcits en estadi de metafase II (oòcits MII).

D'altra banda, se sap que oòcits recuperats en es-

tadis precoços de maduració (sobretot en estadi MI) poden madurar en condicions de cultiu *in vitro* i extrusionar el primer corpuscle polar, senyal evident que han assolit l'estadi de metafase II, almenys des del punt de vista de l'activitat nuclear.

A la bibliografia científica coexisteixen treballs que indiquen que es poden microinjectar els oòcits MI que assoleixen l'estadi de MII (De Vos *et al.*, 1999), amb treballs que desaconsellen l'ús d'aquests oòcits, atesa la seva reduïda capacitat de desenvolupament (Cuadros *et al.*, 2003).

Aquest estudi revisa les nostres dades sobre el rendiment de la microinjecció espermàtica d'oòcits recuperats en estadi de metafase I que assoleixen l'estadi de metafase II entre una i quatre hores després del procés de denudació, amb l'objectiu de decidir si és o no una opció útil en la rutina del nostre laboratori.

MATERIAL I MÈTODES

Estudi retrospectiu de cent vint-i-dos cicles de FIV-ICSI realitzats a la Unitat de Reproducció Assistida (URA) del Centro Médico Teknon durant el període comprès entre l'1 de gener de 2003 i el 12 de març de 2005. En aquest mateix període el total de cicles d'ICSI realitzats fou de 578. Totes les pacients van rebre tractament d'estimulació ovàrica amb gonadotropines i els oòcits foren els propis de la dona receptora dels embrions transferits.

El criteri d'inclusió en aquest estudi va ser cicles de FIV-ICSI que disposessin d'almenys un oòcit MI que hagués madurat a MII en el període comprès entre la denudació i la realització de la ICSI.

Punció ovàrica ecoguiada programada trenta-sis hores després de l'administració d'hCG. Els complexos cúmulo-oòcit obtinguts es netejaren en medi G-MOPS i s'incubaren en medi G-FERT en condicions de cultiu *in vitro* (37° C, 6 % CO₂ i 95 % humitat relativa) fins al moment de denudar els oòcits (procés enzimàtic en medi HYASE i mecànic en medi G-MOPS) i de fer-ne la valoració morfològica.

Tant els oòcits en metafase II com els oòcits MI es deixaren, en medi fresc G-FERT fins al moment de realitzar la ICSI, entre una i quatre hores després de la denudació.

Microinjecció espermàtica realitzada en medis ICSI i G-MOPS, amb micropipetes COOK i HUMAGEN, segons protocols estàndards. Tant els oòcits MII (grup MII) com els oòcits MI injectats en MII (grup MI>MII) es cultivaren individualment en gotes de medi G1 durant 17-19 h fins a la determinació, en microscopi invertit, de la fecundació. Només els zigots amb dos pronuclis es cultivaren en medi G1 fresc fins al dia +3.

Valoració morfològica del desenvolupament, també en microscopi invertit, a les 24-27 h, a les 40-42 h i també a les 64-66 h després d'ICSI.

Transferència embrionària en dia +3. Se seleccionaren preferentment els embrions generats a partir dels oòcits del grup MII. En conseqüència, només es transferiren embrions procedents del grup MI>MII en els casos en que no hi hagué embrions del grup MII o bé quan aquests eren de qualitat inferior a la dels d'oòcits MI>MII.

Totes les transferències embrionàries foren ecoguiades, s'usà medi EMBRYO-GLUE, i es realitzà eclosió assistida mitjançant solució àcida de Tyrode si la baixa qualitat dels embrions o l'edat de la pacient (> 37 anys) així ho indicaven.

Anàlisi estadística: *Unpaired t test* i *Fisher's exact test*.

S'avaluen les taxes de fecundació i de divisió, tant

del grup MII com del grup MI>MII i les taxes de gestació de les transferències realitzades.

RESULTATS

En els cent vint-i-dos cicles de FIV-ICSI estudiats, es microinjectaren 793 oòcits en el grup MII i 178 oòcits en el grup MI>MII. La mitjana d'edat de les pacients fou de 34,8 anys (25-44 anys) i els resultats globals es mostren a la taula 1.

La taxa de fecundació dels oòcits MI>MII fou estadísticament molt inferior a la dels oòcits del grup MII (28 *versus* 61 %, $P < 0,0001$).

En comparar la taxa de fecundació dels oòcits del grup MII amb la taxa general de fecundació dels oòcits MII dins el programa d'ICSI en la nostra unitat i en el mateix període de temps s'observa que la diferència és força significativa (61 *vs.* 66,6 % respectivament, $P < 0,03$; dades no presentades).

Pel que fa a la divisió dels zigots, aquells procedents d'oòcits MI>MII presentaren taxes també inferiors a la dels procedents d'oòcits del grup MII (82 *vs.* 94,8 %, $P < 0,01$).

Hi hagué transferència d'embrions en cent vint-i-un dels cent vint-i-dos cicles estudiats, distribuïts de la següent manera: en cent quatre casos (86 %) es transferiren exclusivament embrions procedents d'oòcits del grup MII, en tretze cicles (10,7 %) es transferiren embrions procedents tant d'oòcits MI>MII com MII, i en quatre casos (3,3 %) es transferiren únicament embrions procedents d'oòcits MI>MII.

Pel que fa a la taxa de gestació, s'observà que fou del 33,7 % quan es transferiren embrions procedents d'oòcits del grup MII, valor que és molt inferior i estadísticament diferent al 50 % que correspon a la taxa general de gestació en la nostra unitat i en el mateix període de temps ($P < 0,01$, dades no presentades).

A la taula 2 es mostra que no hi ha diferències en la taxa de gestació entre els dos grups d'aquest estudi.

De les tretze transferències mixtes, és a dir, en les que es van transferir embrions tant del grup MII com del grup MI>MII, cinc van donar positiu per la β hCG, de les quals una va ser una gestació bioquímica i quatre foren evolutives. D'aquestes quatre, dues ja tenen un nadó nascut i dues encara estan en curs. En cadascun d'aquests quatre casos es van transferir dos embrions (un de cada grup) i van implantar sis dels vuit embrions transferits, encara que en dos no es va detectar batec cardíac. Per tant, aquest tipus d'embrions tenen capacitat d'implantació.

L'única transferència en què es van transferir embrions procedents exclusivament d'oòcits MI>MII va resultar en una gestació bioquímica. De Vos *et al.* (1999)

Taula 1 Taxes de fecundació i divisió entre els dos grups d'estudi. (Nombre de casos inclosos: cent vint-i-dos.)

	Grup MII	Grup MI>MII	P
Nombre d'òcits recuperats (mitjana per cicle)	793 (6,5)	178 (1,4)	
Nombre de 2PN després d'ICSI (mitjana per cicle)	487 (4,0)	50 (0,4)	
Taxa de fecundació	61 %	28 %	< 0,0001
Taxa de divisió dels zigots	94,8 %	82 %	< 0,01

Taula 2 Taxa de gestació per transferència. (Nombre de casos inclosos: cent vint-i-un.)

	n	Nre. gestacions (%)
Només del grup MII	104	35 (33,7%) ^a
Mixtes, dels grups MI>MII i MII13	5	5 (38,5%) ^a
Només del grup MI>MII	4	1 (20%) ^a

^a: NS

publiquen una gestació a termini entre quinze transferències amb embrions procedents d'òcits MI>MII.

Finalment, es van fer dos subgrups de casos en funció del nombre d'òcits en estadi MII recuperats en el moment de la denudació: un subgrup amb els casos en els quals hi hagué més de cinc òcits MII i l'altre, amb quatre o menys òcits MII. La taula 3 mostra els resultats en ambdós subgrups.

DISCUSSIÓ

Pel que fa a les taxes de fecundació (vegeu la taula 1), el percentatge observat en òcits del grup MI>MII és molt més baix que l'obtingut en els òcits del grup MII, dades que coincideixen amb Cuadros *et al.* (2003), De Vos *et al.* (1999) i Strassburger *et al.* (2004), però que contradiuen les de Chen *et al.* (2000).

Certs estudis (Balakier *et al.*, 2004; De Vos *et al.*, 1999) atorguen molta importància al lapse que transcorre entre l'extrusió del primer corpuscle polar (CP) i la ICSI, ja que demostren que la taxa de fecundació dels òcits MI>MII augmenta si s'allarga el temps entre aquests dos processos, ja que la maduració oocitària no acaba en l'extrusió del CP, sinó que cal que tinguin lloc una colla de fenòmens citoplasmàtics que preparin l'òciti per a la fecundació.

Atès que el present estudi s'ha realitzat sense modificar la rutina diària del laboratori de reproducció, el fet que la microinjecció dels òcits del grup MI>MII es va fer en el mateix moment que en els altres, podria explicar la baixa taxa de fecundació dels òcits MI>MII.

De totes maneres, la taxa de fecundació dels òcits del grup MII inclosos en aquest estudi també és baixa,

i és inferior a la del programa de FIV-ICSI. Aquesta minva no és atribuïble a l'edat de les dones, ja que la mitjana de 34,8 anys i el rang entre 25 i 44 anys no és diferent de la de la població general de les nostres pacients. Les nostres dades no aporten cap indici de la possible causa.

Pel que fa al desenvolupament embrionari, els treballs de De Vos *et al.* (1999) i de Chen *et al.* (2000) no detecten diferències de desenvolupament entre els dos tipus d'òcits, mentre que les dades publicades per Cuadros *et al.* (2003) i Strassburger *et al.* (2004) observen una marcada pèrdua de viabilitat en els embrions derivats del grup d'òcits MI>MII. Les condicions de cultiu *in vitro* són diferents entre equips, i també el dia en el qual es fa la transferència, fets que poden justificar la diversitat de resultats.

En la nostra rutina, tots els embrions de bona qualitat no transferits es mantenen en cultiu *in vitro* i es criopreserven si assoleixen l'estadi de blastocist. Cap dels embrions procedents dels òcits del grup MI>MII no s'ha criopreservat (dades no presentades), fet que orienta sobre la seva reduïda capacitat de desenvolupament.

Pel que fa a les taxes de gestació, no es detecten diferències estadísticament significatives entre cap dels tres grups de transferències (vegeu la taula 2).

Finalment, en separar els casos en funció del nombre d'òcits MII inicials (vegeu la taula 3), observem que la taxa de fecundació continua essent significativament menor en el grup d'òcits MI>MII, tant si la resposta ovàrica fou bona o no. Ara bé, si només es transfereixen embrions procedents de MII, la taxa de gestació és significativament menor en el subgrup de baixa resposta que en el subgrup d'òcits MII > 5.

De fet, la taxa de gestació en aquest grup òcits MII > 5 (41,7%) no difereix estadísticament de la taxa global del programa de FIV-ICSI (50%). Això indicaria que en aquests cicles de bona resposta ovàrica, les possibilitats de gestació augmenten significativament perquè el major nombre d'embrions permet fer una millor selecció entre els embrions a transferir.

Com a conclusió es pot dir que els òcits MI>MII presenten una taxa de fecundació i de divisió inferior a la dels òcits del grup MII.

A més a més, com a segona conclusió, les nostres

Taula 3 Taxes de fecundació i gestació per transferència en els dos subgrups.

	Subgrup oòcits MII ≥ 5			Subgrup oòcits MII < 5		
	MII	MI > MII		MII	MI > MII	
Nre. de casos inclosos	79 cicles			43 cicles		
Mitjana edat dones	34,3 anys			35,9 anys	< 0,1	
Nre. oòcits recuperats	686	116		107	62	
Mitjana	8,7	1,5		2,5	1,4	
Nre. 2PN després d'ICSI	423	30		64	20	
Mitjana	5,4	0,4		1,4	0,5	
Taxa de fecundació	61,6 %	25,9 %	< 0,001	59 %	32 %	< 0,001
<i>Transfers</i> només grup MII	72			32		
Taxa gestació	41,7 % ^a			15,6 % ^b		< 0,01
<i>Transfers</i> mixtes grups MII i MI > MII	7			6		
Taxa gestació	28,5 % ^a			50 % ^b		NS
<i>Transfers</i> només grup MI > MII	0			4		
Taxa gestació				20 % ^b		

^{a,b}: NS

dades indiquen que la microinjecció espermàtica dels oòcits MI > MII en el mateix moment que la resta d'oòcits no augmenta la possibilitat de gestació en cicles amb bona resposta ovàrica. Ara bé, en cicles amb una baixa resposta, disposar d'embrions derivats d'oòcits MI > MII augmenta les possibilitats de gestació en aquests casos de mal pronòstic.

Nota: A vegades, aquest procés maduratiu d'oòcits recuperats en estadi MI i que evolucionen fins a l'estadi MII induït per les condicions de cultiu és anomenat *maduració in vitro*, denominació que afegeix un punt de confusió amb els oòcits realment madurats *in vitro* (MIV), és a dir, aquells oòcits immadurs obtinguts d'ovaris sense cap estimulació hormonal externa i portats a maduració en medis complexos.

BIBLIOGRAFIA

- BALAKIER, H.; SOJECKI, A.; MOTAMEDI, G.; LIBRACH, C. (2004). «Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear during metaphase II arrest». *Hum. Reprod.*, 19:982-987.
- CUADROS, J. M.; MARTÍNEZ, M.; ANDRÉS, L.; SÁNCHEZ DE BURGOS, M.; ACEVEDO, B.; RICCIARELLI, E.; HERNÁNDEZ, E. R. (2003). «Los ovocitos que maduran a MII el día de la punción ovárica no son de la misma calidad que los maduros». *Revista ASEBIR*, 8(2):88.
- CHEN, S. U.; CHEN, H. F.; LIEN, Y. R.; HO, H. N.; CHANG, H. C.; YANG, Y. S. (2000). «Schedule to inject in vitro matured oocytes may increase pregnancy after intracytoplasmic sperm injection». *Arch. Androl.*, 44:197-205.
- DE VOS, A.; VAN DE VELDE, H.; JORIS, H.; VAN STEIRTEGHEM, A. (1999). «In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection». *Hum. Reprod.*, 7:1859-1863.
- PALERMO, G.; JORIS, H.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A. (1992). «Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte». *Lancet*, 340:17-18.
- STRASSBURGER, D.; FRIEDLER, S.; RAZIEL, A.; KASTERSTEIN, E.; SCHACHTER, M.; RON-EL, R. (2004). «The outcome of ICSI of immature MI oocytes and rescued in vitro matured MII oocytes». *Hum. Reprod.*, 19:1587-1590.

AVALUACIÓ DEL RENDIMENT DE FECUNDACIÓ *IN VITRO* EN DONES MAJORS DE QUARANTA ANYS

Imma Saumell,* Anna Veiga, Bonaventura Coroleu, Pere N. Barri

Servei de Medicina de la Reproducció. Institut Universitari Dexeus.
Pg. Bonanova, 67. 08017 Barcelona. Adreça electrònica: immsau@dexeus.com.

Resum

Els resultats de les tècniques de reproducció assistida no són iguals per a tot el rang d'edats de la població femenina. Es coneix que aquelles dones de més edat presenten un rendiment i unes taxes de gestació inferiors comparades amb les dones de menys edat alhora que unes taxes d'avortaments més altes. S'analitzen cadascun dels paràmetres valorables del procés de fecundació *in vitro* a través dels resultats obtinguts en dones d'edat superior a quaranta anys del Servei de Medicina Reproductiva de l'Institut Universitari Dexeus.

Paraules clau Edat materna, eficiència en fecundació *in vitro*.

Abstract

The results of Assisted Reproduction Techniques are not equal for all rank of ages in the female population. It is known that elderly women have low efficiency and rates of pregnancy compared to younger women, also, higher abortion rates. All the valuable parameters of an *in vitro* fertilization (IVF) cycle are analyzed from the results in women over 40 years at the Institut Universitari Dexeus.

Key words Maternal age, *in vitro* fertilization efficiency.

INTRODUCCIÓ

La naturalesa finita de la gametogènesi femenina provoca que l'edat de les pacients que se sotmeten a tècniques de reproducció assistida sigui una de les principals preocupacions dels experts en medicina reproductiva. L'aplicació de tècniques de reproducció assistida a tot el ventall de població ens permet valorar la pèrdua subclínica de la capacitat d'embaràs de les dones al llarg dels anys. És per aquest motiu que es planteja estudiar l'eficiència del programa de fecundació *in vitro* per a dones d'edat avançada.

Amb vista a obtenir dades objectives del rendiment de la tècnica i de les possibilitats d'embaràs en aquest grup de pacients, s'estudien els resultats obtinguts en parelles de FIV en què la dona té una edat superior a quaranta anys.

PACIENTS I MÈTODES

Estudi retrospectiu basat en la casuística del programa de fecundació *in vitro* de l'Institut Universitari Dexeus comprès entre els anys 2001 i 2004. La població va ser dividida en dos grups, el *grup d'estudi* (dones ≥ 40 anys) i el *grup control* (dones < 40 anys).

El grup d'estudi constava de 947 cicles en dones amb una mitjana d'edat de 41,8 anys, dels quals el 48,0% eren un primer cicle de FIV. Pel que fa al grup control, constava de 3.547 cicles en dones amb una mitjana d'edat de 34,0 anys, dels quals un 55,5% era un primer cicle de FIV. (Vegeu la taula 1.)

El diagnòstic d'esterilitat que aconsellava la tècnica de FIV en el grup d'estudi era majoritàriament un factor femení (42,1%). En el grup control el tipus d'indicació més freqüent era masculina (41,0%). Tanmateix, en el grup d'estudi s'observava un increment de les indicacions d'origen desconegut i en aquest mateix grup hi havia una major proporció d'esterilitat secundària. (Vegeu la taula 2.)

El mètode estadístic que es va utilitzar per a tractar

Taula 1

	n	Edat	Nombre de cicle (%)			
			1r	2n	3r	+3
≥ 40 anys	947 (21,15)	41,81	48,0	25,6	12,3	14,1
< 40 anys	3.547 (78,9)	34,05	55,5	24,3	10,1	10,1

Taula 2

	Tipus indicació (%)*			Tipus esterilitat (%)*		
	Idiopàtica	femelles	mascles	mixt	primària	secundària
≥ 40 anys	19,0	42,1	31,2	7,7	68,6	31,4
< 40 anys	15,5 %	35,0	41,0	8,4	80,3	19,7

Taula 3

	Cancellació estimulació (%)*	FSH basal (UI)*	Estradiol basal (UI)*	Taxa embaràs per cicle (%)*
≥ 40 anys	15,3	9,29	74,09	12,6
< 40 anys	8,9	7,62	60,70	39,3

Taula 4

	Protocol llarg (%)*	Protocol curt (%)*	Altres (%)*
≥ 40 anys	23,7	64,4	12,0
< 40 anys	71,1	21,8	7,1

Taula 5

	Total dosis gonadotropines (UI)*	Total dies estimulació*	Estradiol dia HCG (pg/ml)*	Nombre fol·licles dia HCG*
≥ 40 anys	3863,13	10,22	1642,09	7,04
< 40 anys	3006,05	10,57	2095,19	11,57

Taula 6

	Oòcits recuperats*	MII*	Inseminats*	Fecundats*
≥ 40 anys	6,90	5,38	5,83	4,07
< 40 anys	12,24	9,41	9,41	7,24

les dades va ser el paquet estadístic SPSS versió 12.0 amb variables qualitatives comparades amb el test de Fisher i χ^2 de Pearson; per a les variables quantitatives es va treballar amb la prova *T* d'Student i l'anàlisi de variances ANOVA. El nivell de significació era $\alpha < 0,05$. En totes les taules $P < 0,05$.

RESULTATS

Rendiment clínic

En l'estudi de reserva fol·licular que es realitzava previ al cicle de fecundació *in vitro* (FSH, estradiol basal)

s'observava una diferència significativa entre els dos grups de treball. Les dones d'edat avançada tenien tant el valor de FSH més alt (9,2) com el d'estradiol (74,0) contràriament al grup de dones joves (FSH de 7,6 i estradiol de 60,7). En el grup de dones grans hi havia un percentatge més alt de cancel·lació de l'estimulació (15,3), enfront d'una taxa de cancel·lació inferior (8,9) en dones joves. (Vegeu la taula 3.)

El tipus de protocol d'estimulació utilitzat dins de cada grup presentava diferències significatives. Les dones del grup d'estudi es tractaven en un 64,4 % amb protocol d'agonistes curt; en canvi, les dones del grup control es tractaven en un 71,1 % amb protocol d'agonistes llarg. (Vegeu la taula 4.)

Taula 7

	ICSI (%)	Inseminació convencional (%)	Combinada (%)	Taxa de fecundació (%)
≥ 40 anys	66,5	29,2	4,3	69,25
< 40 anys	72,0	17,7	10,2	72,33

Taula 8

	Embrions evolutius*	Embrions congelats*	Embrions disponibles òptims (8, 9, 10)*	Nombre d'embrions transferits	Trànsfer selectiu*
≥ 40 anys	2,82	0,85	1,38	2,26	29,6
< 40 anys	4,41	2,39	2,35	2,12	56,6

Taula 9

	Taxa d'embaràs per punció*	Taxa d'embaràs per punció i per cicle				Taxa d'embaràs per trànsfer
		1r*	2n*	3r*	+3*	
≥ 40 anys	14,8	15,8	12,7	15,2	15,0	17,0
< 40 anys	43,1	46,1	41,5	37,5	36,0	45,2

Taula 10

	Avort. < 10 setm.*	Avort. > 10 setm.	ILE	Ectòpics
≥ 40 anys	32,8	0	0,8	3,4
< 40 anys	12,8	2,2	0,4	1,4

Durant el cicle d'estimulació es van buscar diferents paràmetres que permetessin avaluar l'evolució de l'estimulació ovàrica. Comparats els dels dos grups, es trobaren diferències significatives. Les dones de ≥ 40 anys necessitaven més dies d'estimulació (10,9 vs. 10,5 en el protocol llarg) i més dosi de gonadotropines (3863 uI vs. 3006 uI) tot i que el dia de la descàrrega ovulatòria de HCG tant el nombre de fol·licles (7,0 vs. 11,5) com el valor d'estradiol (1.642 pg/ml vs. 2.095 pg/ml) eren inferiors que en les dones de < 40 anys. (Vegeu la taula 5.)

Rendiment al laboratori de fecundació *in vitro*

Una vegada es realitzava la punció fol·licular l'estudi continuava amb les dades provinents del laboratori de fecundació *in vitro*.

En el grup d'estudi la mitjana d'oòcits recuperats (6,9 vs. 12,2) era realment molt més baixa que en el grup control, i aquest fet reflectia un potencial embrionari més baix. Es mantenia, doncs, la significació d'inferioritat en el nombre d'oòcits madurs, oòcits inseminats i el nombre d'oòcits fecundats. (Vegeu la taula 6.)

La tècnica d'inseminació utilitzada era diferent en els dos grups analitzats. En les pacients d'edat avançada en un 66,5 % dels casos es preferia la ICSI com

a mètode de fecundació i un 29,2 % es realitzava amb inseminació convencional. Aquesta estratègia es mantenia en les pacients joves pel que fa a la ICSI (72,0 %), tot i que el percentatge d'inseminació convencional era significativament més baix (17,7 %). (Vegeu la taula 7.)

La mitjana d'embrions evolutius en dones d'edat avançada ja preveia que el nombre d'embrions congelats i el nombre d'embrions òptims disponibles era significativament inferior que en dones joves. La transferència intrauterina es realitzava amb major nombre d'embrions (2,2 vs. 2,1) en el grup d'estudi. (Vegeu la taula 8.)

Una vegada més, el grup de dones majors de quaranta anys presentava una baixa taxa d'embaràs, ja fos enfront de les puncions (14,8 %) realitzades com de les transferències (17,0 %), comparant-ho amb el grup de dones més joves, que presentava unes taxes més altes tant per punció (43,1 %) com per transferència (45,2 %). Es mantenia constant la taxa d'embaràs per punció en dones ≥ 40 anys, independentment del nombre de cicles que es realitzaven. No era així en dones < 40 anys, en què la taxa d'embaràs per punció disminueix en repetir cicles de FIV. (Vegeu la taula 9.)

Taula 11

	Únic	Bessons	Triple o més
≥ 40 anys	75,6	21,0	3,4
< 40 anys	67,8	29,0	3,2

Evolució de l'embaràs

La taxa d'avortaments ≤ 10 setmanes era de 32,8 % en el grup d'estudi però en el grup control disminueix fins al 12,8 %. No es van trobar diferències significatives en la taxa d'avortaments > 10 setmanes, els ILE ni tampoc en els embarassos ectòpics. (Vegeu la taula 10.)

No hi havia diferències significatives entre els grups de dones ≥ 40 anys i el grups de dones < 40 anys si els embarassos eren únics o múltiples. (Vegeu la taula 11.)

DISCUSSIÓ

El percentatge de dones ≥ 40 anys que se sotmeten a FIV no ha augmentat des de 2001, i es manté al voltant d'un 21 % respecte del total de FIV que es realitzen.

És representatiu de la pèrdua de la fecunditat en el grup de dones d'edat avançada el fet que presentin com a causa d'esterilitat un factor femení en més percentatge, i l'edat esdevé un factor afegit. Part d'aquest grup de pacients ja han estat mares prèviament i han adquirit una esterilitat secundària que augmenta amb l'edat.

Rendiment clínic

Determinar els valors de FSH i estradiol basals ens permetrà predeterminar la reserva ovàrica de la paciència; l'estudi constata que aquests valors incrementen amb l'edat, i per tant són uns bons marcadors. El grup de dones d'edat avançada tenia una taxa de cancel·lació de l'estimulació més alta, ja que en més ocasions es dona una baixa resposta ovulatòria.

D'acord amb el perfil hormonal i ecogràfic de les paciències es decideix un tipus de protocol d'estimulació esperant una millor resposta. En global, els protocols d'agonistes llargs donen millors taxes d'embaràs, però en el nostre centre utilitzem protocols d'agonistes curts en paciències amb una reserva fol·licular baixa perquè s'han obtingut millors resultats.

Durant l'estimulació les dones del grup d'estudi precisen més dosis de gonadotropines, ja que els seus ovaris són més resistents. A més a més, la resposta que s'aconsegueix acostuma a ser més baixa, ja que

el nombre de fol·licles i el valor d'estradiol el dia de l'HCG mostrava una resposta més modesta.

Rendiment al laboratori de fecundació in vitro

Obtenir el màxim nombre d'oòcits garanteix un millor rendiment de tot el procés, i en les paciències que després de la punció aconseguen pocs oòcits es redueixen les possibilitats, com passava en el grup de dones d'edat major. Aquest grup partia de menys oòcits, i s'acabava disposant d'un nombre d'embrions òptims baix i, per tant, no es podien fer *trànfers* selectius. Igualment la taxa de congelació era molt baixa comparat amb les dones < 40 anys. Els percentatges d'oòcits madurs MII i la taxa de fecundació és similar en ambdós grups.

Cal destacar que el percentatge d'inseminació convencional era menor en dones < 40 anys i es tendia a fer més ICSI. Aquest fenomen es justifica perquè aquestes paciències presentaven majoritàriament un factor d'esterilitat masculí que és la principal indicació per a realitzar ICSI. Les taxes d'embaràs que aconseguen les dues tècniques d'inseminació, ICSI i inseminació convencional, són similars.

Pel que fa al nombre d'embrions transferits cal esmentar que a partir de l'any 2003 l'Institut Universitari Dexeus va iniciar un programa que reduïa el nombre d'embrions transferits, i es va aconseguir així disminuir els embarassos múltiples. Cal tenir en compte que el mateix nombre d'embrions transferits a una dona ≥ 40 anys i una dona de < 40 anys dona taxes d'embaràs diferents. S'aconsegueix una millor taxa d'embaràs si es transfereix una mitjana de tres embrions en les dones de ≥ 40 anys. No és així en dones de < 40 anys, ja que si es transfereixen tres embrions és perquè no es disposa d'embrions òptims.

És important observar que la taxa d'embaràs per punció en dones d'edat avançada es manté constant i, per tant, es pot oferir el mateix percentatge d'embaràs a aquestes paciències quan repeteixen un cicle de FIV. Ara bé, en el grup de dones joves la taxa d'embaràs disminueix a la vegada que es repeteixen cicles.

Evolució de l'embaràs

Existeix un risc significatiu de pèrdua fetal a causa de l'alt nivell d'aneuploidies que presenten els embrions provinents de gàmetes femenins de dones ≥ 40 anys. El cariotip d'aquests fetus presenta majoritàriament trisomies que afecten els cromosomes 21, 16, 22, 15 i 18. Aquestes aneuploidies fetals semblen ser les responsables de l'alta taxa de pèrdua fetal espontània en dones d'edat avançada durant les primeres setmanes de gestació. Per aquest motiu, proposem que aquestes

pacients podrien beneficiar-se d'un cribratge cromosòmic a través d'un DGPI, i així se'n reduiria la taxa d'avortaments.

Les dades científiques són evidents. Així, doncs, l'edat de les pacients pot ser en si un factor pronòstic d'un cicle de fecundació *in vitro*, ja que la fecunditat disminueix amb l'edat. D'aquesta manera, caldria advertir a les pacients que es troben en aquest rang d'edat les possibilitats que els ofereixen les tècniques de reproducció assistida plantejant la possibilitat d'una donació d'òcits. Ara bé, cal no subestimar la possibilitat d'embaràs de la pròpia pacient.

BIBLIOGRAFIA

- BARRI, P. N.; COROLEU, B.; MARTÍNEZ, F. [*et al.*](2000). «Stimulation protocols for poor and aged women». *Molecular and Cellular Endocrinology*, 166:15-20.
- BARRI, P. N.; COROLEU, B.; TUR, R. [*et al.*](2002). «Reproduccion humana». Dins: REMOHÍ, J.; PELLICER, A.; SIMON, C.; NAVARRO, J. *Edad de la mujer y fertilidad*, 2a ed. McGraw-Hill Interamericana.
- KLEIN, N. A.; BATTAGLIA, D. E.; FUJIMOTO, V. Y. [*et al.*](1996). «Reproductive aging: Accelerated ovarian follicular development associated with a monotropic FSH rise in normal older women». *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81:1038-1045.
- HULL, M. G. R.; FLEMING, C. F.; HUGHES, A. O. [*et al.*](1996). «The age related decline in female fecundity: a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after IVF». *Fertil. Steril.*, 65(4):783-790.
- RON-EL, R.; RAZIEL, A.; STRASSBURGER, E. D. [*et al.*](2000). «Outcome of assisted reproductive technology in women over the age of 41». *Fertil. Steril.*, 74(3):471-475.
- SOCIETY FOR ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY IN USA (2000). «Results generated from the ASRM and SART Registry». *Fertil. Steril.*, 74(4):641-653.
- SPANDORFER, S. D.; DAVIS, O. K.; BARMAT, L. I.; CHUNG, P. H.; ROSENWAKS, Z. (2004). «Relationship between maternal age and aneuploidy *in vitro* fertilization pregnancy loss». *Obstetrical & Gynecological Survey*. 59(11):773-774.
- TARIN, J. J.; PEREZ-ALBALÁ, S.; CANO, A. (2000). «Consequences on offspring of abnormal function in ageing gametes». *Hum. Reprod. Update*, 6(6):532-548.

ECLOSIÓ ASSISTIDA I MONOZIGOCITAT

Baltasar Gornals,* Itziar Belil, Ramon Aurell, Anna Veiga, Pedro N. Barri

Servei de Medicina de la Reproducció. Departament d'Obstetrícia i Ginecologia. Institut Universitari Dexeus.
Passeig de la Bonanova, 89-91. 08017 Barcelona. Tel. 932 274 700. Fax 932 057 966. Adreça electrònica: balgor@dexeus.com.

Resum

S'ha suggerit que la incidència de bessons monozigòtics (MZ) és més freqüent després d'un procés de fecundació *in vitro* (FIV) amb tècniques de micromanipulació. Aquest increment podria ser degut en part als tractaments estimuladors de l'ovulació amb gonadotropines emprats en aquests casos. Les tècniques d'*assisted hatching* (AH) o eclosió assistida, tècnica de micromanipulació dissenyada per a facilitar la sortida de l'embrió de la zona pel·lúcida (ZP) s'utilitzen per a incrementar la implantació embrionària. En el present estudi es van analitzar de forma retrospectiva els resultats obtinguts de la transferència d'embrions, en fresc o congelats, procedents de cicles FIV, i sotmesos a la tècnica d'*assisted hatching* per afinament de la ZP. Les transferències embrionàries es van realitzar tant el dia +3 com el dia +5 de cultiu embrionari. De les cent trenta-nou transferències realitzades es van aconseguir quaranta-cinc embarassos, vint-i-sis d'únics i divuit de múltiples. Només va obtenir-se un embaràs monozigòtic (2,2%), procedent d'un cicle de criotransferència. Aquest fet ens podria dur a pensar que a més de les tècniques de micromanipulació, els processos de congelació-descongelació amb l'exposició dels embrions a elevades concentracions de crioprotector i a molt baixes temperatures podrien afavorir la formació de monozigòtics, tot i que serien necessaris més estudis per a confirmar aquesta hipòtesi.

Paraules clau Bessons monozigòtics, fecundació *in vitro*, zona pel·lúcida, eclosió assistida.

Abstract

Assisted hatching and monozygosity It has been suggested that monozygotic (MZ) twinning incidence is more frequent after *in vitro* fertilization cycles (FIV) with micromanipulation techniques. This increase might be in part due to ovulation induction treatments with gonadotrophins used in these cases. Assisted hatching technique (AH), a micromanipulation technique designed to facilitate the embryo to escape from the zona pellucida (ZP), is used to increase embryo implantation. In the present study, the results obtained from fresh or frozen-thawed embryo transfers, corresponding FIV cycles with assisted hatching thinning of the ZP, were retrospective analyzed. Embryo transfers were performed on day 3 or 5 of development. A total of 45 pregnancies were obtained from 139 embryo replacements, 26 singles and 18 multiples. Just one monozygotic twinning (2,2%) was obtained which proceeded from a cryotransfer cycle. It suggests us that not only micromanipulation techniques, but also frozen-thawed process with high level of cryoprotector exposition and very low temperatures could enhance monozygotic twinning. Further studies should be necessary in order to confirm this hypothesis.

Key words Monozygotic twinning, fertilization *in vitro*, zona pellucida, assisted hatching.

INTRODUCCIÓ

Els bessons monozigòtics (MZ) resulten de la divisió d'un únic oòcit fertilitzat en dos embrions genèticament idèntics, i s'ha descrit que aquest fenomen ocorre en el 0,42% de tots els embarassos duts a terme (Bulmer, 1970). La gestació múltiple monozigòtica és un fet preocupant a causa de l'associació amb l'augment de la mortalitat i morbiditat a causa de la gestació

múltiple en general (Kiely, 1998; Guyer *et al.*, 1997; Pharoah *et al.*, 1996; Gardner *et al.*, 1995; Spellacy *et al.*, 1990) i a la gestació múltiple monozigòtica en particular. El risc de mortalitat perinatal dels bessons MZ s'ha descrit com a dues o tres vegades superior al risc dels bessons dizigòtics (DZ) (Kovacs *et al.*, 1989; Naeye *et al.*, 1978).

S'ha suggerit que la formació d'aquest tipus de bessons MZ és més freqüent després d'un procés de

Taula 1 Cicles d'AH per afinament de ZP. Resultats clínics globals i en funció del dia de transferència.

	Total	D+3	D+5
Nombre de pacients	139	119	20
Mitjana edat (anys)	36,9 ± 3,8	37,4 ± 3,7	34,2 ± 3,4 ^a
Mitjana oòcits inseminats	9,7 ± 7,0	8,3 ± 5,5	17,9 ± 9,2
Fecundats <i>n</i> (%)	997 (74,0)	721 (72,9)	276 (77,0)
Nombre embrions evolutius <i>n</i> (%)	506 (50,7)	425 (58,9)	81 (29,3)
Mitjana embrions transferits	2,2 ± 0,6	2,3 ± 0,6	2,0 ± 0,5
Embaràs <i>n</i> (%)	45 (32,4)	35 (29,4)	10 (50,0) ^b
Taxa implantació (%)	20,0	16,8	42,5
Avortaments <i>n</i> (%)	15 (33,3)	12 (34,3)	3 (30,0)
Únics <i>n</i> (%)	26 (57,8)	23 (65,7)	3 (30,0)
Múltiples <i>n</i> (%)	18 (40,0)	11 (31,4)	7 (70,0)
Nombre monozigòtics (%)	1 (2,2)	1 (2,9)	0

^a $P < 0,05$ per al test *t* d'Student amb comparació de la mitjana d'edat de la transferència del dia +3 o +5 de desenvolupament.

^b Test de Fisher no significatiu amb comparació de la taxa d'embaràs de la transferència del dia +3 o dia +5 de desenvolupament.

fecundació *in vitro* (FIV) (Edwards *et al.*, 1986) encara que la veritable incidència està emmascarada pels *transfers* de múltiples embrions i el bloqueig dels embrions en les primeres etapes del desenvolupament. Aquest fenomen està atribuït a un gran nombre de factors, incloent-hi el tractament inductor de l'ovulació amb gonadotropines, les condicions de cultiu *in vitro*, anomalies morfològiques de la zona pellúcida (ZP), la formació de múltiples cavitats en els blastocists, i l'obertura artificial de la zona pellúcida amb tècniques de micromanipulació (Aurell *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 1990; Edwards *et al.*, 1986; Yorich *et al.*, 1984).

La tècnica d'*assisted hatching* (AH) o eclosió assistida suposa la reducció del gruix o la perforació total de la ZP dels embrions mitjançant la manipulació mecànica, per acció de substàncies químiques o enzimàtiques, o per tecnologia làser. Aquestes tècniques han estat utilitzades durant els últims deu anys per a incrementar les taxes d'implantació embrionària, en els casos que poden estar associats amb un gruix o duresa anormal de la zona pellúcida d'alguns dels embrions fecundats *in vitro* (Nakayama *et al.*, 1998; Antinori *et al.*, 1996; Tucker *et al.*, 1991; Cohen, 1991).

Els estudis que avaluen l'efectivitat dels mètodes d'AH per a augmentar les taxes d'embaràs suggereixen que aquests procediments poden presentar un benefici per a determinats subgrups de pacients amb difícil tractament, com per exemple l'edat materna avançada o múltiples cicles errats (Meldrum *et al.*, 1998; Chao *et al.*, 1997; Tao *et al.*, 1997; Schoolcraft *et al.*, 1995). No obstant això, s'han publicat una sèrie d'articles on es conclou que l'ús de les tècniques de l'*assisted hatching* impliquen un augment en les taxes de bessons monozigòtics (Yakin *et al.*, 2003; Sheen *et al.*, 2001;

Schieve *et al.*, 2000; Herslag *et al.*, 1999; Meldrum *et al.*, 1998).

En el present estudi es van analitzar de forma retrospectiva els resultats de cent trenta-nou cicles sotmesos a la tècnica d'*assisted hatching* per afinament de la ZP. Es va avaluar la taxa d'embaràs i d'implantació i la incidència de bessons monozigòtics.

MATERIALS I MÈTODES

Pacients i període de l'estudi

Un total de cent trenta-nou cicles de FIV amb AH van ser realitzats des del maig de 2002 fins al gener de 2005 en el Departament d'Obstetrícia i Reproducció de l'Institut Universitari Dexeus. Les causes d'esterilitat van ser tant masculines com femenines, o bé sense causa aparent.

L'estimulació ovàrica es va aconseguir mitjançant un dels dos protocols: *a*) gonadotropines i agonistes, *b*) gonadotropines i antagonistes. La gonadotropina coriònica humana (HCG) va ser administrada a tots els pacients quan els oòcits complien els criteris de maduresa i la punció oocitària es realitzava per aspiració via transvaginal guiat per ultrasons trenta-sis hores després. En dos cicles de criotransferència el tractament va ser substituït amb gestàgens.

Inseminació i cultiu dels embrions

La inseminació dels oòcits va realitzar-se mitjançant la fecundació *in vitro* convencional o bé FIV-ICSI, depenent de la qualitat espermàtica. Els espermatozoides

podien provenir tant de cònjuge com de donant (FIV-IAD) anònim. També s'han utilitzat espermatozoides testiculars obtinguts mitjançant aspiració (TESA) o mitjançant l'extracció testicular i posterior congelació (TESEC).

El cultiu dels gàmetes i embrions va ser amb el sistema de cultiu de Vitrolife (Gotheborg, Suècia) segons les indicacions del seu manual.

Assisted hatching

D'un total de 997 embrions obtinguts, 314 van ser micromanipulats per tal de fer l'*assisted hatching*. Es va fer servir un làser (Fertilase, Medical Technologies Montreux SA, Clarens, Suïssa) enganxat al microscopi invertit. L'embrió, subjectat per una pipeta Holding (Humagen, EUA), era exposat a l'acció fotolítica del làser en una regió de la ZP allunyada dels blastòmers. La ZP no va ser totalment disseccionada, només s'afinava el gruix de la zona emprant de dos a nou trets. La mesura del gruix de la ZP es va fer en quatre punts oposats. Així mateix, es va registrar la longitud de la zona afinada.

Trànsfer dels embrions

La transferència es va realitzar el dia 3 o 5 de desenvolupament, depenent de l'estat dels embrions i de la presència d'antecedents de mala implantació. L'AH dels embrions amb millor qualitat es realitzava com a mínim trenta minuts abans del *trànsfer*.

En dos casos la transferència es va fer amb embrions que havien estat criopreservats el dia +3 de cultiu. Es van descongelar el dia 16 del cicle endomètric de la pacient i es van transferir el dia següent.

Com a tractament de la fase lútea va administrar-se progesterona via vaginal des del dia del *trànsfer* (dos dies abans en el CT) i va continuar diàriament fins a la menstruació o fins a la setmana 10 de gestació.

L'embaràs clínic està definit com un embaràs intrauterí amb activitat cardíaca fetal, mentre que considerem com a embaràs monozigòtic aquells embarassos en què el nombre de batecs fetals observats amb ultrassò en una etapa primerenca excedeix el nombre d'embrions que han estat transferits o els signes ecogràfics indiquen que són monozigòtics.

RESULTATS

L'edat mitjana (\pm SD) de totes les pacients analitzades durant el període de l'estudi va ser $36,9 \pm 3,8$ anys. Les pacients havien estat sotmeses anteriorment a una mitjana de $3,9 \pm 2,0$ *trànsfers* previs al present estudi.

Els oòcits van ser inseminats mitjançant la FIV convencional en vint-i-set cicles (semen procedent de la parella o banc de semen) o FIV-ICSI en cent set cicles (semen de la parella o testicular). Als cinc cicles restants es va fer servir la FIV combinant la inseminació convencional i ICSI.

Respecte a l'*assisted hatching*, la mitjana del gruix de les zones pellúcides afinades va ser de $17,1 \pm 3,9$ μm , i de l'espai afinat, $47,6 \pm 11,1$ μm . Es van disparar una mitjana de $4,2 \pm 1,5$ trets de làser amb una durada de $7,9 \pm 1,6$ ms. No van detectar-se diferències significatives quant al nombre i durada dels trets entre els embrions als quals es va fer el *hatching* el dia +3 o dia +5.

Pel que respecta als embarassos, vint-i-sis van ser únics i divuit múltiples, dels quals un va ser monozigòtic, procedent d'un cicle de criotransferència. La resta de resultats clínics globals i dels embrions transferits en el dia +3 o dia +5 s'observen a la taula 1.

DISCUSSIÓ

Hi ha evidències que la inducció a l'ovulació mitjançant gonadotropines està associada amb un augment de la taxa de bessons monozigòtics fins a valors similars a l'1,5% (Derom *et al.*, 1987; Edwards *et al.*, 1986). Segons alguns autors, en realitzar FIV amb tècniques de micromanipulació, aquesta taxa varia entre 1,2-8,9% (Tarlantzis *et al.*, 2002; Abusheika *et al.*, 2000; Sills *et al.*, 2000; Herschlag *et al.*, 1999; Alikani *et al.*, 1994; Edwards *et al.*, 1986). En el present estudi la taxa de bessons monozigòtics obtinguda és del 2,2%, amb la qual cosa està compresa dins dels valors publicats.

La finalitat de l'afinament de la zona pellúcida per làser (*assisted hatching thinning*) és facilitar l'eclosió o *hatching* de l'embrió i així afavorir la implantació en aquelles pacients amb problemes previs d'implantació. Sembla ser que l'estructura de la ZP pot alterar-se amb el làser i es provoca un enduriment d'aquesta. Aquest enduriment podria ser el responsable d'una mala eclosió de l'embrió, amb una escissió de la massa celular interna i la conseqüent divisió de l'embrió, que dona lloc a dos embrions idèntics, és a dir, monozigòtics.

Cal destacar que l'únic bessó monozigòtic obtingut provenia d'un dels dos *criotransfers* realitzats. Aquest fet ens podria dur a pensar que, a més de les tècniques de micromanipulació, els processos de congelació-descongelació amb exposició dels embrions a elevades concentracions de crioprotector i baixes temperatures podrien afavorir un augment en la taxa de monozigocitat, probablement a causa de possibles canvis en l'estructura de la ZP que podrien provocar un enduri-

ment. Seria interessant iniciar una nova via d'estudi per determinar si els protocols de congelació i descongelació influeixen sobre la taxa de monozigocitat.

Tenint en compte la baixa incidència de la monozigocitat, per tal d'obtenir resultats més concloents, seria aconsellable recollir dades de sèries més àmplies mitjançant estudis multicèntrics, i analitzar de forma homogènia les diferents tècniques aplicades.

BIBLIOGRAFIA

- ABUSHEIKHA, N.; SALHA, O.; SHARMA, V.; BRINDEN, P. (2000). «Monozygotic twinning and IVF/ICSI treatment: a report of 11 cases and review of literature». *Hum. Reprod. Update.*, 6(4):396-403. Erratum in: *Hum. Reprod. Update* (2000) 6(6):621.
- ALKANI, M.; NOYES, N.; COHEN, J.; ROSENWAKS, Z. (1994). «Monozygotic twinning in the human is associated with the zona pellucida architecture». *Hum. Reprod.*, 9:1318-1321.
- ANTINORI, S.; SELMAN, H. A.; CAFFA, B.; PANCI, C.; DANI, G. L.; VERSACI, C. (1996). «Zona opening of human embryos using a non-contact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy». *Hum. Reprod.*, 11:2488-2492.
- AURELL, R.; BELIL, I.; VEIGA, A.; BARRI, P. N. (2004). «Micromanipulation and the risk of multiple pregnancy». *Multiple pregnancy. Epidemiology, gestational and perinatal outcome*. Cap. 78: 1-5. Lancaster (RU): Parthenon.
- BULMER, M. G. (1970). *The biology of twinning in man*. Oxford: Clarendon Press.
- CHAO, K. H.; CHEN, S. U.; CHEN, H. F.; WU, M. Y.; YANG, Y. S.; HO, H. N. (1997). «Assisted hatching increases the implantation and pregnancy rate of in vitro fertilization (IVF) embryo transfer (ET), but not that of IVF-tubal ET in patients with repeated IVF failures». *Fertil. Steril.*, 67:904-908.
- COHEN, J.; ELSNER, C.; KORT, H.; MALTER, H.; MASSEY, J.; MAYER, M. P.; WEIMER, K. (1990). «Impairment of hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation». *Hum. Rep.*, 5:7-13.
- COHEN, J. (1991). «Assisted hatching of human embryos». *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer.*, 8:179-190.
- DEROM, C.; VLIETNCK, R.; DEROM, R. [*et al.*](1987). «Increased monozygotic twinning rate after ovulation induction». *Lancet*, 1(8544):12366-1238.
- EDWARDS, R. G.; METTLER, L.; WALTERS, D. E. (1986). «Identical twins and in vitro fertilization». *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer*, 3:114-117.
- GARDNER, M. O.; GOLDENBERG, R. L.; CLIVER, S. P.; TUCKER, J. M.; NELSON, K. G.; COPPER, R. L. (1995). «The origin and outcome of preterm twin pregnancies». *Obstet. Gynecol.*, 85:553-557.
- GUYER, B.; MARTIN, J. A.; MACDORMAN, M. F.; ANDERSON, R. N.; STROBINO, D. M. (1997). «Annual summary of vital statistics 1996». *Pediatrics*, 100:905-918.
- HERSLAG, A.; PAINE, T.; COOPER, G. W.; SCHOLL, G. M.; RAWLINSON, K.; KVAPIL, G. (1999). «Monozygotic twinning associated with mechanical assisted hatching». *Fertil. Steril.*, 71:144-146.
- KIELY, J. L. (1998). «What is the population-based risk of preterm birth among twins and other multiples?». *Clin. Obstet. Gynecol.*, 41:3-11.
- KOVACS, B. W.; KIRSCHBAUM, T. H.; PAUL, R. H. (1989). «Twin gestations. I. Antenatal care and complications». *Obstet. Gynecol.*, 74:313-317.
- MELDRUM, R. D.; WISOT, A.; YEE, B.; GARZO, G.; YEO, L.; HAMILTON, F. (1998). «Assisted hatching reduces the age-related decline in IVF outcome in women younger than age 43 without increasing miscarriage or monozygotic twins». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 15:418-421.
- NAEYE, R. L.; TAFARI, N.; JUDGE, D.; MARBOE, C. C. (1978). «Twins: causes of perinatal death in 12 United States cities and one African city.» *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 131:267-272.
- NAKAYAMA, T.; FUJIWARA, H.; TASTUMI, K.; FUJITA, K.; HIGUCHI, T.; MORI, T. (1998). «A new assisted hatching technique using a piezo-micromanipulator». *Fertil. Steril.*, 69:784-788.
- PHAROAH, P. O. D.; COOKE, T. (1996). «Cerebral palsy and multiple births». *Arch. Dis. Child.*, 75:F174-177.
- SCHIEVE, L. A.; MEIKLE, S. F.; PETERSON, H. B.; JENG, G.; BURNETT, N. M.; WILCOX, L. S. (2000). «Does assisted hatching pose a risk for monozygotic twinning in pregnancies conceived through in vitro fertilization?». *Fertil. Steril.*, 74:288-294.
- SCHOOLCRAFT, W. B.; SCHLENKER, T.; JONES, G. S.; JONES, H. W. (1995). «In vitro fertilization in women age 40 and older: the impact of assisted hatching». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 12:581-584.
- SHEEN, T. C.; CHEN, S. R.; AU, H. K.; CHIEN, Y. Y.; TZENG, C. R. (2001). «Herniated blastomere following chemically assisted hatching may result in monozygotic twins». *Fertil. Steril.*, 74:946-952.
- SILLS, E. S.; MOOMJY, M.; ZANINOVIC, N.; VEECK, L. L.; MC GEE, M.; PALERMO, G. D.; ROSENWAKS, Z. (2000). «Human zona pellucida micromanipulation and monozygotic twinning frequency after IVF». *Hum. Reprod.*, 15:890-895.
- SPELLACY, W. N.; HANDLER, A.; FERRE, C. D. (1990). «A case-control study of 1253 twin pregnancies from a 1982-1987 perinatal data base». *Obstet. Gynecol.*, 75:168-171.
- TAO, J.; TAMIS, R. (1997). «Application of assisted hatching for 2-day-old, frozen-thawed embryo transfer in a poor-prognosis population». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 14:128-130.
- TARLATZIS, B. C.; QUBLAN, H. S.; SANOPOULOU, T.; ZEPERIDIS, L.; GRIMBIZIS, G.; BONTIS, J. (2002). «Increase in the monozygotic twinning rate after intracytoplasmic sperm injection and blastocyst stage embryo transfer». *Fertil. Steril.*, 77(1):196-198.
- TUCKER, M. J.; COHEN, J.; MASSEY, J. B.; MAYER, M. P.;

- WIKER, S. R.; WRIGHT, G. (1991). «Partial dissection of the zona pellucida of frozen-thawed human embryos may enhance blastocyst hatching, implantation, and pregnancy rates». *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 165:341-345.
- YAKIN, K.; BALABAN, B.; URMAN, B. (2003). «Risks of monochorionic pregnancies after assisted hatching?» *Fertil. Steril.*, 79:1044-1046.
- YORICH, J. L.; STRANGER, J. D.; GRAU AUG, A.; LUNAY, G.; DAWKINS, R. L.; MULCAHY, M. T. (1984). «Monozygotic twins from in vitro fertilization». *Fertil. Steril.*, 41:833-837.

DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL PER CRIBRATGE D'ANEUPLOÏDIES. RESULTATS PER INDICACIONS

Clara Mangrané,^{1*} Mònica Parriego,¹ Francesca Vidal,² Marta Sánchez,^{1,2} Montserrat Boada,¹ Anna Veiga,¹ Pere N. Barri¹

Servei de Medicina de la Reproducció. Institut Universitari Dexeus.
Tel. 932 274 700. Fax 932 057 966. Adreça electrònica: *claman@dexeus.com*.

Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.
Bellaterra. Barcelona.

Resum

Objectius. Comparar els percentatges d'embrions anormals entre els diferents grups establerts per indicacions. Conèixer si els cromosomes implicats en les anomalies observades varien en funció de la indicació. **Materials i mètodes.** Van analitzar-se 444 embrions procedents de quaranta-set cicles de FIV-DGP per a les següents indicacions: avortaments de repetició (AR), factor masculí (FM), fallada d'implantació (FI), concepcions prèvies afectes (CPA). Van aplicar-se dues rondes consecutives d'hibridació, i es van avaluar en la primera els cromosomes 13, 16, 18, 21, 22; en la segona, els sexuals i el 15. **Resultats.** En tots els grups estudiats s'ha trobat un elevat grau d'alteracions cromosòmiques, sense trobar-se diferències significatives entre si. El percentatge d'anomalies per als cromosomes sexuals observat va ser significativament superior en els casos de FM, mentre que les anomalies per al cromosoma 15 van observar-se amb més freqüència en els casos de AR i FI. **Conclusions.** L'elevat percentatge d'anomalies trobat justifica l'ús del diagnòstic genètic preimplantacional en aquests grups de pacients de mal pronòstic. Els nostres resultats indicarien que existeix certa relació entre la indicació i els cromosomes implicats en les alteracions.

Paraules clau Cribratge d'aneuploidies, FISH-DGP, avortaments de repetició, fallada d'implantació, factor masculí.

Abstract

Objectives. To compare abnormal embryo percentage among different groups established by indications. To know whether the chromosomes implied in anomalies vary in relation to the indication. **Materials and Methods.** 444 embryos from 47 IVF-PGD cycles have been analysed under the indications: Recurrent miscarriage (RM), implantation failure (IF), male factor (MF), previous affected pregnancies (PAP). Two consecutive rounds of FISH were used to evaluate chromosomes 13, 16, 18, 21, 22 and 15, X and Y, respectively. **Results.** High percentage of abnormal embryos have been observed in all groups. No statistically differences have been found among indications, although sex chromosomes in MF and chromosome 15 in RM and IF were statistically different from the rest. **Conclusions.** The high percentage of abnormality found in all groups of patients should justify the PGD. Our results show certain relationship between the chromosomes affected and PGD indication.

Key words Aneuploidy screening, FISH-PGD, recurrent miscarriages, implantation failure, male factor.

INTRODUCCIÓ

L'aplicació del diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) ha variat significativament des dels seus inicis. El perfeccionament de les tècniques de micromanipulació i de cultiu embrionari ha permès tant una

important millora en els resultats obtinguts com també una expansió en l'aplicació de la tècnica.

Actualment, ja no solament les parelles amb un elevat risc genètic es beneficien dels programes de DGP, sinó que els principals candidats que s'orienten envers cicles de FIV-DGP resulten ésser parelles infèrtils, en les quals s'estima que la producció d'embrions anor-

Taula 1 Percentatge d'anormalitat per cromosoma en funció de la indicació ($\chi^2 P < 0,05$).

Cromosoma	13	15	16	18	21	22	Sexuals
AR	46,3 %	48,8 %**	55,4 %	37,5 %	47,4 %	66,1 %	29,5 %
FM	44,7 %	20,0 %	52,0 %	48,7 %	42,9 %	56,0 %	48,6 %*
FI	45,1 %	45,5 %**	58,0 %	38,5 %	55,6 %	47,5 %	33,3 %
EPC	54,2 %	20,0 %	58,3 %	39,1 %	34,8 %	54,2 %	30,8 %
Total	46,2 %	38,3 %	55,5 %	41,6 %	47,5 %	55,3 %	38,2 %

* Significativament diferent en la columna.

** Significativament diferents de les altres dues indicacions de la columna.

mals és superior a l'habitual (Zenzes i Casper, 1992). D'aquesta manera, la selecció dels embrions caracteritzats com a normals per als cromosomes analitzats tindria l'objectiu, per una banda, d'augmentar la taxa d'implantació embrionària i, per l'altra, de disminuir la d'avortament amb la qual cosa, en definitiva, hi hauria una millora de les taxes de nens nascuts vius i sans. Tot i això, en tractar-se d'una tecnologia relativament recent, les parelles candidates que s'orienten a un cribratge d'aneuploidies varien entre els centres, ja que els resultats que hi ha fins al moment no són del tot concloents. Un estudi de Rubio *et al.* publicat el 2003 va mostrar un increment significatiu en el percentatge d'embrions anormals en parelles que havien tingut dos o més avortaments previs (AR), i suggereix la utilitat de l'aplicació d'aquesta tècnica en aquestes parelles. A diferència d'això, en un altre estudi recent (Staessen *et al.*, 2004) no observen un benefici en l'aplicació de DGP quan la indicació és l'edat materna avançada (AMA) i no hi ha restriccions en el nombre d'embrions a transferir. Poden trobar-se resultats discordants quan la indicació és la presència d'un factor masculí sever (FM) (Silber *et al.*, 2003; Aran *et al.*, 2004), o en parelles amb fallada d'implantació (FI) (Pehlivan *et al.*, 2002; Gianaroli *et al.*, 1999). Per finalitzar, una última indicació que augmenta en freqüència és la de parelles que han tingut dues o més concepcions prè-

vies afectes de cromosomopaties (CPA) (Munné *et al.*, 2004). En el nostre centre són orientats envers DGP per cribratge d'aneuploidies les parelles amb AR, FM, FI i CPA.

Els objectius d'aquest estudi han estat:

- Comparar els percentatges d'embrions anormals entre els diferents grups establerts per indicacions.
- Conèixer si els cromosomes implicats en les anomalies observades varien en funció de la indicació.

MATERIALS I MÈTODES

Des de gener de 2004 fins a març de 2005 van realitzar-se quaranta-set cicles de FIV- DGP per cribratge d'aneuploidies en el nostre centre: a) onze per AR (≥ 2 avortaments previs); b) dinou per FM (anomalies meiotiques); c) onze per FI (≥ 3 cicles anteriors de FIV sense èxit); i d) sis per CPA (≥ 2 concepcions prèvies afectes). L'edat de les pacients incloses en l'estudi estava compresa entre els vint-i-sis i els quaranta-cinc anys, amb una mitjana de $36,41 \pm 4,41$ anys.

Els protocols d'estimulació ovàrica de les pacients i les característiques dels protocols de laboratori emprats van ser els habituals del nostre centre (Barri *et al.*, 1988; Carreras *et al.*, 1994; Calderón *et al.*, 1995). La tècnica d'inseminació utilitzada va ser la microin-

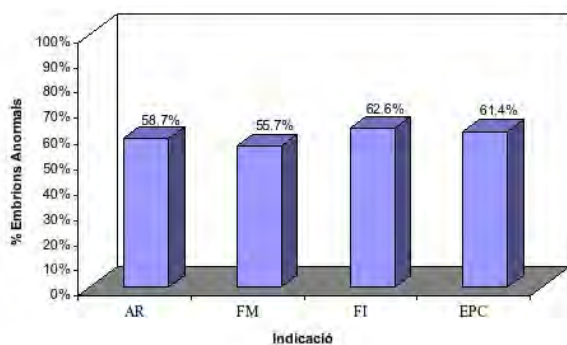


Figura 1 Percentatge d'embrions anormals en funció de la indicació. Ns.

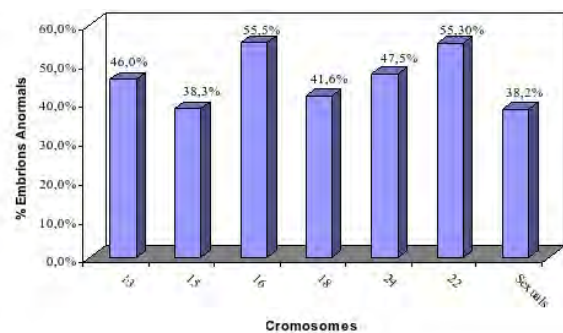


Figura 2 Percentatge d'embrions anormals per a cada cromosoma estudiat.

jecció espermàtica en tots els casos, independentment de la qualitat de la mostra espermàtica.

Les biòpsies embrionàries van realitzar-se el tercer dia de desenvolupament (D+3). Els embrions aptes per a la biòpsia van col·locar-se individualment en microgotetes de medi sense calci ni magnesi (EB o G-PGD, Vitrolife®, Sweden) cobertes per oli mineral. La zona pel·lúcida es va perforar mitjançant tecnologia làser (Fertilase®) (Boada *et al.*, 1998) i van aspirar-se una o dues cèl·lules, en funció del nombre de blastòmers que tenia l'embrió o de la presència i qualitat del nucli fixat. La fixació va realitzar-se mitjançant el mètode de Tarkowsky (1996) lleugerament modificat (Santaló *et al.*, 1986) i els portaobjectes van ser processats per FISH. Van aplicar-se dues rondes consecutives d'hibridació, i es van avaluar en la primera els cromosomes 13, 16, 18, 21 i 22 (PB *multicolour probe panel*, Vysis Inc., Downers Grove, IL, EUA), i en la segona, X, Y i 15 (CEP Vysis Inc.).

Els embrions de bona morfologia i caracteritzats com a sans pels cromosomes analitzats van transferir-se en D+5. La resta d'embrions cromosòmicament normals que assoliren l'estadi de blastocist van ser congelats.

Totes les dades s'han treballat estadísticament mitjançant el test de χ^2 de Pearson, i *F* de Fisher. Per a tots els casos, es va considerar $\alpha < 0,05$ com a nivell de significació.

RESULTATS

Van ser processats per FISH un total de 444 embrions distribuïts de la següent manera: 104 corresponents a AR, 149 a FM, 147 a FI i 44 a CPA. Van ser diagnosticats un total de 399 embrions (89,9%), dels quals 136 (34,1% dels diagnosticats, 30,6% dels analitzats) van ser classificats com a normals per als cromosomes estudiats. Es van transferir un total de setanta embrions caracteritzats com a normals, que van donar lloc a dotze embarassos, cosa que va suposar una taxa d'embaràs per transferència embrionària del 27,9% i una taxa d'implantació global del 18,6%.

No es van trobar diferències significatives en comparar el percentatge d'embrions anormals en funció de cada indicació estudiada. (vegeu la figura 1).

Més de la meitat dels embrions anormals presentaven anomalies per als cromosomes 22 o 16, mentre que els cromosomes 21 i 13 mostraven anomalies de distribució en menor freqüència; els cromosomes que mostraven els percentatges d'aneuploidia més baixos van ser els sexuals, el 15 i el 18. (vegeu la figura 2).

Va avaluar-se la possible correlació entre la incidència d'aneuploidies per cada cromosoma en funció de

les diferents indicacions. La incidència d'anomalies per als cromosomes sexuals va resultar ser significativament superior en els casos de FM que en la resta d'indicacions ($P < 0,05$); també va trobar-se significació estadística en les anomalies pel cromosoma 15, i es van trobar més freqüentment en les indicacions FI i AR que en les altres dues indicacions. D'altra banda, la incidència d'anomalies per al cromosoma 22 semblava superior en els casos d'AR respecte de la resta d'indicacions, tot i que les diferències no eren estadísticament significatives ($P = 0,062$). Els cromosomes 13, 16, 18 i 21 van mostrar percentatges d'anormalitat similars en les quatre indicacions estudiades. Els resultats detallats poden consultar-se a la taula 1.

DISCUSSIÓ

L'elevat percentatge d'embrions cromosòmicament anormals observat en aquests pacients (59,2% dels analitzats, 65,9% dels diagnosticats), i les taxes d'embaràs per transferència aconseguides, concorden amb dades de la bibliografia (Munné *et al.*, 2004; Rubio *et al.*, 2003; Wilton *et al.*, 2003) i justifiquen l'ús del diagnòstic genètic preimplantacional en aquests grups de pacients de mal pronòstic (Pellicer *et al.*, 1999). Per a totes les indicacions analitzades, el percentatge d'embrions anormals observat s'ha situat per sobre del 50%, i no s'han trobat diferències estadísticament significatives entre si.

Els resultats obtinguts revelen que els dos cromosomes que es troben en més freqüència en anomalies en D+3 (el 16 i el 22) continuen essent els més freqüentment anormals en avortaments espontanis (Hassold i Jacobs, 1984), i en nounats no es troba cap anomalia d'aquests cromosomes, ja que no són compatibles amb la vida (Munné *et al.*, 1998). Tot i això, cal tenir en compte que tant en avortaments com en nounats les úniques anomalies autosòmiques que s'observen són trisomies, mentre que en etapes preimplantacionals s'observen també moltes monosomies i, fins i tot, nul·lisomies per a tots els cromosomes estudiats. Aquestes anomalies serien poc compatibles amb etapes posteriors del desenvolupament i s'eliminarien en etapes pre o periimplantacionals.

D'acord amb les dades observades en aquest estudi, les diferents indicacions tenen incidències d'anomalies per a certs cromosomes, que varien entre si (cromosomes sexuals-MF; cromosoma 15-IF/AR). Tot i que comencen a aplicar-se tècniques d'hibridació genòmica comparada (CGH) (Wilton *et al.*, 2003), el temps necessari per a aquest tipus d'anàlisi en cèl·lules úniques no permet tenir resultats dins del cicle en fresc, de manera que el cribratge d'aneuploidies que es re-

alitzada en la clínica actualment és mitjançant FISH, cosa que limita el diagnòstic a un màxim de nou cromosomes. Com a conseqüència, la informació sobre incidència d'anomalies obtinguda a partir de les dades de la majoria d'estudis realitzats, inclòs el present, no és completa i queda limitada als cromosomes analitzats. Caldria fer una valoració exhaustiva dels altres cromosomes no analitzats en aquest estudi i potser podrien arribar a establir-se bateries de cromosomes a analitzar en els casos de DGP específiques per a cada grup.

AGRAÏMENTS

Laura Sarabia Cos, per tot el seu suport. Nacho Rodríguez, Servei d'Estadística de l'Institut Universitari Dexeus.

BIBLIOGRAFIA

- ARAN, B.; VEIGA, A.; VIDAL, F.; PARRIEGO, M.; VENDRELL, J. M.; SANTALÓ, J.; EGOZCUE, J.; BARRI, P. N. (2004). «Preimplantation genetic diagnosis in patients with male meiotic abnormalities». *RBMOnline*, 8:470-476.
- BOADA, M.; CARRERA, M.; DE LA IGLESIA, C.; SANDALINAS, M.; BARRI, P. N.; VEIGA, A. (1998). «Successful use of laser for human biopsy in preimplantation genetic diagnosis: Report of Two cases». *J. Ass. Reprod. Genet.*, 15:305-307.
- GIANAROLI, L.; MAGLI, C.; FERRARETTI, A.; MUNNÉ, S. (1999). «Preimplantation Diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed». *Fertil. Steril.*, 72:837-844.
- MUNNÉ, S.; MÁRQUEZ, C.; REING, A.; GARRISI, J.; ALIKANI, M. (1998). «Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: X,Y, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22». *Prenat. Diagn.*, 18:1459-1466.
- MUNNÉ, S.; SANDALINAS, M.; ESCUDERO, T.; VELILLA, E.; WALMSLEY, R.; SADOWI, S.; COHEN, J.; SABLE, D. (2003). «Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy». *RBMOnline*, 7:91-97.
- MUNNÉ, S.; SANDALINAS, M.; MAGLI, C.; GIANAROLI, L.; COHEN, J.; WARBURTON, D. (2004). «Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions». *Prenat. Diagn.*, 24:638-643.
- PEHLIVAN, T.; RUBIO, C.; RODRIGO, L.; ROMERO, J.; REMOHÍ, J.; SIMON, C.; PELLICER, A. (2003). «Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients». *RBMOnline*, 6:232-237.
- PELLICER, A.; RUBIO, C.; VIDAL, F.; MINGUEZ, Y.; EGOZCUE, J.; REMOHL, J.; SIMON, C. (1999). «In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos». *Fertil. Steril.*, 71:1033-1039.
- RUBIO, C.; SIMÓN, C.; VIDAL, F.; RODRIGO, L.; PEHLIVAN, T.; REMOHÍ, J.; PELLICER, A. (2003). «Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples». *Hum. Reprod.*, 18:182-188.
- SANTALÓ, J.; ESTOP, A. M.; EGOZCUE, J. (1986). «The chromosome complement of first cleavage mouse embryos after in vitro fertilization». *J. Vitro Fertil. Embryo Transfer.*, 3:99-105.
- STAESSEN, C.; PLATTEAU, P.; VAN ASSCHE, F.; MICHIELS, A.; TOURNAYE, H.; CAMUS, M.; DEVROEY, P.; LIEBAERS, I.; VAN STEIRTEGHEM, A. (2004). «Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial». *Hum. Reprod.*, 19:2849-2858.
- SILBER, S.; ESCUDERO, T.; LENAHAN, K.; ABDELHADI, I.; KILANI, Z.; MUNNÉ, S. (2003). «Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction». *Fertil. Steril.*, 79:30-38.
- WILTON, L.; VOULLAIRE, L.; SARGEANT, P.; WILLIAMSON, R.; MCBAIN, J. (2003). «Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure». *Fertil. Steril.*, 80:860-868.
- ZENZES, M. T.; CASPER, R. F. (1992). «Cytogenetics of human oocytes, zygotes, and embryos after in vitro fertilization». *Hum. Genet.*, 88:367-375.

DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL EN PACIENTS AMB MEIOSI MASCULINA ALTERADA

Montserrat Sabaté,^{1*} Begoña Aran,¹ Francesca Vidal,² Mònica Parriego,^{1,2} Anna Veiga¹

¹ Servei de Medicina de la Reproducció, Departament d'Obstetrícia i Ginecologia, Institut Universitari Dexeus. Passeig Bonanova, 89-91. 08017 Barcelona. Tel. 932 274 700. Fax. +34 932 057 966. Adreça electrònica: monsab@dexeus.com.

² Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.

Resum

Les indicacions per al diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) han augmentat en els últims anys. En aquest treball s'estudia si les parelles afectades de meiosi masculina alterada sotmeses a cicles de fecundació *in vitro* (FIV) milloren els resultats amb la selecció dels embrions amb DGP. També s'avalua la morfologia dels embrions diagnosticats com a normals enfront dels anormals. Les taxes d'embaràs per transferència (46,6 vs. 43,9%) i implantació (29,6% vs. 23,5%) són més altes en el grup de pacients amb meiosi alterada i DGP que en el grup control (meiosi alterada però sense DGP), però no de manera significativa. Tampoc trobem diferències significatives pel que fa a la morfologia dels embrions normals respecte dels anormals. Així doncs, tot i que els pacients amb meiosi alterada presenten una alta proporció d'anomalies cromosòmiques, no es troba una millora dels resultats si s'aplica DGP. Una possible estratègia seria buscar sondes específiques per a aquests pacients.

Paraules clau DGP, meiosi alterada, morfologia embrionària.

Abstract

Preimplantation genetic diagnosis in patients with male meiotic abnormalities Indications for preimplantation genetic diagnosis (PGD) have increased recently. This study evaluates if couples undergoing *in vitro* fertilization (IVF) because of male meiotic abnormalities can improve results by selecting embryos through PGD. We also analyze embryo morphology in those normal diagnosed embryos versus abnormal ones. Pregnancy per transfer (46.6% vs. 43.9%) and implantation rates (29.6% vs. 23.5%) were higher in the group with meiotic abnormalities and PGD compared with the group with meiotic abnormalities but without PGD, although no significant differences were found. No statistically significant differences in morphology were observed between normal and abnormal embryos. Even though patients with meiotic abnormalities obtain a high frequency of chromosome abnormalities, no improvements in the results are obtained after PGD. A possible strategy could be found more specific probes for these patients.

Key words PGD, meiotic abnormalities, embryo morphology.

La primera aplicació clínica del diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) es remunta a quinze anys enrere. Des de llavors, les indicacions per a aplicar el DGP han augmentat considerablement, no solament per a evitar la transmissió d'anomalies genètiques als descendents, sinó també per a millorar els resultats de fecundació *in vitro* (FIV) en determinats grups de pacients (Gianaroli *et al.*, 1999). Un d'aquests grups de parelles que es podria veure beneficiat per l'aplicació

d'aquesta tècnica és aquell que presenta una meiosi masculina alterada (Aran *et al.*, 2002, 2004).

Les anomalies meiotiques són alteracions limitades a la línia germinal que es produeixen durant l'aparellament i recombinació dels bivalents durant la meiosi, en la gametogènesi (revisat per Egozcue *et al.*, 2000). Si es produeixen durant l'oogènesi, només és possible estudiar-les a través del DGP dels embrions. En el cas que el problema sigui en la meiosi masculina, la millor via d'estudi és a partir de l'anàlisi citogenè-

tica d'espermatoïcits obtinguts per biòpsia testicular. La importància determinant del resultat fa que s'inclogui en alguns protocols d'escaneig de la infertilitat masculina.

Segons Egozcue *et al.* (1983) un 6% dels pacients estèrils presenta anomalies meiótiques. Aquest percentatge augmentava fins al 17% en pacients amb oligoastenoteratozoospermia (OAT) i al 66% en aquells pacients en què el comptatge d'espermatozoides era inferior a 1×10^6 esp/ml, fet que justifica l'estudi citogenètic en pacients amb oligospermia greu (Vendrell *et al.*, 1999; Egozcue *et al.*, 2000).

Així doncs, les indicacions que ens poden fer sospitar d'una meiosi anòmala són un seminograma alterat, però també errades d'implantació, mala morfologia embrionària, avortaments de repetició o esterilitat de llarga evolució.

Tenint en compte el risc que tenen aquests pacients amb meiosi alterada de produir espermatozoides cromosòmicament anormals, l'aplicació del DGP podria ser útil per a ells. En aquest context, l'anàlisi citogenètica d'aquests embrions i la posterior transferència dels diagnosticats com a normals per a les sondes estudiades podria portar a un augment de les taxes d'implantació i embaràs, i també a una disminució de naixements amb anomalies genètiques. Així doncs, el DGP es va introduir com a tractament en parelles amb factor masculí greu associat a anomalies meiótiques, per tal d'avaluar si el seu ús resultava en una millora dels èxits en reproducció assistida.

Des que el 1992 es va publicar el primer embaràs a partir d'ICSI, aquesta tècnica ha esdevingut un mètode per a tractar les esterilitats greus de causa masculina, ja que permet saltar algunes fases del procés de fecundació, però continua el debat pel risc implícit que té de transmetre alteracions genètiques d'origen masculí (Meschede *et al.*, 1997). Teòricament, aquest risc podria estar augmentat en pacients amb OAT amb meiosi alterada, per la possibilitat de generar embrions cromosòmicament anormals a causa de la microinjecció d'espermatozoides alterats.

En aquest treball ens centrarem en l'estudi de les parelles en les quals l'home és el portador d'aquestes alteracions. Compararem la morfologia embrionària, les taxes d'implantació i embaràs en parelles amb meiosi masculina alterada a les quals s'ha realitzat l'estudi de DGP, enfront d'un grup control, el qual també presenta anomalies meiótiques, però que s'ha sotmès a cicles de FIV-ICSI sense DGP.

MATERIALS I MÈTODES

El grup estudi (grup A) inclou quaranta-quatre parelles que van arribar al Servei de Medicina de la Reproducció de l'Institut Universitari Dexeus per consultes d'esterilitat i a les quals es diagnosticà en l'home una oligoastenoteratozoospermia i anomalies meiótiques a partir de l'estudi citogenètic. Aquestes parelles se sotmeten a quaranta-nou cicles de FIV-ICSI-DGP-SA (escaneig d'aneuploidies). El grup control (grup B) està format per quaranta-quatre parelles que també presenten oligoastenoteratozoospermia i meiosi alterada, i els practiquen seixanta-sis cicles de FIV-ICSI, però sense DGP.

L'estimulació fol·licular, la punció fol·licular, la preparació de les mostres seminals i dels oòcits, la microinjecció intracitoplasmàtica, la comprovació de la fecundació, el cultiu, la transferència i la criopreservació embrionària, el suport durant la fase lútea i la valoració de l'embaràs es fan seguint procediments anteriorment descrits del Servei (Calderón *et al.*, 1995).

L'estudi citogenètic de meiosis s'indica seguint el protocol del Servei, d'acord amb el criteri andrològic. La mostra a estudiar s'obté en tots els casos a partir de biòpsia testicular unilateral amb anestèsia local. La mostra es processa d'acord amb la tècnica d'Evans *et al.*, (1964).

La valoració de la morfologia embrionària el dia 3 es fa seguint l'*score* del laboratori mateix, que té en compte la taxa de divisió, la simetria cel·lular i el grau de fragmentació. El resultat és un valor comprès entre el 0 i el 10, i el 10 és la valoració màxima per embrió.

DGP

La biòpsia embrionària es fa a partir del dia 3. Cada embrió es manipula individualment en medi EB (Vitrolife, Göteborg, Suècia) recobert d'oli (Ovoil, Vitrolife). La zona pellúcida es forada (25-30 μ m de diàmetre) amb làser, per fototermòlisi (Fertilase). El blastòmer s'aspira suaument amb una pipeta de vidre (Humagen, Charlottesville, EUA) i es fixa amb una lleugera modificació del mètode de Tarkowski (1966).

Els blastòmers es processen per escaneig d'aneuploidies (Vidal *et al.*, 1998). Per a l'avaluació dels cromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X i Y s'usa un panell de sondes PB multicolor seguit d'una segona ronda de FISH amb sondes de DNA satèl·lit per als cromosomes X i Y (Vysis Inc., Downers Grove, IL, EUA).

La transferència dels embrions del grup A que es diagnostiquen com a normals per a les sondes estudiades es transfereixen el dia 5. Els embrions normals

Taula 1 Característiques generals i resultats dels cicles de FIV de les parelles amb anomalies meiòtiques amb i sense DGP.

	Grup A (anomalies meiòtiques amb DGP)	Grup B (anomalies meiòtiques sense DGP)
Nre. parelles	44	44
Nre. cicles	49	66
Mitjana edat home (rang)	34,7 (27-51)	34,9 (21-59)
Mitjana edat dona (rang)	31,9 (24-39)	33,1 (20-41)
Mitjana oòcits recuperats (total)	17,3 (848)	13,9 (916)
Mitjana oòcits 2PN (total)	10,0 (491)	7,5 (496)
Taxa fecundació	74,5 %	67,5 %
Transferències	45	66
Mitjana nre. embrió/transfer.	1,9	2,8
Nre. embarassos	21	29
Taxa embaràs/dona	47,7 %	65,9 %
Taxa embaràs/transfer.	46,6 %	43,9 %
Taxa embaràs/cicle	42,8 %	43,9 %
Taxa d'implantació	29,6 %	23,5 %
Nre. avortaments (%)	5 (23,8 %)	3 (10,3 %)

sobrants que arriben fins a l'estadi de blastocist es criopreserven. En el grup control els embrions es transfereixen el dia 2, d'acord amb el protocol normal del laboratori.

La comparació estadística entre els dos grups es fa amb el test d'exactitud de Fisher al 5 % de significació.

RESULTATS

A la taula 1 trobem descrites les característiques generals de les parelles i els resultats dels cicles de FIV-ICSI. En el grup A (parelles que fan FIV amb DGP), la mitjana d'edat de les dones és de 31,9 anys. La mitjana d'edat dels homes és de 34,7 anys. Es van recuperar un total de 848 oòcits (mitjana de 17,3), dels qual es van microinjectar 659 (mitjana de 10,0). 491 (74,5 %) van presentar dos pronuclis a les 16-20 h post-microinjecció. En el grup B (grup control sense DGP), la mitjana d'edat de les dones era de 33,1 anys i la dels l'homes 34,9 anys. Es van recuperar 916 oòcits (mitjana de 13,9), 735 oòcits van ser microinjectats (mitjana d'11,1) i es va observar la presència de dos pronuclis en 496 (67,5 %).

En el grup A, es van fer quaranta-cinc transferències, amb una mitjana de 1,9 embrions/transferència, de les quals hi va haver vint-i-un embarassos. Això significa un 29,6 % de taxa d'implantació, un 42,8 % d'embaràs/cicle i un 46,6 % d'embaràs/transferència. Cinc embarassos (un 23,8 %) varen acabar en avortament. En el grup B, es van aconseguir vint-i-nou embarassos de seixanta-sis cicles de FIV-ICSI, la qual

cosa significa una taxa d'implantació del 23,5 %, i unes taxes d'embaràs/cicle i embaràs/transferència del 43,9 %. La taxa d'avortament va ser del 10,3 %.

A la taula 2 se sintetitzen els resultats de DGP realitzats a les parelles pertanyents al grup A. Es van biopsiar 424 embrions, 344 dels quals van poder ser analitzats (81,1 %). 161 embrions eren normals per als cromosomes analitzats (46,8 % dels analitzats, 51,6 % dels diagnosticats), mentre que 151 van resultar anormals (43,8 % dels analitzats, 48,4 % dels diagnosticats). En trenta-dos embrions no es va aconseguir un diagnòstic, en la majoria dels casos per resultats no informatius d'algun parell de cromosomes. A causa de les característiques del nucli després de la fixació, vuitanta embrions no es van poder analitzar.

La taula 3 presenta els resultats en percentatge de la valoració de la morfologia embrionària en dies posteriors al 3. Dins del grup d'embrions diagnosticats com a normals per a les sondes usades, trobem un 61,3 % d'embrions amb qualitat considerada com a òptima o força òptima (8-10), un 29,9 % d'embrions de qualitat regular (5-7) i un 8,8 % d'embrions de mala qualitat (< 5). Dels embrions anormals, el 51,5 % dels embrions són de qualitat òptima o força bona, el 35,4 % presenta una qualitat regular i el 13,1 % són embrions de baixa qualitat.

No es van trobar diferències significatives en les taxes d'embaràs, implantació ni avortament entre els dos grups. Tampoc en la comparació morfològica dels embrions.

Taula 2 Resultats de l'anàlisi dels embrions.

Nre. cicles	49
Nre. embrions biopsiats	424
Nre. embrions analitzats	344 (81,1 %)
Nre. embrions diagnosticats	312 (90,7 %)
Nre. embrions normals	161 (51,6 %)
Nre. embrions anormals	151 (48,4 %)
Nre. embrions sense diagnòstic	32 (9,3 %)

Taula 3 Morfologia embrionària dels embrions normals i anormals.

Puntuació	10	9	8	7	6	5	< 5
Normals (%)	19,7	14,6	27,0	7,3	16,0	6,6	8,8
Anormals (%)	10,8	11,5	29,2	16,1	13,1	6,2	13,1

DISCUSSIÓ

De les dades d'aquesta sèrie deduïm que els pacients amb meiosi alterada sotmesos a ICSI-DGP presenten una alta taxa d'anomalies cromosòmiques (48,4%), una mica més elevada que l'observada per Kahraman el 2002 (41,3%) quan va realitzar DGP en pacients amb causa masculina greu.

En comparació amb les taxes d'anormalitat publicades en estudis sobre DGP per a altres indicacions, aquestes són més baixes, tot i haver usat les mateixes sondes (Silber *et al.*, 2003). Això podria explicar-se perquè potser aquest grup de pacients presenta aneuploidies en altres cromosomes que no són els estudiats i, per tant, s'hauria d'avaluar si seria més indicat l'ús d'altres sondes que podrien caracteritzar millor aquest grup. A més, seria necessari ajustar les sondes a utilitzar per cada indicació de DGP.

Tot i no ser significatives, la taxa d'implantació i d'embaràs per transferència són més altes en les parelles del grup A (parelles amb anomalies meiotiques sotmeses a DGP), en les quals es transferien embrions considerats normals per als cromosomes estudiats. Si fos possible seleccionar els embrions normals a partir de l'ús de les sondes adequades, les taxes d'embaràs i implantació potser podrien arribar a augmentar de manera estadísticament significativa. Encara que tampoc no sigui significativa, l'elevada taxa d'avortament s'explicaria per la baixa mida poblacional.

Del fet que la comparació de la valoració morfològica embrionària en dies posteriors al 3 no presenti unes diferències estadísticament significatives es conclou que no ens podem basar en cap criteri morfològic per a inferir la normalitat cromosòmica dels embrions que provenen de pacients amb meiosi alterada, fet que reforça l'opció d'aplicar el DGP en aquests casos.

És molt important l'escaneig exhaustiu dels pacients

abans que aquests se sotmetin a cicles de FIV, per tal d'informar-los i assessorar-los correctament del risc genètic. Això fa que els estudis de meiosi siguin molt recomanables i, per tant, hauria d'estar considerat com a part de l'estudi genètic en aquest grup de pacients.

Correlacions entre aquests estudis i els resultats amb sèries més grans i aleatòries de pacients ajudaran a determinar la utilitat real del DGP en parelles amb OAT greu i meiosi alterada. Els resultats obtinguts amb els estudis genètics han de servir per a donar consell genètic als pacients i valorar l'aplicació de DGP en aquells casos en què el risc genètic sigui més elevat, per tal d'augmentar la probabilitat de transferència d'embrions cromosòmicament normals i les taxes d'embaràs.

BIBLIOGRAFIA

- ARAN, B.; VEIGA, A.; VIDAL, F. [*et al.*] (2004). «Preimplantation genetic diagnosis in patients with male meiotic abnormalities». *Reproductive BioMedicine Online*, 8:470-476.
- ARAN, B.; VIDAL, F.; VENDRELL, J. M. [*et al.*] (2002). «Preimplantation genetic diagnosis in patients with meiotic abnormalities». *18th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Viena, Àustria*. [Abstract p-156]
- CALDERON, G.; BELIL, I.; ARÁN, B. [*et al.*] (1995). «Intracytoplasmic sperm injection versus conventional *in vitro* fertilization: first results». *Human Reproduction*, 10:2835-2839.
- EGOZCUE, J.; TEMPLADO, C.; VIDAL, F. [*et al.*] (1983). «Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males». *Human Genetics*, 65:185-188.
- EGOZCUE, S.; VENDRELL, J. M.; GARCÍA, F.; *et al.* (2000). «Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 17:307-309.
- EVANS, E. P.; BRECKON, G.; FORD, C. E. (1964). «An air-drying method of meiotic preparations from mammalian testes». *Cytogenetics*, 3:289-294.
- GIANAROLI, L.; MAGLI, M. C.; FERRARETI, A. P. (1999). «Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing *in vitro* fertilization with a poor prognosis: Identification of the categories for which it should be proposed». *Fertility and Sterility*, 72:837-844.
- KAHRAMAN, S.; KUMTEPE, Y.; SERTYEL, S.; *et al.* (2002). «Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility». *Human Reproduction*, 17:3193-3200.
- MESCHEDE, D.; HORST, J. (1997). «Genetic counselling for infertile male patients». *International Journal of Andrology*, 20:20-30.
- SILBER, S.; ESCUDERO, T.; LENAHAN, K. [*et al.*] (2003). «Chromosomal abnormalities in embryos derived from

- testicular sperm extraction». *Fertility and Sterility*, 79:30-38.
- TARKOWSKI, A. K. (1966). «An Air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs». *Cytogenetics*, 5:394-400.
- VENDRELL, J. M.; GARCÍA, F.; VEIGA, A.; *et al.* (1999). «Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia». *Human reproduction*, 14:375-378.
- VIDAL, F.; GIMENEZ, C.; RUBIO, C. [*et al.*] (1998). «Fish preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 15:310-313.

VALORACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA Y LA IMPLANTACIÓN DE BLASTOCISTOS CONGELADOS EN FUNCIÓN DE SU MORFOLOGÍA EMBRIONARIA EN DÍA 3

Laura Sarabia,* M. José Torelló, Anna Veiga, Pere N. Barri

Servicio de Medicina de la Reproducción. Institut Universitari Dexeus.

Pg. Bonanova, 67. 08017 Barcelona. Tel. 932 274 700. Fax 932 057 966 Correo electrónico: lausar@telefonica.net.

Resumen

Objetivo: Valorar la supervivencia y la implantación de embriones congelados en estadio de blastocisto en función de la morfología que tenían en estadio temprano (día 3). **Métodos:** Se han analizado setenta blastocistos descongelados que se agruparon en función de su morfología en día 3. Grupo I: embriones con *score* ≤ 6 ; grupo II: embriones que compactaban; grupo III: embriones con *score* > 6 . **Resultados:** Las tasas de supervivencia al 100 % fueron: en el grupo I un 38 % (14/37), en el II un 68 % (17/25) y en el III un 75 % (6/8). La diferencia fue estadísticamente significativa ($P = 0,03$) entre los tres grupos. Las tasas de implantación fueron: en el grupo I un 0 % (0/11), en el II un 15 % (3/13) y en el III un 33 % (1/3), la diferencia entre grupos no fue estadísticamente significativa. **Conclusión:** Embriones con mala morfología embrionaria en estadios tempranos de su desarrollo dan lugar a blastocistos que tienen una baja supervivencia al proceso de la congelación y descongelación.

Palabras clave Criopreservación, blastocistos, supervivencia, implantación.

Abstract

Objective: Evaluate the survival and implantation of freeze embryos, in blastocyst stage, depending on its morphology in day 3. **Materials and Methods:** 70 blastocysts have been analyzed and grouped in order to its morphology in day 3. Group i: embryos with score ≤ 6 ; group ii: embryos compacting; group iii: embryos with score > 6 . **Results:** The rates of 100% survival were: in group i 38% (14/37), in group ii 68% (17/25) and in group iii 75% (6/8). The rate of 100% survival was statistically different ($P = 0,03$) among the three groups. The implantation rates were: in group i 0% (0/11), in group ii 15% (3/13) and in group iii 33% (1/3), but there were not statistically differences. **Conclusions:** Embryos with a poor morphology in early stages of their development, give rise to blastocysts with low survival of freezing and thawing process.

Key words Cryopreservation, blastocysts, survival, implantation.

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de embriones es un procedimiento indispensable en la rutina de un laboratorio de FIV, ya que nos permite conservar los embriones no transferidos en un ciclo en fresco para ser utilizados en posteriores transferencias. De esta manera se consigue un máximo aprovechamiento de la estimulación ovárica y se limita el número de embriones a transferir, disminuyendo el riesgo de embarazos múltiples.

Desde el primer embarazo a partir de la transferencia de un blastocisto descongelado (Cohen *et al.*, 1985), y debido al desarrollo de los medios de cultivo secuenciales, se ha producido un aumento en la

práctica de la criopreservación de embriones en este estadio.

El objetivo de este trabajo es valorar la supervivencia y la implantación de embriones congelados en estadio de blastocisto en función de su morfología en día 3.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron retrospectivamente setenta embriones que fueron congelados y descongelados en estadio de blastocisto, y que provenían de cuarenta y ocho pacientes de FIV. El período de tiempo en el que se

congelaron dichos embriones está comprendido entre enero de 2002 y diciembre de 2003.

Los blastocistos analizados en este estudio provienen de los embriones que no fueron congelados en estadio de células sino que se dejaron en cultivo largo por distintos motivos: *a)* pacientes que tenían un número elevado de embriones y en las que se decidió congelar en estadio de blastocisto para así llevar a cabo una mayor selección embrionaria y *b)* embriones que en día 3, en estadio de células, no eran aptos para congelar por dudosa calidad embrionaria o por encontrarse compactando en el momento de la congelación.

Los medios utilizados para el cultivo secuencial de estos embriones fueron G1 y G2 (Vitrolife Serie II/III, Suecia) suplementados con albúmina sérica humana (HSA-solution, Vitrolife, Suecia). Los embriones se cultivaron individualmente en microgotas cubiertas con aceite (Ovoil, Vitrolife, Suecia) y bajo unas condiciones de 5 % CO₂, 95 % de humedad y a una temperatura de 37° C.

En día 3 los embriones fueron observados bajo el microscopio invertido y en función a sus características morfológicas fueron puntuados. Se valoró el número de células, el tamaño y la forma de los blastómeros y la fragmentación embrionaria, tal y como se detalla en la tabla 1. Los embriones que estaban compactando en día 3 no fueron valorados según este *score* y se incluyeron en una categoría denominada *compactando*.

Los embriones que durante los días 5, 6 y 7 de cultivo llegaron a blastocisto y presentaban una MCI y un trofooctodermo organizados fueron congelados.

Para la congelación y descongelación se utilizaron medios Vitrolife Serie II/III. Tras la descongelación, los blastocistos se colocaron en una placa de cultivo con G2 y se hizo una primera valoración de la supervivencia. Antes de la criotransferencia, tras veinticuatro horas de cultivo, se valoró su evolución.

Por otra parte, se analizaron retrospectivamente noventa y dos embriones procedentes de sesenta y cinco pacientes de FIV que fueron congelados y descongelados en día 3. Dichos embriones presentaban una compactación precoz el tercer día de cultivo y por este motivo se decide en este estudio analizar su supervivencia después del proceso de la congelación.

Los medios de cultivo utilizados y las condiciones del laboratorio son las referidas anteriormente, ya que la congelación de esta serie de embriones se realizó a lo largo del año 2003.

Los medios utilizados para la congelación y descongelación en estadio temprano fueron Frezze *kit-1* y Tthaw *kit-1* (Vitrolife Serie II/III), respectivamente. Los embriones congelados «compactando» también

Tabla 1 Características morfológicas consideradas en la valoración de los embriones y su puntuación. El *score* final resulta de la suma de las distintas puntuaciones.

Células	Día 3	Puntuación
Número	≥6	6
	< 6	2
Tamaño y forma	Simétricas y regulares	1
	Levemente asimétricas o irregulares	0
	Asimétricas o irregulares	-1
% fragmentación	< 10 %	3
	≥10 %, < 20 %	2
	≥20 %, < 30 %	1
	≥30 %, < 50 %	0
	≥50 %	-1

Score embrionario = puntuación número de células + puntuación tamaño y forma + puntuación fragmentación.

fueron cultivados después de la descongelación durante veinticuatro horas para valorar su evolución.

La transferencia se realizó utilizando un catéter (*Wallace embryo replacement catheter*, Smiths) guiado por ecografía. Trece días después de la transferencia se realizó una prueba de embarazo mediante la medida de los niveles séricos de β-HCG. El embarazo clínico se confirmó mediante ecografía vaginal a las seis semanas de la transferencia y se definió por la presencia de saco gestacional y latido cardíaco.

Para comprobar las variables cualitativas se utilizó el test exacto de Fisher y el test χ^2 ; para las variables continuas se utilizó la prueba de *T* de Student. Se fijó el nivel de significación en $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Embriones congelados en estadio de blastocisto

Los embriones descongelados en estadio de blastocisto ($n = 70$) fueron clasificados en tres grupos en función de su morfología en día 3: grupo I ($n = 37$), embriones con un *score* ≤ 6; grupo II ($n = 25$), embriones que compactaban y grupo III ($n = 8$), embriones con un *score* > 6.

Supervivencia posdescongelación

Tras la descongelación se evaluó la supervivencia de los blastocistos. Se consideró: supervivencia del 100 % cuando todas las células estaban intactas, supervivencia parcial cuando presentaban células lisadas, y lisados cuando presentaban todas las células lisadas. Como se puede ver en la tabla 2, la tasa de superviven-

Tabla 2 Tasa de supervivencia según la calidad embrionaria en día 3.

	T. sup. 100 %	T. sup. parcial	Lisados
Grupo I	38 % (14/37)	24 % (9/37)	38 % (14/37)
Grupo II	68 % (17/25)	28 % (7/25)	4 % (1/25)
Grupo III	75 % (6/8)	13 % (1/8)	13 % (1/8)
Total	53 % (37/70)	24 % (17/70)	23 % (16/70)

Tabla 3 Tasa de supervivencia (tras veinticuatro horas de cultivo) y de implantación según el estadio en el que se congeló.

Estadio de congelación	T. sup. tras 24 h	T. de implantación
Blastocisto (grupo II)	69 % (15/25)	15 % (2/13)
Emb. día 3 compactando	79 % (73/92)	28 % (7/25)

cia fue significativamente diferente ($P < 0,05$) entre los tres grupos, siendo superior en el grupo III.

Evolución de los blastocistos tras veinticuatro horas de cultivo

Tras veinticuatro horas de cultivo se valoraron los embriones para decidir cuales se transferían.

De los embriones con 100 % de supervivencia, degeneraron cinco del grupo I, cuatro del grupo II y tres del grupo III. La evolución de los blastocistos con una supervivencia parcial fue la siguiente: en el grupo I degeneraron siete, en el grupo II degeneraron cinco y en el III ninguno.

Los embriones que no degeneraron fueron transferidos, siendo treinta el total de embriones evolutivos al 43 % (30/70).

Tasa de implantación

Se transfirieron treinta blastocistos en veinticuatro criotransferencias.

Los cinco embriones parcialmente lisados tras la descongelación, que no degeneraron tras veinticuatro horas de cultivo, fueron transferidos. No implantó ninguno independientemente del grupo al que pertenecían.

La tasa de implantación no fue significativamente diferente ($P = 0,12$) entre los tres grupos siendo mayor en el grupo III (1/3 = 33 %) seguido del II (3/13 = 15 %) y por último el I (0/11 = 0 %).

Para determinar las tasas de implantación se excluyeron dos criotransferencias (tres blastocistos), debido a que fueron transferencias mixtas, es decir, de dos blastocistos que no tenían la misma procedencia y en las que se produjo la implantación de un sólo embrión. En una de estas criotransferencias se transfirieron dos blastocistos, uno pertenecía al grupo II y el otro proce-

día de un embrión que se congeló en estadio de células y que tras su descongelación se desarrolló hasta blastocisto. En la otra se transfirieron un blastocisto del grupo II y otro del grupo III. Las medias de edad de las pacientes de los distintos grupos en las que se llevó a cabo criotransferencia fueron: en el grupo I de $37,45 \pm 5,35$, en el grupo II $37 \pm 4,09$, en el grupo III $37,99 \pm 9,45$, no encontrándose diferencias entre los tres grupos.

Embriones congelados en estadio precoz «compactando» (día 3)

Se descongelaron noventa y dos embriones «compactando» en día 3. Setenta y tres de ellos fueron transferidos, por lo que la tasa de supervivencia tras veinticuatro horas de cultivo fue del 79 % (73/92).

Para valorar el potencial de implantación se analizaron dieciséis transferencias homogéneas para este tipo de embriones, en las que se transfirieron veinticinco embriones. La tasa de implantación fue del 28 % (7/25). La media de edad de las pacientes en las que se llevaron a cabo estas transferencias fue de $37,14 \pm 5,78$ años.

Como se puede ver en la tabla 3, tanto la supervivencia como la implantación fueron mayores en los embriones que se congelaron en día 3 «compactando», si lo comparamos con los blastocistos del grupo II, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

DISCUSIÓN

La tasa de supervivencia de blastocistos congelados es variable. La mejores tasas publicadas son del 76 % (Veeck *et al.*, 2004), 80 % (Menezo y Veiga, 1997), mientras que otros grupos citan tasas inferiores del 52 % (Cohen *et al.*, 1985) y 56 % (Pantos *et al.*, 2001). Los protocolos utilizados para la congelación de blastocistos son distintos entre centros, no hay consenso sobre cual es el mejor, y este podría ser uno de los motivos por los que se dan resultados tan diferentes. Todos los trabajos citados anteriormente han utilizado protocolos lentos de congelación.

Con la introducción de la metodología de la vitrificación, se han publicado resultados más prometedores, con unas tasas de supervivencia del 100 % (Stehlik *et al.*, 2004), 90 % (Son *et al.*, 2003) y 70,6 % (Vanderzwalmen *et al.*, 2002).

Según nuestros resultados, la tasa de supervivencia 100 % de los blastocistos es del 53 % (37/70), resultados comparables con los de Cohen y Pantos mencionados anteriormente. Si analizamos los resultados en función de la calidad embrionaria vemos que en los

blastocistos que provienen de embriones de buena calidad ($score > 6$) la tasa es del 75 % (6/8), mientras que cuando vienen de embriones de mala calidad ($score \leq 6$) es de 38 % (14/37), lo que indica que estos embriones con mala morfología embrionaria en estadios tempranos dan lugar a blastocistos de peor calidad, y aunque esto no se detecte morfológicamente sí se evidencia con la mala supervivencia a la descongelación.

La tasa de implantación global de nuestro estudio, teniendo en cuenta todos los blastocistos transferidos en los tres grupos, es del 14 % (4/29). Nuestros resultados son inferiores a los obtenidos por Langley *et al.* (2001) con un 21,9 %, pero se acercan a los de Behr *et al.* (2002), que tiene una implantación del 16 %. Tal y como ocurre con la supervivencia, la tasa de implantación en el grupo III es superior 33 % (1/3), lo que indica la relación con la mejor calidad embrionaria.

Por otro lado, la capacidad de implantación de los blastocistos que tras la descongelación quedan parcialmente lisados es mínima; en nuestro estudio no implantó ninguno, con lo que podríamos cuestionarnos la transferencia de los mismos. Aún así, el número de blastocistos transferidos con estas características es muy bajo, por lo que para llegar a conclusiones más definitivas deberíamos ampliar la serie.

Analizando la tasa de implantación entre los distintos grupos de nuestro estudio, se observa que es mayor en el grupo de blastocistos que provenían de embriones con un mejor pronóstico ($score > 6$) en día 3. Por otra parte, de los blastocistos que provenían de embriones de peor calidad embrionaria ($score \leq 6$) no implantó ninguno. Estos resultados no son estadísticamente significativos, debido al pequeño tamaño de la serie, pero apoyan la idea de que los embriones con mala morfología en estadios tempranos dan lugar a blastocistos de peor calidad.

En el momento en que fueron congelados los embriones de este estudio, no se sabía si el estadio de compactación era adecuado para la congelación, y por este motivo en el mismo periodo de tiempo en nuestro centro se congelaron embriones «compactando» en estadio temprano y en otros casos se decidió llevarlos a blastocisto. Actualmente hay trabajos que demuestran que la supervivencia al proceso de congelación de los embriones compactados es buena, con una tasa del 89,2 % (Tao *et al.*, 2004), tal y como nosotros vemos en nuestros resultados, con un 79 % (73/92).

En nuestro trabajo, ni la supervivencia ni la tasa de

implantación de los embriones congelados en día 3 son superiores significativamente a las de los embriones que se congelan en estadio de blastocisto. Teniendo en cuenta que con el cultivo largo la pérdida embrionaria es inevitable sería más recomendable la congelación en estadio temprano.

Aunque el período de tiempo del estudio es largo, el número de blastocistos descongelados y transferidos es escaso, lo que no nos permite sacar conclusiones definitivas en cuanto a las tasas de implantación.

BIBLIOGRAFÍA

- BEHR, B.; GEBHARDT, J.; LYON, J. (2002). «Factor relating to a successful cryopreserved blastocysts transfer program». *Fertil. Steril.*, 77:697-9.
- COHEN, J.; SIMONS, R. F.; EDWARDS, R. G.; FEHILLY, C. B.; FISHEL, S. B. (1985). «Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts». *J. In Vitro Fert. Embryo. Transf.*, 2:59-64.
- MENEZO, Y.; VEIGA, A. (1997). «Cryopreservation of blastocysts». Dins: *10th World Congress on In-vitro Fertilization and Assisted Reproduction*. Bolonya: Monduzzi, p. 49-53, p. 49-53.
- PANTOS, K.; STEFANIDIS, K.; PAPPAS, K.; KOKKINOPOULOS, P.; PETROUTSOU, K. [et al.] (2001). «Cryopreservation of embryos, blastocysts and pregnancy rates of blastocysts derived from frozen-thawed embryos and frozen-thawed blastocysts». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 18:579-82.
- SON, W. Y.; YOON, S. H.; YOON, H. J.; LEE, S. M.; LIM, J. H. (2003). «Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of blastocoele». *Hum. Reprod.*, 18:137-139.
- STEHLINK, E.; KATAYAMA, K.; KUWAYAMA, M.; JAMBOR, V.; BROHAMMER, R. (2004). «Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts». *Reprod. Biomed. Online*. [Pendiente de publicación]
- TAO, J.; CRAIG, R. H.; JOHNSON, M.; WILLIAMS, B.; LEWIS, W.; WHITE, J.; BUEHLER, N. (2004). «Cryopreservation of human embryos at the morula stage and outcomes after transfer». *Fertil. Steril.*, 82:108-18.
- VANDERZWALMEN, P.; BERTIN, G.; DEBAUCHE, C. H.; STANDAERT, V. [et al.] (2002). «Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification». *Hum. Reprod.*, 17:744-751.
- VEEK, L. [et al.] (2004). «High pregnancy rates can be achieved after freezing and thawing human blastocysts». *Fertil. Steril.*, 82:1418-1427.

LEGISLACIÓ SOBRE LES TÈCNiques DE REPRODUCCIÓ HUMANA ASSISTIDA : UNA NORMATIVA EN CANVI

Montserrat Boada

Servei de Medicina de la Reproducció. Institut Universitari Dexeus. Comissió Assessora sobre Tècniques de Reproducció Humana Assistida a Catalunya. Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida.
Passeig de la Bonanova 89-91. 08017 Barcelona. Adreça electrònica: monboa@dexeus.com.

Paraules clau Reproducció assistida, fecundació *in vitro*, legislació, Comissió Nacional

LLEI 35/1988

L'any 1988 es va publicar la Llei 35/1988 que regulava l'ús de les tècniques de reproducció assistida (TRA) a l'Estat espanyol. Es tractava d'una llei pionera, de les primeres d'Europa que va permetre que es pogués treballar en aquest camp dins d'un marc legal regulat. En aquesta llei s'estableix que la finalitat de les TRA és l'actuació mèdica enfront l'esterilitat i la prevenció de malalties hereditàries. Es defineix el perfil de la usuària com el d'una dona sana, major de divuit anys sense necessitat d'estar casada o tenir parella i es dictamina que tots els centres que practiquin aquestes tècniques hauran d'estar acreditats per les autoritats sanitàries competents. Estan reconegudes com a tècniques autoritzades per aquesta llei la congelació d'esperma i d'embrions, el diagnòstic preimplantacional, la donació anònima de gàmetes i embrions i la inseminació *post mortem*. Contràriament, està prohibida la gestació per substitució, la selecció de sexe o manipulació genètica, el clonatge d'éssers humans i la importació o exportació d'embrions o les seves cèl·lules. Amb el pas dels anys, els problemes derivats de l'aplicació clínica de les TRA i l'aparició de noves tecnologies va posar de manifest la necessitat de revisar la llei per a adequar-la a les necessitats del moment.

COMISSIÓ NACIONAL DE REPRODUCCIÓ HUMANA ASSISTIDA (CNRHA)

La mateixa llei ja preveia la creació d'una Comissió Nacional de Reproducció Humana Assistida que fes

un seguiment de la llei i que l'adaptés als canvis que de manera constant es produeixen en el camp de la biologia de la reproducció. La CNRHA es va crear l'any 1997 i en la seva composició es troben representats el món científic, el jurídic i el social. Els dos primers informes de la CNRHA aconsellaven una modificació legal en temes tan importants com la congelació de gàmetes i embrions i la recerca, entre d'altres.

LLEI 45/2003

No va ser fins l'any 2003 quan finalment es va produir un canvi normatiu i es va publicar la Llei 45/2003 que modifica els articles 4 i 11 de la Llei 35/1988. Tal com s'especifica al preàmbul de la llei, l'objectiu de la reforma és bàsicament resoldre el problema greu de l'acumulació d'embrions supernumeraris i, al mateix temps, intentar reduir el nombre d'embarassos múltiples fruit de les TRA. Aquesta llei va obrir una porta molt important a la recerca en embrions humans, ja que permet destinar-hi tots aquells embrions que havien estat congelats prèviament a la promulgació de la llei i que actualment no tenen finalitat reproductiva. Malauradament, en la seva vessant assistencial, la Llei 45/2003 no va ser la llei que s'esperava i va generar nous problemes fins aleshores inexistents. La restricció del nombre d'òocits a fecundar a un màxim de tres i la limitació a l'ús reproductiu com a única alternativa de futur per als embrions que es generin a partir de la publicació d'aquesta llei en són els punts més conflictius.

REIAL DECRET 1720/2004

El fet de limitar a tres el nombre d'òcits a fecundar comporta inevitablement una disminució de l'eficàcia del tractament. No poder seleccionar els embrions de millor pronòstic per a la transferència repercuteix directament sobre les pacients i disminueix significativament la probabilitat d'aconseguir una gestació. Com a resultat de la pressió social que es va desencadenar i per tal de solucionar els problemes que la nova llei havia generat, es va desenvolupar una nova norma (RD 1720/2004) en la qual s'estableix una llista d'excepcions i es detallen totes aquelles situacions que per raons fisiopatològiques aconsellen l'eliminació de la limitació i, per tant, l'autorització a la inseminació de més de tres òcits.

NOVA LLEI DE TRA

Si bé l'aprovació del Reial Decret 1720/2004 va suposar una solució transitòria al problema de la restricció a fecundar més de tres òcits, el marc legal vigent és complex, ja que d'una banda hi ha aspectes conflictius que encara no estan resolts, i de l'altra coexisteixen dues lleis, la primera de les quals continua vigent únicament en aquella part del seu articulat que no està

modificat per la segona. En aquesta línia, el govern actual està treballant en l'elaboració d'una nova llei de TRA que en cas que s'aprovi substituirà les dues anteriors i les unificarà en una única norma actualitzada i adequada a la realitat actual. L'avantprojecte de la nova llei de TRA ja ha estat avaluat satisfactòriament per la CNRHA, i tot i que encara falten els tràmits polítics i administratius reglamentaris, es creu que podria publicar-se a darrers d'aquest any.

BIBLIOGRAFIA

- COMISIÓN NACIONAL DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA (1999). *I Informe Anual. Diciembre 1998*. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Ley 35/1988 de 22 noviembre, sobre Técnicas de Reproducción Asistida*. BOE, 282:33373-33378.
- Ley 45/2003, de 21 de noviembre, por la que se modifica la Ley 35/1988, de 22 de noviembre, sobre Técnicas de Reproducción Asistida*, 280. BOE, 280:41458-41463.
- Real Decreto 415/1997, de 21 de marzo, por el que se crea la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida*. BOE, 70:9419-9421.
- Real Decreto 1720/2004, de 23 de julio, por el que se establecen las tipologías fisiopatológicas que permiten la superación de los límites generales establecidos para la fecundación de ovocitos en procesos de reproducción asistida*. BOE, 180:27179-27181.

ÍNDEX DE PARAULES CLAU

- acrosoma, 8
- anticòs, 89
- antimitòtics, 73
- apoptosi, 45
- aquaporines, 59
- aromatasa, 39, 55
- astenoteratonecrospermia, 109
- avortaments de repetició, 136
- bessons monozigòtics, 130
- blastocistos, 146
- cabra, 17, 12
- càncer de pròstata, 66
- cefalòpode, 22
- cèl·lules epitelials, 104
- citocinas, 50
- citometria de flux, 93
- clonatge, 73
- Comissió Nacional, 151
- cribratge d'aneuploidies, 136
- criopreservació, 146
- cromosoma Y, 80
- cultiu *in vitro*, 104
- desenvolupament embrionari *in vitro*, 120
- DGP, 141
- diferenciació sexual, 39, 55
- Dosi seminal, 109
- eclosió assistida, 130
- edat materna, 125
- eficiència en fecundació *in vitro*, 125
- enucleació, 73
- epidídim, 104, 114
- espermatozoide, 8, 85, 93, 109
- espermiogènesi, 22
- esteroïdogènesi, 45
- factor masculí, 136
- fallada d'implantació, 136
- fecundació *in vitro*, 130, 151
- FISH-DGP, 136
- fragmentació DNA, 93
- freqüència d'ejaculació, 114
- histone, 29
- ICSI, 120
- ICSI, 12
- immunolocalization, 29
- implantació, 146
- infertilitat, 85, 89, 93
- legislació, 151
- leucocitospermia, 50
- llobarro, 39, 55
- LPS, 45
- LRP, 66
- maduració meiòtica, 59
- maduració sexual, 39
- meiosi alterada, 141
- microdelecions parcials, 80
- microtúbuls, 22
- morfologia embrionària, 141
- motilitat espermàtica, 114
- MPF, 17
- MRP-1, 66
- neurogènesi, 39
- nucleomorfogènesi, 22
- oòcit, 12, 17, 59
- Oòcits MI madurats, 120
- ovari, 45
- òxido nítric, 50
- p34^{cdc2}, 17
- plasma seminal, 50
- precursor de la protamina P2 (preP2), 89
- pressió osmòtica, 99
- progesterona, 8
- protamina P2, 89
- protamine, 29
- proteïnes, 85
- proteòmica, 85
- qualitat espermàtica, 99
- quimioresistència, 66
- regió AZFc, 80
- reproducció assistida, 151
- Sephadex neutre, 109
- spermiogenesis, 29
- STS, 80
- supervivència, 146
- Sus domesticus*, 104, 109, 114
- temperatura, 55
- tractament hipertònic i hipotònic, 99
- transducció de senyal, 8
- transferència nuclear, 73
- truita, 45
- TUNEL, 93
- viabilitat espermàtica, 114
- Western blot*, 89
- zona pellúcida, 8, 130

ÍNDEX D'AUTORS

- Acerete, Laura, 45
Aguiló, Ferran, 66
Anguita, Begoña, 12, 17
Aran, Begoña, 141
Aurell, Ramon, 130
Ausió, Juan, 29
- Badia, Elena, 99, 104, 109, 114
Ballescà, Jose Luis, 80, 85, 89, 93
Barri, Pere N., 125, 130, 136, 146
Bassols, Judit, 104, 109, 114
Belil, Itziar, 130
Bergés, Neus, 66
Blázquez, Mercedes, 39, 55
Boada, Montserrat, 136, 151
Bonet, Sergi, 99, 104, 109, 114
Briz, M. Dolors, 99, 104, 109, 114
Bussalleu, Eva, 99, 104, 109, 114
- Cabrera, Maira, 50
Camejo, María Isabel, 50 93
Casas, Isabel, 99, 104, 109, 114
Castellanos, Elena, 120
Cerdà, Joan, 59
Chiva, Manel, 22, 29
Coloma, Elena, 120
Condom, Enric, 66
Coroleu, Bonaventura, 125
Costa-Borges, Nuno, 73
- Diestra, Julio E., 66
Domínguez, David, 85, 93
- Estanyol, Josep M., 85
- Fabra, Mercedes, 59
- Garcia-Gil, Núria, 99, 104, 109, 114
Gázquez, Cristina, 80
Giménez-Bonafé, Pepita, 66
Goetz, Frederick W., 45
Gornals, Baltasar, 130
Grossmann, Mark, 120
- Ibáñez, Elena, 73
Izquierdo, Dolors, 12, 17
- Jiménez-Macedo, Ana, 12, 17
- Kàdar, Elisabeth, 104
- Krasnov, Alexei, 45
Kurtz, Kathryn, 22, 29
- MacKenzie, Simon, 45
Mangrané, Clara, 136
Martínez, Fina, 22, 29
Martínez, Juan, 85, 89
Mas, Mario, 45
Meistrich, Marvin, 89
Mengual, Lourdes, 80, 85
Mezquita, Cristóbal, 93
Montserrat, Núria, 45
- Nadal, Javier, 120
Navarro-Martín, Laia, 55
- Oliva, Rafael, 80, 85, 89, 93
Oriola, Josep, 80
- Paramio, Maria Teresa, 12, 17, 73
Parriego, Mònica, 136, 141
Pérez-Tomás, Ricardo, 66
Piferrer, Francesc, 39, 55
Pinart, Elisabeth, 99, 104, 109, 114
Planas, Josep V., 45
Pons, M. Carme, 120
Pruneda, Anna, 99, 104, 109, 114
Puccio, Franca, 50
- Ribes, Enric, 22, 29
Roldan, Eduardo R. S., 8
- Sabaté, Montserrat, 141
Sánchez, Marta, 136
Sancho, Silvia, 99, 104, 109, 114
Santaló, Josep, 73
Sarabia, Laura, 146
Saumell, Imma, 125
Solvas, Ivan, 120
Suárez, Jose Fco., 66
- Tingaud-Sequeira, Angele, 59
Torelló, M. José, 146
Torregrosa, Núria, 85, 89
Tort, Lluís, 45
- Vanrell, Ivette, 120
Veiga, Anna, 125, 130, 136, 141, 146
Vidal, August, 66
Vidal, Francesca, 136, 141
- Yeste, Marc, 99, 104, 109, 114

LLISTA DE PARTICIPANTS

Acerete, Laura

Unitat de Fisiologia Animal, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i d'Immunologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona.

Tel. 935814127

Adreça electrònica: laura.acerete@uab.es

Aguiló, Ferran

Servei d'Urologia, Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge; Departament de Biologia Cel·lular i Patologia, Facultat de Medicina, Campus de Bellvitge.

Adreça electrònica: faguilo@csub.scs.es

Agulló, Jose Manuel

ETSEIB, UPC, Av. Diagonal, 647. 08028, Barcelona

Tel. 934016687

Adreça electrònica: jmaq22@hotmail.com

Andoltz, Pablo

Laboratori Investigacions Seminològiques, c/ Aribau, 280. 08006, Barcelona.

Tel. 932001166

Adreça electrònica: pandolz@wanadoo.es

Anguila, Begoña

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. Campus de Bellaterra, 08193 Barcelona.

Tel. 935811456

Fax 935811494

Adreça electrònica: begona.anguila@campus.uab.es

Anton, Ester

Unitat de Biologia Cel·lular, Fac. de Ciències, UAB. 08193, Barcelona.

Tel. 935811112

Adreça electrònica: ester.anton@uab.es

Aran, Begoña

Servei de Medicina de la Reproducció. Departament d'Obstetrícia i Ginecologia. Institut Universitari Dexeus. Passeig de la Bonanova, 89-91. 08017 Barcelona.

Tel. 932274700

Fax. 932057966

Adreça electrònica: begara@dexeus.com

Arell, Ramon

Servei de Medicina de la Reproducció. Departament d'Obstetrícia i Ginecologia. Institut Universitari Dexeus.

Passeig de la Bonanova, 89-91. 08017 Barcelona.

Tel. 932274700

Fax. 932057966

Adreça electrònica: ramaur@dexeus.com

Ausió, Juan

Department of Biochemistry and microbiology, University of Victoria, Victoria, British Columbia, Canada V8W 3 P6

Adreça electrònica: jausio@uvic.ca

Badia, Elena

Biotecnologia de la Reproducció Porcina, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus Montilivi, s/n. 17071 Girona.

Tel. 972418366

Fax 972418150

Adreça electrònica: elena.badia@gmail.com

Ballescà, José Luis

Unitat de Reproducció Assistida, Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia, Hospital Clínic. c/ Villarroel, 170. 08036 Barcelona

Adreça electrònica: ballesca@clinic.ub.es

Barberán, Emma

Adreça electrònica: emmabarberancarrera@hotmail.com

Barri, Pere N.

Servei de Medicina de la Reproducció. Departament d'Obstetrícia i Ginecologia. Institut Universitari Dexeus. Passeig de la Bonanova, 89-91. 08017 Barcelona.

Tel. 932274700

Fax. 932057966

Adreça electrònica: perbar@dexeus.com

Bassols, Judit

Biotecnologia de la Reproducció Porcina, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus Montilivi, s/n. 17071 Girona.

Tel. 972418366

Fax 972418150

Adreça electrònica: judit.bassols@udg.es

Belil, Itziar

Servei de Medicina de la Reproducció. Departament d'Obstetrícia i Ginecologia. Institut Universitari Dexeus. Passeig de la Bonanova, 89-91. 08017 Barcelona.

Tel. 932274700

Fax. 932057966

Adreça electrònica: *itzbel@dexeus.com*

Bergés, Neus

Departament de Ciències Fisiològiques II, Facultat de Medicina, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona C/ Feixa Llarga, s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat.

Adreça electrònica: *neusaqua@yahoo.es*

Bielsa, M^a Ángeles

Laboratori Investigacions Seminològiques, c/ Aribau, 280. 08006, Barcelona.

Tel. 932001166

Adreça electrònica: *mabielsa@wanadoo.es*

Blanco, Joan

Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Ciències, UAB, 08193 Bellaterra, Barcelona.

Tel. 935811498

Adreça electrònica: *joan.blanco@uab.es*

Blázquez, Mercedes

Departament de Recursos Marins Renovables. Institut de Ciències del Mar, ICM-CSIC.

Passeig Marítim de la Barceloneta, 37.49. 08003 Barcelona.

Tel. 932309542

Fax. 932309555

Adreça electrònica: *blazquez@icm.csic.es*

Boada, Montserrat

Servei de Medicina de la Reproducció. Departament d'Obstetrícia i Ginecologia. Institut Universitari Dexeus. Passeig de la Bonanova 89-91. 08017 Barcelona.

Tel. 932274700

Fax. 932057966

Comissió Assessora sobre Tècniques de Reproducció Humana Assistida a Catalunya.

Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida.

Adreça electrònica: *monboa@dexeus.com*

Boix, Elisenda

Adreça electrònica: *elisendaboix@hotmail.com*

Bonet, Sergi

Bioteconologia de la Reproducció Porcina, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus Montilivi s/n. 17071 Girona.

Tel. 972418366

Fax 972418150

Adreça electrònica: *sergi.bonet@udg.es*

Briz, Ma Dolors

Bioteconologia de la Reproducció Porcina, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus Montilivi s/n. 17071 Girona.

Tel. 972418366

Fax 972418150

Adreça electrònica: *mailo.briz@udg.es*

Bussalleu, Eva

Bioteconologia de la Reproducció Porcina, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus Montilivi s/n. 17071 Girona.

Tel. 972418366

Fax 972418150

Adreça electrònica: *eva.bussalleu@udg.es*

Cabrera, Maira

Lab. Inmunoparasitología. Instituto de Biomedicina. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

Adreça electrònica: *cabgon@telcel.net.ve*

Camejo, María Isabel

Departamento de Biología de Organismos. Universidad Simón Bolívar. Baruta, Estado Miranda. Venezuela.

Tel. 58-212-9063077

Adreça electrònica: *mcamejo@usb.ve*

Carbonell, Lourdes

Dept. Patologia i Terapèutica Experimental. Fac. Medicina, Ctra. Feixa Llarga, s/n. 08970 L'Hospitalet de Llobregat.

Tel. 934024288

Adreça electrònica: *lcarbonell@ub.edu*

Casas, Isabel

Bioteconologia de la Reproducció Porcina, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus Montilivi s/n. 17071 Girona.

Tel. 972418366

Fax 972418150

Adreça electrònica: *isabel.casas@udg.es*

Castellanos, Elena

Unitat de Reproducció Assistida. Centro Médico Teknon, c/Vilana 12, 08022 Barcelona.

Tel. 932906296

Fax. 932906297

Adreça electrònica: *ura@cmteknon.com*

Cerdà, Joan

Laboratori IRTA-CSIC, Institut de Ciències del Mar (CSIC). Passeig Marítim, 37-49. 08003 Barcelona.

Tel. 932309531

Fax 932309555

Adreça electrònica: *jcelda@icm.csic.es*

Chiva, Manel

Departament de ciències Fisiològiques II. Facultat de Medicina, Campus Bellvitge.

Feixa Llarga s/n Hospitalet de Llobregat 08907.

Tel. 934035824

Fax.934024268

Adreça electrònica: *mchiva@ub.edu*

Coloma, Elena

Unitat de Reproducció Assistida. Centro Médico Teknon, c/Vilana 12, 08022 Barcelona.

Tel. 932906296

Fax. 932906297

Adreça electrònica: ura@cmteknon.com

Colomar, Ana

Adreça electrònica: boixa30@hotmail.com

Condom, Enric

Servei d'Anatomia Patològica, Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge.

Adreça electrònica: ecm@csub.scs.es

Coroleu, Bonaventura

Servei de Medicina de la Reproducció. Institut Universitari Dexeus.

Passeig de la Bonanova, 67. 08017 Barcelona

Tel. 932274700

Fax 932057966

Adreça electrònica: vencor@dexeus.com

Costa-Borges, Nuno

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia e Immunologia. Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193, Bellaterra.

Tel. 935811112

Fax 935812295

Adreça electrònica: nunoluis.borges@uab.es

de Mateo, Sara

Unitat de Biologia Cel·lular, Edifici C, UAB. 08193, Bellaterra, Barcelona.

Tel. 625726081

Adreça electrònica: sarita_mateo@hotmail.com

Diestra, Julio E.

Departament de Ciències Fisiològiques II, Facultat de Medicina, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona C/ Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat.

Tel. 934035824

Adreça electrònica: jdiestra@ub.edu

Domínguez, David

Laboratori de Genètica Humana. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. C/ Casanova, 143. 08036 Barcelona.

Tel. 934021877

Fax. 934035260

Adreça electrònica: daviddomfan@hotmail.com

Durfort, Mercè

Dept. Biologia Cel·lular, Fac. Biologia, UB, Av. Diagonal, 645. 08028, Barcelona.

Tel. 934021536

Adreça electrònica: mdurfort@ub.edu

Estanyol, Josep M^a

Unitat de proteòmica, Facultat de Medicina, SCT-PCB-IDIBAPS.

Adreça electrònica: jmestanyol@ub.edu

Fabra, Mercedes

Laboratori IRTA-CSIC, Institut de Ciències del Mar (CSIC). Passeig Marítim, 37-49. 08003 Barcelona.

Tel. 932309531

Fax 932309555

Adreça electrònica: mfabra@icm.csic.es

Fosas, Núria

Institut de Reproducció CEFER, c/ Marquesa de Villalonga, 12, Barcelona.

Tel. 932546070

Adreça electrònica: nuriafosas@mixmail.com

Gallego, Felipe

Adreça electrònica: gallegoterris@hotmail.com

Garcia-Gil, Núria

Bioteχνologia de la Reproducció Porcina, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus Montilivi s/n. 17071 Girona.

Tel. 972418366

Fax 972418150

Adreça electrònica: nuria.garcia@udg.es

Gázquez, Cristina

Laboratori de Genètica Humana. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. C/ Casanova, 143. 08036 Barcelona.

Tel. 934021877

Fax. 934035260

Adreça electrònica: crisgb79@hotmail.com

Giménez-Bonafé, Pepita

Departament de Ciències Fisiològiques II, Facultat de Medicina, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona C/ Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat.

Adreça electrònica: pgimenez@ub.edu

Goetz, Frederick W.

GREAT Lakes Water Institute, University of Wisconsin, Milwaukee, WI 53204.

Tel. 414-382-1742

Fax. 414-382-1705

Adreça electrònica: rick@uwm.edu

Gómez, Ana

Adreça electrònica: annahander@hotmail.com

Gornals, Baltasar

Servei de Medicina de la Reproducció. Departament d'Obstetrícia i Ginecologia. Institut Universitari Dexeus. Passeig de la Bonanova 89-91. 08017 Barcelona. Tel. 932274700
Fax. 932057966
Adreça electrònica: *balgor@dexeus.com*

Grossmann, Mark

Unitat de Reproducció Assistida. Centro Médico Teknon, c/Vilana 12, 08022 Barcelona. Tel. 932906296
Fax. 932906297
Adreça electrònica: *mgrossmann@cmtekon.com*

Ibañez, Elena

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia e Immunologia. Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193, Bellaterra. Tel. 935811112
Fax. 935812295
Adreça electrònica: *elena.ibanez@uab.es*

Izquierdo, Dolors

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. Campus de Bellaterra, 08193 Barcelona. Tel. 935811456
Fax 935811494
Adreça electrònica: *dolors.izquierdo@uab.es*

Jiménez-Macedo, Ana R.

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. Campus de Bellaterra, 08193 Barcelona. Tel. 935811456
Fax. 935811494
Adreça electrònica: *anaraquel.jimenez@campus.uab.es*

Kàdar, Elisabeth

Biotecnologia de la Reproducció Porcina, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus Montilivi s/n. 17071 Girona. Tel. 972418366
Fax 972418150
Adreça electrònica: *ekadargarcia@yahoo.com*

Krasnov, Aleksei

Institute for Applied Biotechnology, University of Kuopio, Finlàndia. Tel. 35817163742
Fax. 35817163752
Adreça electrònica: *krasnov@uku.fi*

Kurtz, Kathryn

Departament de ciències Fisiològiques II. Facultat de Medicina, Campus Bellvitge. Feixa Llarga s/n Hospitalet de Llobregat 08907. Tel. 934035824

Fax. 934024268
Adreça electrònica: *klkurt00@smumn.edu*

MacKenzie, Simon

Unitat de Fisiologia Animal, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i d'Immunologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona. Tel. 935814127
Adreça electrònica: *Simon.MacKenzie@uab.es*

Mangrané, Clara

Servei de Medicina de la Reproducció. Departament d'Obstetrícia i Ginecologia. Institut Universitari Dexeus. Passeig de la Bonanova 89-91. 08017 Barcelona. Tel. 932274700
Fax. 932057966
Adreça electrònica: *claman@dexeus.com*

Martínez, Fina

Departament de ciències Fisiològiques II. Facultat de Medicina, Campus Bellvitge. Feixa Llarga s/n Hospitalet de Llobregat 08907. Tel. 934035824
Fax. 934024268
Adreça electrònica: *finamartinez@ub.edu*

Martínez, Juan

Laboratori de Genètica Humana. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. C/ Casanova, 143. 08036 Barcelona. Tel. 934021877
Fax. 934035260
Adreça electrònica: *jmartinezheredia@hotmail.com*

Mas, Mario

Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona. Tel. 934021557
Fax. 934110359
Adreça electrònica: *mario.mas@yahoo.es*

Meistrich, Marvin

Department of Experimental Radiation Oncology, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77030, USA.

Mengual, Lourdes

Laboratori de Biologia Molecular. Fundació Puigvert, Barcelona. Adreça electrònica: *lmengual@fundacio}-puigvert.es*

Mezquita, Cristóbal

Laboratori de Genètica Molecular. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. C/ Casanova, 143.

08036 Barcelona.
Adreça electrònica: *omezquita@ub.edu*

Mir, Marta

ETSEIB, UPC, Av. Diagonal, 647. 08028, Barcelona
Tel. 934016687
Adreça electrònica: *marta.mir@upc.edu*

Montserrat, Núria

Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona.
Tel. 934021557
Fax. 934110359
Adreça electrònica: *nuria.montserrat@ub.edu*

Nadal, Javier

Unitat de Reproducció Assistida. Centro Médico Teknon, c/Vilana 12, 08022 Barcelona.
Tel. 932906296
Fax. 932906297
Adreça electrònica: *javier.nadal@dona}-dona.org*

Navarro-Martín, Laia

Departament de Recursos Marins Renovables. Institut de Ciències del Mar, ICM-CSIC
Passeig Marítim de la Barceloneta, 37.49. 08003 Barcelona.
Tel. 932309500 Ext.1175
Fax. 932309555
Adreça electrònica: *lnavarro@icm.csic.es*

Oliva, Rafael

Laboratori de Genètica Humana. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. C/ Casanova, 143. 08036 Barcelona.
Tel. 934021877
Fax. 934035260
Adreça electrònica: *oliva@medicina.ub.es*

Ordoñez, Elena

UAB, Laboratori General.
Tel. 630839074
Adreça electrònica: *elenatorra@gmail.com*

Oriola, Josep

Laboratori de Genètica Humana. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. C/ Casanova, 143. 08036 Barcelona.
Tel. 934021877
Fax. 934035260
Adreça electrònica: *joriola@clinic.ub.es*

Paramio, Maria Teresa

Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. Campus de Bellaterra, 08193 Barcelona.
Tel. 935811456
Fax 935811494
Adreça electrònica: *teresa.paramio@uab.es*

Parriego, Mònica

Servei de Medicina de la Reproducció. Departament d'Obstetrícia i Ginecologia. Institut Universitari Dexeus. Passeig de la Bonanova 89-91. 08017 Barcelona.
Tel. 932274700
Fax. 932057966
Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. 08193 Barcelona.
Tel: 932274700
Fax: 932057966
Adreça electrònica: *monpar@dexeus.com*

Pérez-Tomás, Ricardo

Dept. Patologia i Terapèutica Experimental. Fac. Medicina, Ctra. Feixa Llarga, s/n. 08970 L'Hospitalet de Llobregat.
Tel. 934024288
Adreça electrònica: *rperez@ub.edu*

Piferrer, Francesc

Departament de Recursos Marins Renovables. Institut de Ciències del Mar, ICM-CSIC
Passeig Marítim de la Barceloneta, 37.49. 08003 Barcelona.
Tel. 932309567
Fax. 932309555
Adreça electrònica: *piferrer@icm.csic.es*

Pinart, Elisabeth

Biotecnologia de la Reproducció Porcina, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus Montilivi s/n. 17071 Girona.
Tel. 972418366
Fax 972418150
Adreça electrònica: *elisabeth.pinart@udg.es*

Planas, Josep V.

Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona.
Tel. 934021557
Fax. 934110359
Adreça electrònica: *jplanas@ub.edu*

Pons, M. Carme

Unitat de Reproducció Assistida. Centro Médico Teknon, c/Vilana 12, 08022 Barcelona.
Tel. 932906296
Fax. 932906297
Adreça electrònica: *ura@cmtekon.com*

Pruneda, Anna

Biotecnologia de la Reproducció Porcina, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus Montilivi s/n. 17071 Girona.

Tel. 972418366

Fax 972418150

Adreça electrònica: anna.pruneda@udg.es

Puccio, Franca

Departamento de Biología de Organismos. Universidad Simón Bolívar. Baruta, Estado Miranda. Venezuela.

Tel. 58-212-9063077

Instituto de Biomedicina-MSDS-UCV. Caracas. Venezuela.

Adreça electrònica: fpuccio@telcel.net.ve

Ribes, Enric

Departament de Biologia Cel·lular. Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona.

Adreça electrònica: eribes@ub.edu

Rodríguez, Ignasi

Adreça electrònica: chenkanrodriguez@hotmail.com

Roldán, Eduardo R.S.

Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC, c/ José Gutiérrez Abascal, 2. 28006, Madrid.

Tel. 914111328

Fax. 915645078

Adreça electrònica: roldane@mncn.csic.es

Rueda, Elena

UAB, Laboratori General.

Tel. 696629346

Adreça electrònica: lauraruedabravo@yahoo.es

Sabaté, Montserrat

Servei de Medicina de la Reproducció. Departament d'Obstetrícia i Ginecologia. Institut Universitari Dexeus. Passeig de la Bonanova 89-91. 08017 Barcelona.

Tel. 932274700

Fax. 932057966

Adreça electrònica: monsab@dexeus.com

Sánchez, Marta

Servei de Medicina de la Reproducció. Departament d'Obstetrícia i Ginecologia. Institut Universitari Dexeus. Passeig de la Bonanova 89-91. 08017 Barcelona.

Tel. 932274700

Fax. 932057966

Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Barcelona

Adreça electrònica: marsan@dexeus.com

Sancho, Silvia

Biotecnologia de la Reproducció Porcina, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus Montilivi s/n. 17071 Girona.

Tel. 972418366

Fax 972418150

Adreça electrònica: silvia.sancho@udg.es

Santaló, Josep

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia e Immunologia. Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193, Bellaterra.

Tel. 935811112

Fax 935812295

Adreça electrònica: josep.santalo@uab.es

Saperas, Núria

ETSEIB, UPC, Av. Diagonal, 647. 08028, Barcelona

Tel. 934016687

Adreça electrònica: nuria.saperas@upc.edu

Sarabia, Laura

Servicio de Medicina de la Reproducción. Institut Universitari Dexeus.

Pg. Bonanova, 67.08017 Barcelona.

Tel. 932274700

Fax. 932057966

Adreça electrònica: lausar@telefonica.net

Sarrate, Zaida

Unitat de Biologia Cel·lular, Fac. de Ciències, UAB. 08193, Barcelona.

Tel. 935811112

Adreça electrònica: zaida.sarrate@uab.es

Saumell, Imma

Servei de Medicina de la Reproducció. Institut Universitari Dexeus.

Passeig de la Bonanova, 67. 08017 Barcelona

Tel. 932274700

Fax 932057966

Adreça electrònica: immsau@dexeus.com

Solvas, Ivan

Unitat de Reproducció Assistida. Centro Médico Teknon, c/Vilana 12, 08022 Barcelona.

Tel. 932906296

Fax. 932906297

Adreça electrònica: isolvas@hotmail.com

Suárez, José Fco.

Servei d'Urologia, Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge; Departament de Biologia Cel·lular i Patologia, Facultat de Medicina, Campus de Bellvitge.

Adreça electrònica: jfsuarez@csuab.scs.es

Tingaud-Sequeira, Angele

Laboratori IRTA-CSIC, Institut de Ciències del Mar (CSIC). Passeig Marítim, 37-49. 08003 Barcelona.

Tel. 932309531

Fax 932309555

Adreça electrònica: tingaud@icm.csic.es

Torelló, M. José

Servicio de Medicina de la Reproducció. Institut Universitari Dexeus.

Pg. Bonanova, 67.08017 Barcelona.

Tel. 932274700

Fax. 932057966

Adreça electrònica: jostor@dexeus.com

Torregrosa, Núria

Laboratori de Genètica Humana. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. C/ Casanova, 143. 08036 Barcelona.

Tel. 934021877

Fax. 934035260

Adreça electrònica: nuria_torregrosa@hotmail.com

Tort, Lluís

Unitat de Fisiologia Animal, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i d'Immunologia, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona.

Tel. 935814127

Adreça electrònica: Lluís.Tort@uab.es

Trenchs, Joan

Laboratori d'anàlisi Dr. Echevarne, Dept. Citologia, c/ Provença, 312. 08037, Barcelona.

Tel. 935040111

Adreça electrònica: jtrenchs@yahoo.es

Vanrell, Ivette

Unitat de Reproducció Assistida. Centro Médico Teknon, c/Vilana 12, 08022 Barcelona.

Tel. 932906296

Fax. 932906297

Adreça electrònica: ivettevan@yahoo.com

Vidal, August

Servei d'Anatomia Patològica, Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge.

Adreça electrònica: avidal@csub.scs.es

Vidal, Francesca

Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. 08193 Barcelona.

Tel: 932274700

Fax: 932057966

Adreça electrònica: francesca.vidal@uab.es

Veiga, Anna

Servei de Medicina de la Reproducció. Departament d'Obstetrícia i Ginecologia. Institut Universitari Dexeus. Passeig de la Bonanova 89-91. 08017 Barcelona.

Tel. 932274700

Fax. 932057966

Adreça electrònica: anavei@dexeus.com

Viñas, Jordi

Departament de Recursos Marins Renovables. Institut de Ciències del Mar, ICM-CSIC

Passeig Marítim de la Barceloneta, 37.49. 08003 Barcelona.

Tel. 932309500 Ext. 1172

Fax. 932309555

Adreça electrònica: jvinas@icm.csic.es

Yeste, Marc

Biotecnologia de la Reproducció Porcina, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus Montilivi s/n. 17071 Girona.

Tel. 972418366

Fax 972418150

Adreça electrònica: marc.yeste@udg.es

Amb la col·laboració de:



**Xarxa Temàtica
de Biologia de
la Reproducció**



Red Nacional
Temàtica de
Reproducció
Porcina