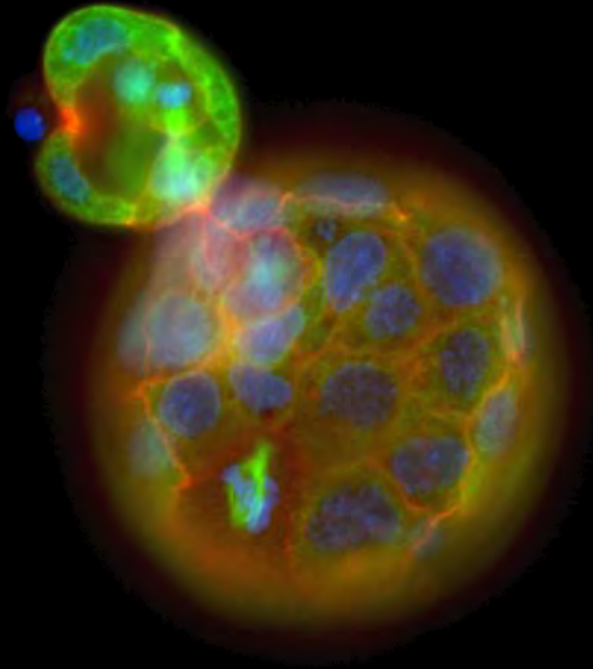


# BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ

VOLUM 10

2007



## X Jornades de la Secció de Biologia de la Reproducció



**Societat Catalana de Biologia**

**Barcelona, 25 d'abril de 2007**



## BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ



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

## BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ

X JORNADES DE LA SECCIÓ DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ

**Amb la col·laboració de:**

CaixaFòrum. Centre Social i Cultural de l'Obra Social "la Caixa"  
IVI Barcelona  
Institut d'Estudis Catalans  
Universitat Autònoma de Barcelona  
Xarxa Temàtica de Biologia de la Reproducció

BARCELONA  
2007

Il·lustració de la coberta: Imatge d'un blastocist de ratolí en eclosió. Foto cedida per Nuno Costa-Borges.

© dels autors de les ponències  
Editat per la Societat Catalana de Biologia ([www.iec.cat/scb/](http://www.iec.cat/scb/)),  
Filial de l'Institut d'Estudis Catalans  
Carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona

Primera edició: abril de 2007  
Tiratge: 120 exemplars

Text revisat lingüísticament i compost per Ricard Roca

ISBN: 978-84-7283-911-3

Són rigorosament prohibides, sense l'autorització escrita dels titulars del copyright, la reproducció total o parcial d'aquesta obra, inclòs el disseny de la coberta, 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, la transmissió per qualsevol tipus de sistema i la consulta en xarxa telemàtica o d'Internet. Les infraccions d'aquests drets estan sotmeses a les sancions establertes per les lleis.

## TAULA

Formació de l'espermatòfor a la cabra de mar <i>Maja brachydactyla</i> (Decapoda, Brachyura) C. G. SIMEÓ, G. ROTLLANT, E. RIBES.....	9
Expressió gènica als diferents tipus cel·lulars de la línia germinal durant l'espermatogènesi del llobarro ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) J. VIÑAS, F. PIFERRER.....	15
Aspectes ultraestructurals de l'espermiogènesi de <i>Chaetopleura fulva</i> , (Mollusca, Polyplacophora): Estudi preliminar M. G. BOZZO, M. POQUET, E. SAGRISTÀ, M. DURFORT.....	21
Transició de proteïnes, acetilació de la histona H4 i estructura de la cromatina en l'espermiogènesi de la sèpia ( <i>Sepia officinalis</i> ) F. MARTÍNEZ-SOLER, K. KURTZ, M. CHIVA.....	25
El sistema kisspeptina-GPR54 y su relación con el control neuroendocrino de la reproducción A. MECHALY, J. VIÑAS, F. PIFERRER.....	33
Histones and nucleosomes in crustacean sperm nuclei previously described as lacking DNA-associated proteins K. KURTZ, F. MARTÍNEZ, E. FONFRÍA-SUBIRÓS, N. SAPERAS, M. CHIVA.....	39
Aspectes del cicle gonadal del mollusc bivalve <i>Callista chione</i> (L. 1758): Estudi preliminar E. GALIMANY, M. RAMÓN, M. BAETA, M. DURFORT.....	47
Enucleació químicament induïda d'oòcits de ratolí per a l'aplicació en protocols de transferència nuclear N. COSTA-BORGES, S. GONZÁLEZ, J. SANTALÓ, E. IBÁÑEZ.....	53
Derivació de línies de cèl·lules mare embrionàries humanes: envers el cultiu en condicions lliures de xenobiòtics i en condicions químicament definides I. RODRÍGUEZ, A. RAYA, B. ARAN, A. CONSIGLIO, Y MUÑOZ, A. VEIGA, J. C. IZPISUA.....	59
Derivació de cèl·lules mare embrionàries a partir de blastòmers aïllats de ratolí S. GONZÁLEZ, E. IBÁÑEZ, N. COSTA-BORGES, J. SANTALÓ.....	65
Embryonic stem cell test (EST): método <i>in vitro</i> para evaluar la embriotoxicidad J. DE LAPUENTE, J. GONZÁLEZ-LINARES, M. BORRÀS.....	71
Canvis en la concentració de carnitina, glutamat i inositol al fluid i als espermatozoides epididimaris de porcí A. PRUNEDA, C.-HEI YEUNG, S. BONET, E. PINART, T. G. COOPER.....	77
Efecte de l'addició de prostaglandina F <sub>2α</sub> sobre la qualitat espermàtica de les ejaculacions de mascles reproductors porcíns M. YESTE, M. BRIZ, E. PINART, S. SANCHO, N. GARCIA-GIL, E. BADIA, J. BASSOLS, A. PRUNEDA, E. BUSSALLEU, I. CASAS, A. FÀBREGA, S. BONET.....	83

Correlació de proteïnes de l'espermatozoide humà amb la integritat del dna, amb el contingut de protamines i amb els nivells de precursor de protamina S. DE MATEO, J. MARTÍNEZ-HEREDIA, J. MANUEL VIDAL-TABOADA, D. DOMÍNGUEZ-FANDOS, J. M. ESTANYOL, J. L. BALLESCÀ, R. OLIVA.....	89
Diferències d'expressió proteica entre mostres de pacients astenozoospermics i normozoospermics J. MARTÍNEZ-HEREDIA, S. DE MATEO, J. M VIDAL-TABOADA, J. L. BALLESCÀ, R. OLIVA.....	93
Caracterització molecular del cromosoma Y en 2.173 pacients infèrtils estudiats en els últims deu anys C. GÁZQUEZ, L. FARES TAIE, M. ALDEA, J. ORIOLA, J. L. BALLESCÀ, R. OLIVA .....	97
Estudi preliminar d'anomalies epigenètiques en espermatozoides d'individus que consulten per problemes de fertilitat M. PLADEVALL, J. BLANCO, M. GROSSMANN, M. C. PONS, C. CAMPRUBÍ.....	103
Validesa de la tècnica d'ICSI a dia +1 per fallada completa de la fecundació per inseminació I. VANRELL, M.GROSSMANN, M. C. PONS, I. SOLVAS, J. M. VILADOMS, E. CASTELLANOS, J. UNZUETA, J. NADAL.....	109
Consecuencias de la rotura sin salto (SS) de la membrana de los ovocitos tras el ICSI M. MARTÍN, M. FLORENSA, M. ESBERT, M. RIQUEROS, A. BALLESTEROS, G. CALDERÓN.....	113
Estudi del desenvolupament d'embrions procedents d'oòcits metafase i madurats <i>in vitro</i> : resultats preliminars Í. SEBASTIA, M. PARRIEGO, A. BUSQUETS, M. BOADA, B. COROLEU, A. VEIGA.....	117
Valoració de la qualitat embrionària fins a l'estadi de blastocist en embrions que presenten divisió precoç S. PÉREZ, G. ARROYO, J. SANTALÓ, M. BOADA, B. COROLEU, A. VEIGA.....	121
Transferència d'un sol embrió congelat: factors embriològics predictius M. VALIENTE, M. SOLÉ, J. SANTALÓ, M. BOADA, V. COROLEU, A. VEIGA.....	127
Donació d'embrions viables per a recerca al nostre país: resposta de les pacients M. LUNA, M. BOADA, B. ARAN, V. COROLEU, A. VEIGA, P. N. BARRI.....	133





Aquestes són les primeres Jornades de Biologia de la Reproducció sense el nostre estimat amic i mestre Josep Egozcue i Cuixart. Ell, qui va ser col·lega, inspirador i conseller de tants de nosaltres, segueix ben present en el nostre record; per això hem decidit dedicar la conferència d'enguany a la seva memòria, iniciativa que confiem que es mantingui mentre perduri el seu record. Que aquest continuï guiant-nos i aconsellant-nos com quan ell era entre nosaltres.

ELS ORGANITZADORS



## FORMACIÓ DE L'ESPERMATÒFOR A LA CABRA DE MAR *Maja brachydactyla* (DECAPODA, BRACHYURA)

Carles G. Simeó,<sup>1\*</sup> Guiomar Rotllant,<sup>1</sup> Enric Ribes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>IRTA

Sant Carles de la Ràpita, Ctra. Poble Nou, km 5,5. 43540 Sant Carles de la Ràpita. [carlos.garcia@irta.es](mailto:carlos.garcia@irta.es), [guiomar.rotllant@irta.es](mailto:guiomar.rotllant@irta.es).

<sup>2</sup> Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Av. Diagonal, 645. 08028 Barcelona. [eribes@ub.edu](mailto:eribes@ub.edu).

---

### Resum

La formació de l'espermatòfor de *Maja brachydactyla* i el paper del conducte deferent s'han descrit mitjançant tècniques de microscòpia òptica i electrònica. L'epiteli del conducte deferent anterior produeix les secrecions que formen la paret de l'espermatòfor. El conducte deferent mitjà conté els espermatòfors envoltats de fluids seminals. El conducte deferent posterior continua la producció i magatzem de secrecions seminals. L'espermatòfor *M. brachydactyla* és el·lipsoïdal i està constituït per una fina paret acel·lular que envolta els espermatozoides que es troben embeguts en una matriu. El procés de formació, estructura i funció de l'espermatòfor és equivalent al d'altres espècies de braquiürs prèviament descrites.

**Paraules clau** espermatòfor, aparell reproductor masculí, reproducció, morfologia, Decapoda.

### Abstract

Spermatophore formation in *Maja brachydactyla* and the role of the vas deferens have been described by light and electron microscopy. The epithelium from anterior vas deferens secretes the substances that will form the wall of the spermatophore. The median vas deferens contains spermatophores surrounded by seminal fluid. The distal vas deferens secretes and stores seminal secretions. Spermatophore of *M. brachydactyla* is ellipsoidal and consists of a thin acellular wall which surrounds the sperm mass embedded in a matrix. The process of spermatophore formation, structure and function are similar to previous studies in other Brachyuran species.

**Key words** spermatophore, male reproductive system, reproduction, morphology, Decapoda.

---

## INTRODUCCIÓ

La reproducció en els crustacis decàpodes és un procés complex, en el qual, generalment, els mascles transfereixen espermatozoides aflagellats empaquetats en càpsules anomenades espermatòfors (Subramoniam, 1995; Moriyasu *et al.*, 2002). Els espermatòfors estan formats pels espermatozoides embeguts en una matriu i una paret d'una o diverses capes de secrecions acel·lulars, produïdes en el conducte deferent. Els espermatòfors tenen la funció de protegir els espermatozoides durant la transferència, i s'emmagatzemen al receptacle seminal o espermateca de la femella (Adiyodi *et al.*, 1988). Els braquiürs presenten un espermatòfor petit i el·lipsoide, amb una paret acel·lular fina. Els espermatòfors es formen per les secrecions de la part anterior del conducte deferent, mentre que les porcions mitjanes i distals em-

magatzemen els espermatòfors i produeixen les secrecions seminals que acompanyen els espermatòfors (Krol *et al.*, 1992).

La cabra de mar, *Maja brachydactyla*, és una espècie de l'Atlàntic NE d'alt interès comercial, sotmesa a una intensa explotació pesquera, i amb un important potencial en l'aqüicultura. Els estudis recents han demostrat que les femelles de *M. brachydactyla* poden emmagatzemar els espermatòfors al receptacle seminal després de cada còpula, cosa que permet una posterior fertilització sense necessitat de copular (González-Gurriarán *et al.*, 1998; Rotllant *et al.*, en premsa).

L'objectiu d'aquest estudi és la descripció de la formació i estructura de l'espermatòfor de *M. brachydactyla* mitjançant tècniques histològiques, i se centra principalment en la morfologia del conducte deferent anterior i mitjà.

## MATERIAL I MÈTODES

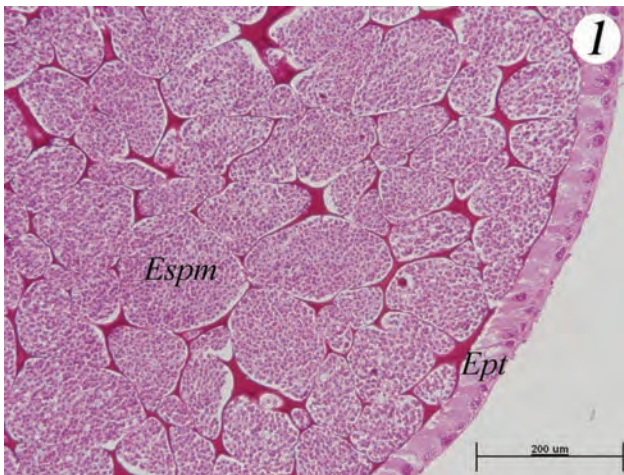
Els mascles de *Maja brachydactyla* foren capturats a la Ria de A Corunya (Galícia) amb tresmall. La dissecció es realitzà en animals anestesiats en fred i s'extragué l'aparell reproductor (testicles i conductes deferents) per a ser fixats immediatament. Per microscòpia òptica, els conductes deferents se seccionaren en les diferents regions, es fixaren en Bouin i es deshidrataren en un gradient creixent d'alcohol. Els teixits s'incloueren en parafina, els blocs es tallaren en un micròtom Leica RM 2155® en seccions de 3 µm que es tenyiren amb hematoxilina i eosina. Les observacions es realitzaren amb un microscopi Olympus BX61®. Per microscòpia electrònica, els teixits es fixaren en 2 % de paraformaldehid i 2,5 %

de glutaraldehid en tampó cacodilat al 0,1 M i, seguidament, amb tetraòxid d'osmi a l'1 % en tampó cacodilat. Les mostres per a microscòpia electrònica de transmissió es deshidrataren amb acetona i s'incloueren en resina Spurr. Les seccions ultrafines es realitzaren en un ultramicròtom Leica UCT®, es contrastaren en acetat d'uranil i citrat de plom i s'observaren en un microscopi electrònic Jeol EM-1010® a 80 kV. Les mostres per a microscòpia electrònica de rastreig, un colp deshidratades en alcohol, es dessecaren amb el punt crític amb CO<sub>2</sub> i es recobriren amb or i palladi. Les observacions es realitzaren en un microscopi Hitachi S-2300® a 10-15 kV.

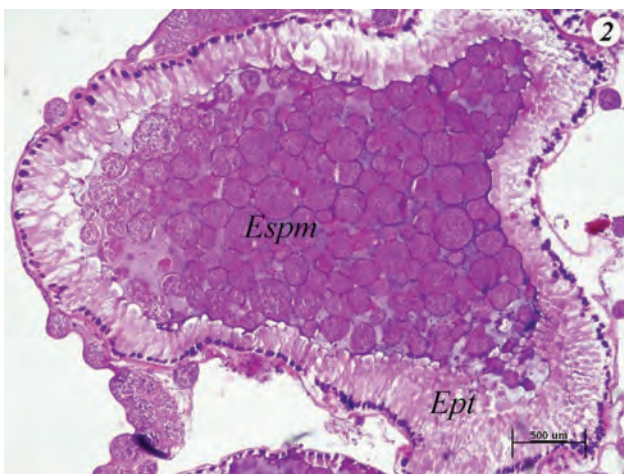
## RESULTATS

### Morfologia i histologia del conducte deferent

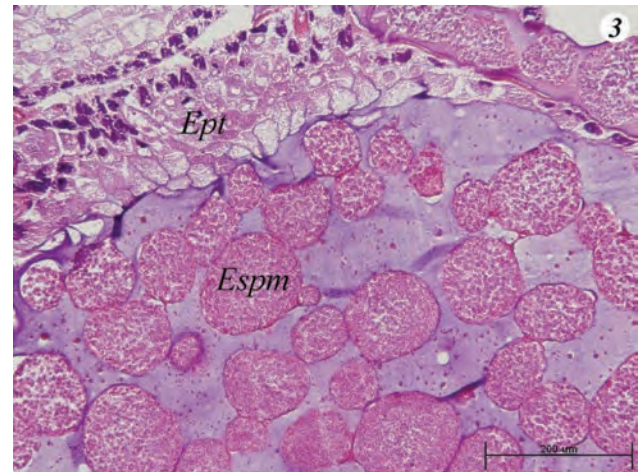
El conducte deferent de la cabra de mar, *Maja*



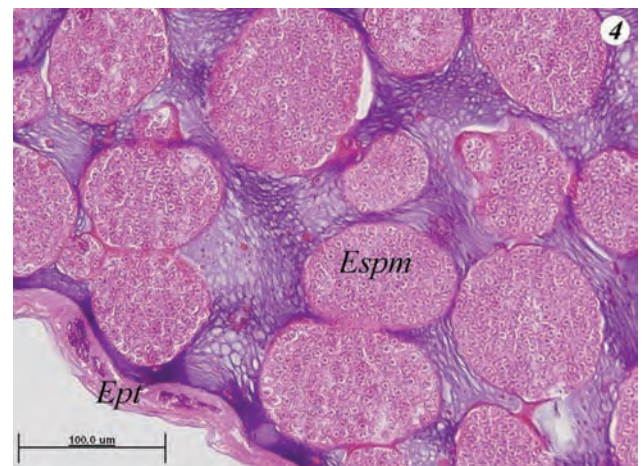
**Figura 1** Inici de la formació dels espermatòfors. La primera secreció (en vermell amb hematoxilina i eosina) de l'epiteli del CDA divideix la massa d'espermatòfors en agregats. *Ept*: epiteli, *Espm*: espermatòfors en formació. H-E (hematoxilina- eosina). MO (microscopi òptic).



**Figura 2** Final de la formació dels espermatòfors. La segona secreció (en blau amb hematoxilina i eosina) del CDA envolta els agregats d'espermatòfors per formar els espermatòfors. *Ept*: epiteli, *Espm*: espermatòfors. H-E. MO.



**Figura 3** Espermatòfors envoltats de fluids seminals al CDM. *Ept*: epiteli, *Espm*: espermatòfors. H-E. MO.



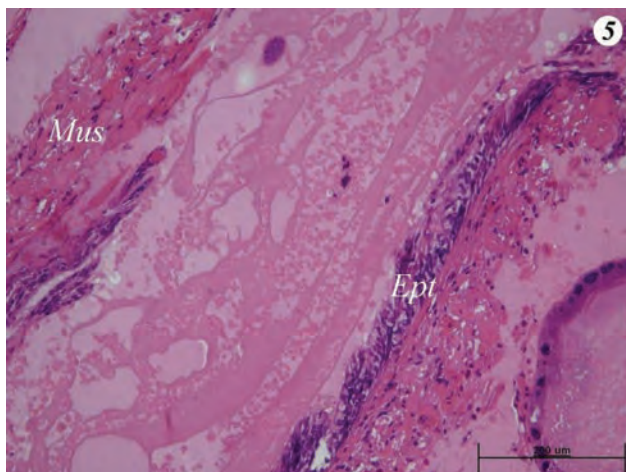
**Figura 4** Espermatòfors emmagatzemats al CDM. Les substàncies secretades al llarg del CDM s'acumulen i formen vesícules que es disposen entre els espermatòfors. *Ept*: epiteli, *Espm*: espermatòfors. H-E. MO.



*brachydactyla*, és un òrgan parell que es localitza a la part posterior del cefalotòrax, sobre l'hepatopàncrees, que es pot dividir en tres regions: el conducte deferent anterior (CDA), mitjà (CDM) i posterior (CDP). El CDA és la continuació del testicle des de l'extrem anterior del cor, i transcorre sota aquest. És un tub recargolat amb dues parts: *anterior*, pròxima al testicle, amb la superfície del conducte llisa, i *posterior*, amb petits diverticles aïllats lleugerament ramificats que surten del conducte principal. El CDA presenta un epitelí prismàtic secretor, amb nuclis en posició basal (figures 1, 2 i 8). En la part anterior es troben espermatozoides lliures, mentre que en la part posterior es troben espermatòfors envoltats de fluid seminal. El CDM és un tub estirat sota el cor amb nombrosos diverticles sobre la meitat dorsal, de major altura que al CDA, mentre que la meitat ventral és llisa. L'epitelí del CDM és prismàtic i secretor. Als diverticles s'observen feixos de musculatura que envolten la paret en espiral. El CDM conté espermatòfors envoltats de fluid seminal (figura 3). El CDP ocupa l'espai entre l'extrem posterior del cor i del cos. Presenta una glàndula d'aspecte massiu formada per molts diverticles altament ramificats. L'epitelí de les glàndules és variable, amb cèl·lules cuboïdals i planes, envoltades de fibres musculars. La llum de les glàndules conté secrecions seminals. El CDP presenta un epitelí pseudoestratificat, que descansa sobre una làmina basal. Una capa externa molt desenvolupada de musculatura envolta l'epitelí (figura 5). La llum del conducte està anastomosada, però ocasionalment es poden trobar espermatòfors amb secrecions seminals.

### Formació de l'espermatòfor

Els espermatozoides entren en el CDA formant una massa homogènia. La part anterior del CDA presenta dos tipus de secrecions. La primera secreció es te-

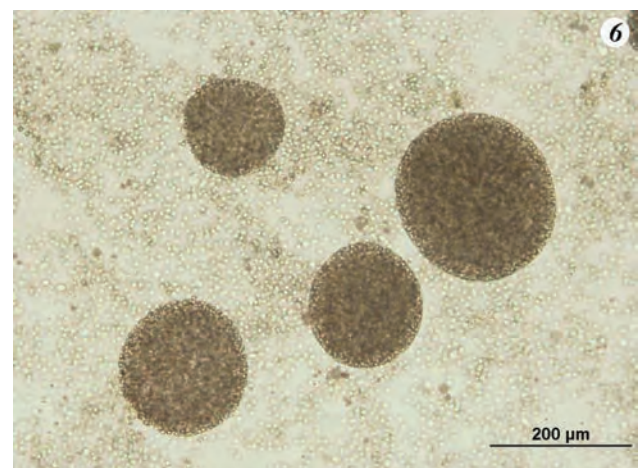


**Figura 5** CDP. *Ept*: epitelí, *Mus*: musculatura H-E. MO.

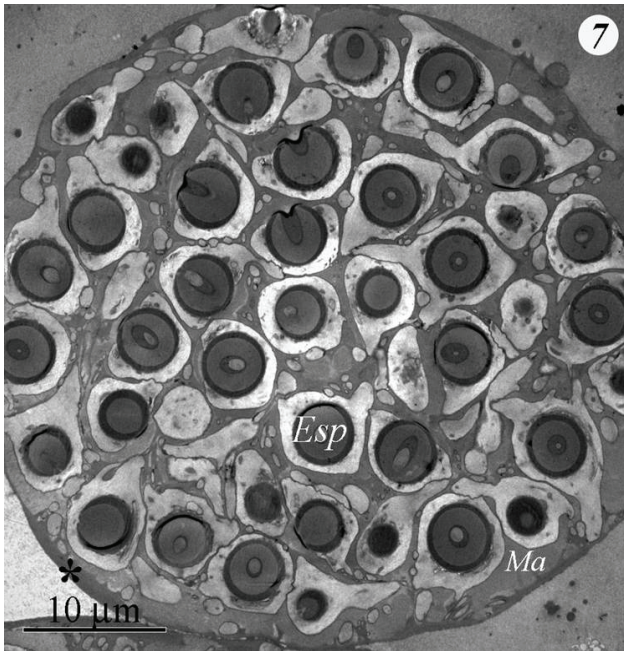
nyeix de vermell i es produeix a la zona més pròxima al testicle (figura 1). Aquesta secreció s'intercala entre la massa d'espermatozoides separant-los en grups de formes diverses, que esdevindran els espermatòfors. A mesura que augmenta la secreció, les diferents agregacions s'aïllen i es compacten. La segona secreció de la part anterior del CDA es tenyeix de color blau (figura 2). Aquesta substància envolta els espermatòfors desplaçant la secreció vermella, que s'intercala entre els espermatozoides i forma una capa que envolta tot el grup. La compactació dels espermatòfors va augmentant al llarg del conducte. La zona posterior conté espermatòfors envoltats de la secreció blava. Els espermatòfors entren en el CDM, on són emmagatzemats en els diverticles (figura 3). La zona anterior del CDM presenta unes petites gotes transparents que s'allotgen a la matriu en la qual es troben els espermatòfors. Al llarg del CDM, les gotes s'agrupen i formen vesícules de mida i forma variable embegudes en la secreció blava d'aspecte reticulat o fibrós (figura 4).

### Estructura de l'espermatòfor

L'espermatòfor de *M. brachydactyla* és el·lipsoïdal i està format per una massa d'espermatozoides embeguts en una matriu i una paret acel·lular, amb una mida d'eix major de 130 µm i 105 µm d'eix menor (figures 6 i 7). Els espermatozoides es troben embeguts en una matriu formada per dues substàncies. La primera substància envolta els espermatozoides, de forma que cada espermatozoide es troba envoltat per la seva pròpia substància, separada de la resta per una pel·lícula. La segona substància, més densa electrònicament que la primera, ocupa els espais entre els espermatozoides i forma la paret de l'espermatòfor. Una tercera substància, menys densa electròni-

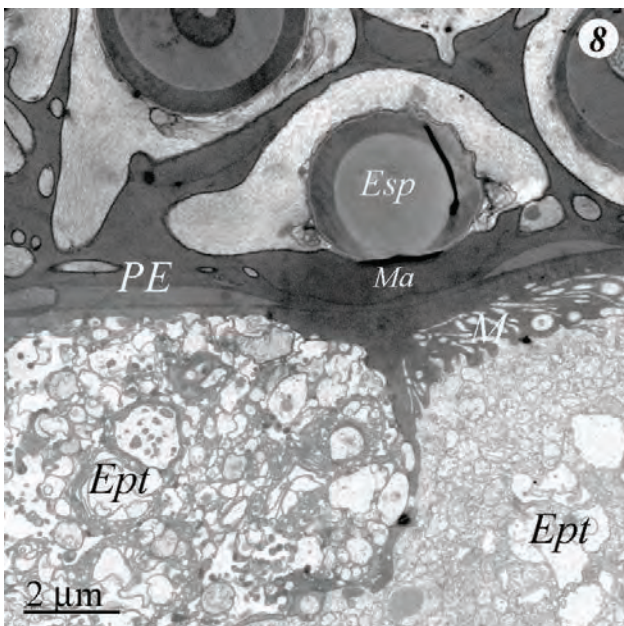


**Figura 6** Preparació en fresc d'espermatòfors del CDA. Els espermatòfors presenten certa variabilitat tant en forma, entre esfèrica i el·lipsoïdal, com en mida, amb un eix major que varia entre els 50 i 200 µm. MO.



**Figura 7** Espermatòfor. *Esp*: espermatozoide, *Ma*: matriu, \*: paret de l'espermatòfor. MET (microscopi electrònic de transmissió).

cament, s'intercala de forma discontinua entre la paret de l'espermatòfor (figura 8). La paret és fina, amb un gruix variable. La superfície és llisa, sense cap ornamentació, encara que els espermatozoides s'intueixen a l'interior de l'espermatòfor (figura 9).

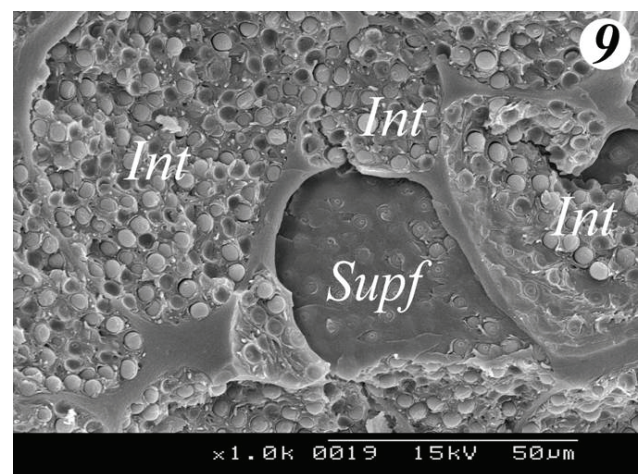


**Figura 8** Ultraestructura de l'espermatòfor. Els espermatozoides es troben embeguts per una matriu i envoltats per una fina paret acel·lular. *Ept*: cèl·lula epitelial del CDA, *Esp*: espermatozoide envoltat per una matriu (*Ma*), *M*: microvilli, *PE*: paret de l'espermatòfor. MET.

## DISCUSSIÓ

El CDA de *Maja brachydactyla* és el responsable de la formació dels espermatòfors. Una primera secreció divideix la massa espermàtica en petites unitats que esdevindran els espermatòfors, mentre que la segona secreció separa cada grup d'espermatozoides per formar l'espermatòfor. El CDM emmagatzema els espermatòfors formats fins el moment de la còpula. El CDP és l'encarregat de la producció i emmagatzematge del fluid seminal. La formació de l'espermatòfor en altres espècies, com *Carcinus maenas* (Spalding, 1942), *Callinectes sapidus* (Cronin, 1947), *Portunus sanguinolentus* (Ryan, 1967), *Libinia emarginata* i *Libinia dubia* (Hinsch *et al.*, 1974) es produeix en el CDA. El CDM presenta més diversitat de funcions, com magatzem d'espermatòfors, absorció, producció i magatzem de fluid seminal.

L'estructura de l'espermatòfor de *M. brachydactyla* es correspon a la d'un braquiür (Dudenhaußen *et al.*, 1983). Es tracta d'un espermatòfor el·lipsoidal de petita mida, amb els espermatozoides embeguts en una matriu i una fina paret acel·lular. La substància que forma la matriu, es troba tant entre els espermatozoides com entre aquests i la paret. Aquesta disposició es dona també en *L. emarginata* i *L. dubia* (Hinsch, 1986) i *Chionoecetes opilio* (Chiba, 1992), contràriament a *Portunus pelagicus* (El-Sherief, 1991) i *Ovalipes ocellatus* (Hinsch, 1986), en què la matriu es troba només entre la paret i els espermatozoides. La paret de *M. brachydactyla* sembla estar formada per una sola capa. La paret de l'espermatòfor presenta gran variabilitat. En *O. ocellatus*, *L. emarginata* i *L. dubia* (Hinsch, 1986), la paret



**Figura 9** Espermatòfors al CDA. A l'interior dels espermatòfors es poden trobar els espermatozoides amb forma globular envoltats d'una matriu. Els espermatòfors presenten una fina paret acel·lular i la superfície llisa que permet reconèixer els espermatozoides des de l'exterior. *Int*: interior dels espermatòfors, *Supf*: superfície exterior dels espermatòfors. MER (microscopi electrònic de rastreig).



està formada per una sola capa. Per contra, els espermatòfors de *C. maenas* (Spalding, 1942), *C. sapidus* (Cronin, 1947), *Scylla serrata* (Uma et al., 1979), *Chaceon fenneri* (Hinsch, 1988), *Ranina ranina* (Minagawa et al., 1994), *P. pelagicus* (El-Sherief, 1991) o *C. opilio* (Chiba, 1992) presenten diverses capes de diferent naturalesa química. La superfície de la paret de *M. brachydactyla* és llisa, com en *C. maenas* (Spalding, 1942), *O. ocellatus* (Hinsch, 1986), *L. emarginata* i *L. dubia* (Hinsch et al., 1974), *C. fenneri* (Hinsch, 1988) i *Goniopsis cruentata* (Martins Garcia et al., 2006). La paret de *P. pelagicus* (El-Sherief, 1991) és arrugada, amb convolucions en la superfície. *C. opilio* (Moriyasu et al., 1998) presenta els dos tipus d'espermatòfor en funció de la maduresa sexual del mascle.

Els espermatòfors, juntament amb les secrecions seminals, són transferits als receptacles seminals de la femella de *M. brachydactyla*, on s'emmagatzemen (González-Gurriarán et al., 1998). Tanmateix l'estudi del contingut de l'espermateca, revela que conté tant espermatòfors com espermatozoides lliures (Rotllant et al., en premsa). Aquest fet suggereix que la funció de l'espermatòfor és l'empaquetament dels espermatozoides per a la transferència de la femella, la qual cosa està d'acord amb la seva estructura.

## AGRAÏMENTS

Al projecte «Cria de *Maja* sp.», de JACUMAR, a la Xarxa de Referència de R+D+I en Aqüicultura i al Departament d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya pel finançament.

A Almudena Garcia i Núria Cortadellas, dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona. Al Personal de Suport de l'IRTA-Sant Carles de la Ràpita.

## BIBLIOGRAFIA

- ADIYODI, K. G.; ANILKUMAR, G. (1988). «Crustacea: Decapoda». A: Adiyodi, K. G.; Adiyodi, R. G. [ed.] *Reproductive biology of invertebrates*. Kerala: John Wiley and Sons, Volume III: Accesory sex glands: 261-318.
- CHIBA, A.; KON, T.; HONMA, Y. (1992). «Ultrastructure of the spermatozoa and spermatophores of the zuwai crab, *Chionoecetes opilio* (Majidae, Brachyura)». *Acta Zool.*, 73(2): 103-108.
- CRONIN, L. E. (1947). «Anatomy and histology of the male reproductive system of *Callinectes sapidus*». *J. Morph.*, 81: 209-240.
- DUDENHAUSEN, E. E.; TALBOT, P. (1983). «An ultrastructural comparison of soft and hardened spermatophores from the crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana». *Can. J. Zool.*, 61: 182-194.
- EL-SHERIEF, S. S. (1991). «Fine structure of the sperm and spermatophores of *Portunus pelagicus* (L.) (Decapoda, Brachyura)». *Crustaceana*, 61: 271-279.
- GONZÁLEZ-GURRIARÁN, E.; FERNÁNDEZ L.; FREIRE, J.; MUIÑO, R. (1998). «Mating and role of seminal receptacles in the reproductive biology of the spider crab *Maja squinado* (Decapoda: Majidae)». *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 220: 269-285.
- HINSCH, G. W. (1986). «A comparison of sperm morphologies, transfer and sperm mass storage between two species of crab, *Ovalipes ocellatus* and *Libinia emarginata*». *Int. J. Invertebr. Repr. Dev.*, 10: 79-87.
- HINSCH, G. W. (1988). «Ultrastructure of the sperm and spermatophores of the golden crab *Geryon fenneri* and a closely related species, the red crab *G. quinque-dens*, from the eastern gulf of Mexico». *J. Crust. Biol.*, 8(3): 340-345.
- HINSCH, G. W.; WALKER, M. H. (1974). «The vas deferens of the spider crabs, *Libinia emarginata*». *J. Morph.*, 143: 1-20.
- KROL, R. M.; HAWKINS, W. E.; OVERSTREET, R. M. (1992). «Reproductive components». A: Wiley-Liss, I. [ed.] *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, 10: Decapod Crustacea: 295-343.
- MARTINS GARCIA, T.; FEITOSA, J. R. (2006). «Testis and vas deferens morphology of the red-clawed mangrove tree crab (*Goniopsis cruentata*) (Latreille, 1803)». *Braz. arch. biol. technol.*, 49(2): 339-345.
- MINAGAWA, M.; CHIU, J.-R.; KUDO, M.; TAKASHIMA, F. (1994). «Male reproductive biology of the red frog crab, *Ranina ranina*, off Hachijojima, Izu Islands, Japan». *Mar. Biol.*, 118: 393-401.
- MORIYASU, M.; BENHALIMA, K. (1998). «Snow crabs, *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius, 1788) (Crustacea: Majidae) have two types of spermatophore: hypotheses on the mechanism of fertilization and population reproductive dynamics in the southern Gulf of St. Lawrence, Canada». *Journal of Natural History*, 32: 1651-1665.
- MORIYASU, M.; BENHALIMA, K.; DUGGAN, D.; LAWTON, P.; ROBICHAUD, D. (2002). «Reproductive biology of the male Jonah crab, *Cancer borealis* Stimpson, 1859 (Decapoda, Cancridae) on the Scotian shelf, Northwestern Atlantic». *Crustaceana*, 75(7): 891-913.
- ROTLLANT, G.; GONZÁLEZ-GURRIARÁN, E.; FERNÁNDEZ, L.; BENHALIMA, K.; RIBES, E. «Ovarian maturation of the multi-spawning spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae) with special reference to yolk formation». *Mar. Biol.* [en premsa]
- RYAN, E. P. (1967). Structure and function of the reproductive system of the crab *Portunus sanguinolentus* (Hersbt) (Brachyura: Portunidae) I. The male system. *Proc. Symp. Crust., Mar. Biol. Assoc. India, Ernakulam*.
- SPALDING, J. F. (1942). «The nature and formation of the spermatophore and sperm plug in *Carcinus maenas*». *Quart. Journ. Micr. Sci.*, 83: 399-423.

SUBRAMONIAM, T. (1995). «Light and electron microscopic studies on the seminal secretions and the vas deferens of the penaeoidean shrimp, *Syciona ingentis*». *J. Biosci.*, 20(5): 691-706.

UMA, K.; SUBRAMONIAM, T. (1979). «Histochemical characteristics of spermatophore layers of *Scylla serrata* (Forsk.) (Decapoda: Portunidae)». *Int. J. Invertebr. Repr. Dev.*, 1: 31-40.



## EXPRESSIÓ GÈNICA ALS DIFERENTS TIPUS CELLULARS DE LA LÍNIA GERMINAL DURANT L'ESPERMATOGÈNESI DEL LLOBARRO (*Dicentrarchus labrax*)

Jordi Viñas, Francesc Piferrer

Institut de Ciències del mar, CSIC, Barcelona

Passeig Marítim de la Barceloneta, 37-49. 08003 Barcelona. [jvinas@icm.csic.es](mailto:jvinas@icm.csic.es).

### Resum

L'espermatogènesi és el procés de desenvolupament d'una gònada masculina immadura a una totalment madura. En el llobarro (*Dicentrarchus labrax*), una espècie de gran importància comercial, la maduració precoç d'una fracció de mascles comporta un dels grans problemes en el cultiu d'aquesta espècie. Així, un dels punts més importants per a establir la precocitat en els mascles és l'estudi dels patrons d'expressió gènica en les diferents poblacions cellulars que apareixen durant l'espermatogènesi del llobarro. En aquest estudi s'ha optimitzat una nova tècnica, la microdissecció làser (*laser capture microdissection*, LCM) que, juntament amb una PCR semiquantitativa, permet determinar l'expressió gènica en poblacions cellulars específiques. Concretament, s'ha determinat l'expressió de fins a set gens diferents, prèviament clonats en llobarro, durant la progressió espermàtica de les cèl·lules germinals, que va des de l'espermatogònia fins a l'espermatozoide. El coneixement dels patrons d'expressió d'aquests gens permet determinar quin és el seu paper en l'espermatogènesi i establir les seves possibles implicacions en la presència de mascles precoços.

**Paraules clau** Espermatogènesi, expressió gènica, Laser Capture Microdissection, llobarro.

### Abstract

Spermatogenesis is developmental sequence of an immature testis into fully mature testis. The European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), is one the key species of the marine aquaculture in south Europe. A major disadvantage of sea bass culture is the presence of precocious males that mature at the first year of life. One of the key points for understanding the molecular basis of male precocity is the quantification of gene expression in specific cell populations. We optimized a newly developed technique, *Laser Capture Microdissection* (LCM), coupled with semiquantitative PCR that allows determining the precise expression pattern of genes in specific cell populations throughout testis development. We quantified the expression pattern of seven genes during the germ cell line progression from spermatogonia to spermatozoa that were already cloned in the sea bass. Knowledge of the specific expression levels of these genes will be useful to investigate their role in male spermatogenesis and their possible implications in the phenomenon of male precocity in sea bass aquaculture.

**Key words** Spermatogenesis, genic expression, Laser Capture Microdissection, sea bass.

## INTRODUCCIÓ

L'espermatogènesi és un procés molt complex que involucra tota una sèrie d'interaccions cellulars perfectament ordenades en el temps i l'espai, i comporta la transformació d'una gònada masculina immadura a un testicle totalment madur i ple d'espermatozoides. Tot i aquesta complexitat, els aspectes essencials d'aquest procés són molt similars en totes les espècies de vertebrats (Callard *et al.*, 1989). El procés de l'espermatogènesi s'inicia mitjançant mitosi de les cèl·lules germinals inicials o es-

permatogònies, que dona lloc als espermatòcits primaris. Seguidament, una primera divisió meiòtica transforma els espermatòcits primaris en espermatòcits secundaris. La segona divisió meiòtica produeix les espermàtides, que finalment es transformen en espermatozoides. Tot aquest procés té un control genètic i endocrí molt complex que, malgrat els avenços realitzats en els darrers anys, dista molt de ser ben comprès.

El coneixement de la reproducció i la seva regulació és fonamental en espècies de gran importància comercial com, per exemple, el llobarro (*Dicen-*

**Taula 1** Condicions de PCR per a cadascun dels gens.

gen	Nr. cicles	Vf PCR ( $\mu$ l)	cDNA ( $\mu$ l)	Quantitat de teixit ( $\mu$ m <sup>3</sup> )	Nr. cel.	Ref.
18s	25	25	1	10.000	230	1
<i>vasa</i>	30	12,5	0,5	500.000	11.500	<i>Unpl.</i>
AR	35	12,5	1	800.000	18.000	1
ER $\alpha$	40	12,5	2	800.000	18.000	2
ER $\beta$ 1	40	12,5	2	800.000	18.000	2
ER $\beta$ 2	40	12,5	2	800.000	18.000	2
Arom	35	12,5	1	800.000	18.000	3

Referències 1: Blázquez i Piferrer (2005); 2: Halm *et al.* (2004); 3: Dalla Valle *et al.* (2002).

*trarchus labrax*). Aquest peix teleosti no solament constitueix una de les espècies més importants de l'aqüicultura del sud d'Europa, sinó que, a més, darrerament s'ha consolidat com un model en estudis de reproducció. Tot i així, existeixen aspectes relacionats amb la seva reproducció que necessiten ser estudiats més profundament. Per exemple, la maduració precoç, un any abans del que seria esperable, d'aproximadament un 30 % del mascles (Zanuy *et al.*, 2001), provoca pèrdues molt considerables en els cultius, ja que, en madurar, aquests animals aturen el seu creixement. Així doncs, és necessari estudiar en profunditat el control de l'espermatogènesi per a entendre les claus de la maduració normal i precoç.

La implementació a partir de finals dels anys noranta de la tècnica de microdissecció de teixits assistida per làser (*laser capture microdissection*, LCM) ha representat un avanç important en els mètodes de separació cel·lular (Emmert-Buck *et al.*, 1996). La LCM permet, de forma fiable i ràpida, l'extracció i

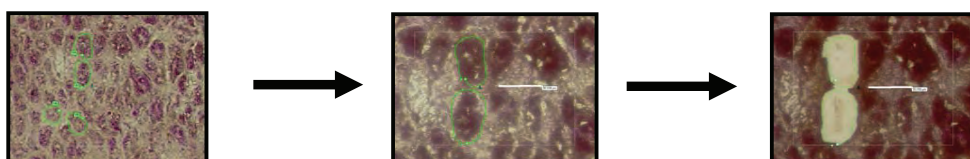
aïllament de poblacions cel·lulars pures, o fins i tot de cèl·lules individuals. Existeixen diferents variants de la LCM. En el cas de la LMPC (*laser microdissection pressure catapulting*), la metodologia es basa en un microscopi invertit al qual s'ha acoblat un làser d'infraroigs (IR). La secció de teixit, normalment conservada en congelació, es diposita sobre un portaobjectes recobert amb una membrana d'acetat vinil etilè (EVA). Un cop tenyida, la secció de teixit es visualitza en el microscopi i les cèl·lules a capturar són seleccionades, retallades amb el làser i catapultades en un tub de microcentrifuga mitjançant un pols de làser. A més, amb una manipulació curosa, el procediment permet extreure RNA amb una qualitat suficient per a estudis d'expressió de gens concrets o fins i tot de patrons globals d'expressió mitjançant la hibridació de l'RNA obtingut en un microxip.

L'objectiu d'aquest estudi fou determinar el patró d'expressió de diversos gens relacionat amb la reproducció del llobarro i esbrinar el seu possible paper en la regulació de l'espermatogènesi. Mitjançant

#### A. Identificació cel·lular



#### B. Microdissecció i catapultació



**Figura 1** Procés de microdissecció d'un testicle de llobarro. A) Identificació dels tipus cel·lulars. B) Procés de catapultació.

l'ús de la LMPC es poden seleccionar específicament els quatre tipus principals de cèl·lules germinals presents en l'espermatogènesi: espermatogònies, espermatòcits, espermatides i espermatozoides. A partir de l'RNA total extret en cadascuna de les poblacions cel·lulars es van avaluar els patrons d'expressió de fins a set gens presumiblement involucrats en la regulació de l'espermatogènesi.

## MATERIAL I MÈTODES

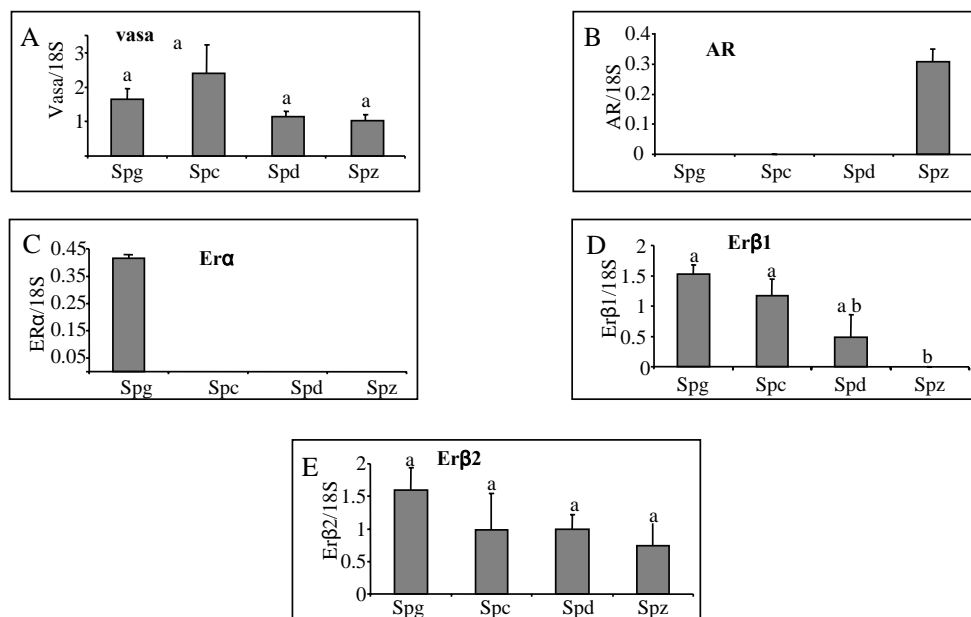
### Identificació i obtenció de cèl·lules

Els testicles s'obtingueren de llobarros mascles mantinguts a la Zona d'Aquaris Experimentals de l'Institut de Ciències del Mar de Barcelona (CSIC). Els mascles foren escollits segons el seu estadi de maduració, per a obtenir tots els estadis cel·lulars necessaris. El teixit va ser hemiseccionat i una part va ser immediatament congelada en nitrogen líquid per a una anàlisi posterior per LMPC, mentre que l'altra va ser processada per histologia convencional a fi de determinar amb precisió l'estadi de desenvolupament i els diferents tipus cel·lulars presents. La preparació de les mostres per a una correcta microdissecció requereix molta cura i l'ús de material lliure de RNAses. A grans trets, les fraccions de teixit congelades a  $-80^{\circ}\text{C}$  s'inclogueren en un medi apropiat (*optimal cutting compound*, OCT), i posteriorment se seccionaren a un gruix de  $10\ \mu\text{m}$  en un criostat i es dipositaren en un portaobjectes amb una membra-

na d'EVA (*PALM slide membrane*). Just abans de la microdissecció les mostres es van tenyir 30 s amb hematoxilina. El procés de microdissecció es realitzà amb l'ajuda d'un robot microBeam (PALM Microlaser Technologies, Alemanya) durant uns 30 min fins a obtenir aproximadament  $1 \times 10^6\ \mu\text{m}^3$  de cèl·lules (figura 1). Per a l'extracció de l'RNA total es va utilitzar el *kit* RNAeasy Microkit (QIAGEN) amb petites modificacions del protocol descrit. La quantitat i qualitat de l'RNA es va determinar amb un *bionalyzer* (Agilent) i *nanodrop* (NanoDrop Technologies), respectivament.

### Amplificació dels gens i PCR semiquantitativa

Els gens escollits per a observar-ne el patró d'expressió, per als quals ja es disposava de les seqüències, estan tots relacionats en un possible control de l'espermatogènesi. Aquests gens foren: *vasa*, un marcador específic de les cèl·lules germinals (seqüència per publicar); les tres isoformes del receptor d'estrogen (Halm *et al.*, 2004); el receptor d'androgen (Blázquez i Piferrer, 2005) i el citocrom P450-aromatasa (Dalla Valle *et al.*, 2002). En tots els casos l'expressió relativa es va mesurar utilitzant el 18S com a gen de referència. Per a cadascun dels gens es va comprovar tant la cinètica de la reacció com les condicions òptimes de PCR. La comprovació dels productes es va realitzar en gels d'agarosa a l'1,5 %. A la taula 1 s'indiquen les condicions de PCR per a cadascun dels gens estudiats.



**Figura 2** Patrons d'expressió dels gens analitzats. A: *vasa*; B: Receptor d'androgen (AR); C: Receptor d'estrogen  $\alpha$  (ER $\alpha$ ); D: Receptor d'estrogen  $\beta$ 1 (ER $\beta$ 1); E: Receptor d'estrogen (ER $\beta$ 1). Spg: espermatogònies; Spc: espermatòcits; Spd: espermatides; Spz: espermatozoides.

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

La LMPC, justament un mètode molt eficient d'extracció de RNA de quantitats extremadament petites de teixit, ha premès estudiar el patró d'expressió de gens rellevants durant la progressió espermatogènica del llobarro.

En primer lloc, cal destacar que s'observà una expressió uniforme del gen 18S al llarg de tota l'espermatogènesi. Aquest fet és molt important, ja que aquest gen es va utilitzar com a referència per a estimar l'expressió de tots els altres gens. Per la seva part, *vasa*, un marcador específic de cèl·lules germinals en animals (Olsen *et al.*, 1997) fou detectat en totes les poblacions de cèl·lules catapultades, fet que indicava la presència de cèl·lules germinals en tots els casos (figura 2A). Tot i així, la seva expressió no fou contínua al llarg de la progressió espermatogènica, amb un màxim als espermatòcits. Aquest resultat és similar al de la carpa Gibel (*Carassius auratus gibelio*), en la qual també s'observà, mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ*, un màxim d'expressió en els espermatòcits, encara que la seva expressió desaparegué totalment en les espermatòides i espermatozoides (Xu *et al.*, 2005).

Un altre gen estudiat fou el receptor d'androgen (AR), clonat en el llobarro per Blázquez i Piferrer (2005). Els andrògens són els esteroides sexuals amb l'efecte regulador més important sobre l'espermatogènesi (Schulz i Miura, 2002). En estudis anteriors realitzat en peixos i mamífers, l'AR només fou detectat en les cèl·lules de Sertoli i al principi de l'espermatogènesi (Callard *et al.*, 1989; Ikeuchi *et al.*, 2001). En el present estudi, però, fou possible detectar expressió, encara que a un nivell molt baix, en els espermatozoides (figura 2B). Els espermatozoides, per la seva abundància i posició dintre del lòbul testicular, són relativament fàcils d'aïllar per LCM. Això suggereix que la seva detecció no és deguda a contaminació d'aquest tipus cel·lulars amb cèl·lules de Sertoli, per la qual cosa cal determinar amb més precisió el significat o funció d'AR en aquest tipus cel·lular.

També es van avaluar canvis en l'expressió de les tres isoformes del receptor d'estrogen com a veritables efectors de l'estrogen al testicle mitjançant l'anàlisi de l'expressió dels tres receptors d'estrogen (E $\alpha$ , Er $\beta$ 1 i Er $\beta$ 2) (Halm *et al.*, 2004), i de l'enzim que el produeix analitzant l'expressió del gen de l'aromatasa (*cyt P450arom*) (Dalla Valle *et al.*, 2002) L'aromatasa és l'enzim responsable de la transformació d'andrògens a estrògens. Malgrat que la funció de l'estrogen en l'espermatogènesi no sigui tan important com la dels andrògens, s'ha demostrat que aquest esteroide sexual hi té també una implicació

(O'Donnell *et al.*, 2001). Curiosament, però, no es va detectar l'expressió del *cyt P450arom* en cap estadi cel·lular de l'espermatogènesi, tot i que en estudis anteriors realitzats en mamífers sí que s'observava expressió d'aquest gen en les espermatòides (O'Donnell *et al.*, 2001). Cal dir que en una anàlisi de LMPC en ovaris de llobarro si que es va detectar expressió del *cyt P450arom*. Malgrat aquest resultat negatiu, aquest fet confirmaria l'expressió molt més elevada del gen de l'aromatasa en ovaris que en testicles en llobarro (M. Blázquez, comunicació personal). Pel que fa als tres receptors d'estrogen, s'observà un alt nivell d'expressió molt elevat (figura 2C, 2D i 2E). Tot i així, l'expressió de l'E $\alpha$  està restringida al principi de l'espermatogènesi, en les espermatogònies, amb una manca d'expressió en els següents estadis. Per altra banda, els receptors Er $\beta$ 1 i Er $\beta$ 2 presentaren un patró d'expressió similar amb una reducció de la seva expressió a mesura que l'espermatogènesi avança. El patró similar d'expressió dels tres receptors d'estrogen, amb una disminució de l'expressió al llarg de la progressió espermatogènica, suposa un major efecte d'aquest esteroide sexual al principi de l'espermatogènesi. En canvi, la falta d'expressió del gen de l'aromatasa durant l'espermatogènesi estaria d'acord amb la seva síntesi a les cèl·lules somàtiques. Tot i així, la implicació de l'estrogen al llarg de l'espermatogènesi necessitaria ser investigada més profundament.

En conclusió, aquesta metodologia permet estudiar l'expressió gènica durant l'espermatogènesi. De fet, la tècnica de la LCM permet investigar els patrons d'expressió a qualsevol teixit que tingui diferents estadis cel·lulars. En el nostre cas l'ús d'aquesta metodologia ha permès estudiar una bateria de fins a set gens diferents relacionats amb l'espermatogènesi. Actualment s'està augmentant el nombre de gens a estudiar, i també s'estan aplicant metodologies més sensibles, tals com la PCR a temps real, per a aprofundir millor en l'estudi de l'espermatogènesi.

## BIBLIOGRAFIA

- BLÁZQUEZ, M.; PIFERRER, F. (2005). «Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) androgen receptor: cDNA cloning, tissue-specific expression, and mRNA levels during early development and sex differentiation». *Mol. Cel. Endocrinol.*, 237: 37-48.
- CALLARD, G.; MAK, P.; DUBOIS, W.; CUEVAS, M. E. (1989). «Regulation of Spermatogenesis - the Shark Testis Model». *J. Exp. Zool.*, 2: 23-34.
- 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.*, 80: 25-34.
- EMMERT-BUCK, M. R.; BONNER, R. F.; SMITH, P. D.; CHUAQUI, R. F.; ZHUANG, Z.; GOLDSTEIN, S. R.; WEISS, R. A.; LIOTTA, L. A. (1996). «Laser capture microdissection». *Science*, 274: 998-1001.
- HALM, S.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, G.; RODRIGUEZ, L.; PRAT, F.; MYLONAS, C. C.; CARRILLO, M.; ZANUY, S. (2004). «Cloning, characterisation, and expression of three oestrogen receptors (ER $\alpha$ , ER $\beta$ 1 and ER $\beta$ 2) in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*». *Mol. Cel. Endocrinol.*, 63-75.
- IKEUCHI, T.; TODO, T.; KOBAYASHI, T.; NAGAHAMA, Y. (2001). «Two subtypes of androgen and progestogen receptors in fish testes». *Comp. Biochem. Phys.*, 129: 449-455.
- O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. (2001). «Estrogen and spermatogenesis». *Endocr. Rev.*, 22: 289-318.
- OLSEN, L. C.; AASLAND, R.; FJOSE, A. (1997). «A vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells». *Mech. Dev.*, 66: 95-105.
- SCHULZ, R. W.; MIURA, T. (2002). «Spermatogenesis and its endocrine regulation». *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 43-56.
- XU, H. Y.; GUI, J. F.; HONG, Y. H. (2005). «Differential expression of vasa RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate». *Dev. Dynam.*, 233: 872-882.
- ZANUY, S.; CARRILLO, M.; FELIP, A.; RODRIGUEZ, L.; BLAZQUEZ, M.; RAMOS, J.; PIFERRER, F. (2001). «Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)». *Aquaculture*, 202: 187-203.



## ASPECTES ULTRAESTRUCTURALS DE L'ESPERMIOGÈNESI DE *Chaetopleura fulva*, (MOLLUSCA, POLYPLACOPHORA): ESTUDI PRELIMINAR

M. Gràcia Bozzo, Montserrat Poquet, Elena Sagristà, Mercè Durfort

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

Av. Diagonal, 465. 08071 Barcelona. *mbozzo@ub.edu*.

*In memoriam* de Josep Egozcue i Cuixart (1940-2006)

«La celada genètica de l'espermatozoide humà s'entesta a mantenir el seu secret. Poc a poc, però, les noves tecnologies i la superior tos-suderia dels investigadors acabaran per torpedinar l'escàpol submari i desvetllar, de forma definitiva, els misteris que, al llarg de tants anys ens han estat amagats, i que tanta resistència han oposat i encara oposen als nostres esforços».

JOSEP EGOZCUE, 1999

---

### Resum

L'estudi de l'espermioogènesi del quitó *Chaetopleura fulva* (mollusc, polioplacòfor) posa de manifest que les espermàtides joves presenten un nucli arrodonit amb la cromatina granular. Les espermàtides mitjanes tenen el nucli amb la cromatina filamentosa i l'embolcall nuclear forma una fosseta d'implantació amb els centríols i material dens. No s'observa una vesícula proacrosòmica ben desenvolupada. El complex de Golgi està situat en la part posterior del nucli. En les espermàtides tardanes el nucli té forma més allargada i la cromatina està en forma de cintes més gruixudes que en l'etapa anterior. En les espermàtides madures el nucli és extraordinàriament dens i s'ha desenvolupat una llarga extensió anterior a l'extrem de la qual es pot intuir també un gra acrosòmic. Tres mitocondris constitueixen una petita i asimètrica peça intermitja d'on arrenca un flagel en posició excèntrica. L'espermatozoide d'aquesta espècie es pot considerar de tipus primitiu però modificat.

### Abstract

The spermiogenesis in the chiton *Chaetopleura fulva* (Mollusca, Polyplacophora) reveals that early spermatids have a round nuclei with granular chromatin. Middle spermatids have nuclei with filamentous chromatin material. The nuclear envelope exhibits a posterior implantation fossa where are the proximal and distal centriole, and the pericentriolar bodies. No developed proacrosomal vesicle is observed. The Golgi complex is always located posterior to the nucleus. In late spermatids, the nucleus is bullet-shaped, and chromatin is sheet-like. In fully developed spermatids, the nucleus is extremely dense, and has an anterior extension. In the tip of the sperm there is the small acrosomic granule. Three mitochondria constitute a very short middle piece, and an eccentric tail is established. The sperm of this species fits into the modified primitive sperm model.

---

## INTRODUCCIÓ

Mentre que l'espermatogènesi i la morfologia dels espermatozoides ha estat estudiada en molts grups de molluscs gasteròpodes, bivalves i cefalòpodes, hi ha relativament pocs estudis de l'espermatogènesi dels polioplacòfors. Entre d'altres destaquem els estudis de Sakers (1984) i Buckalns-Nicks *et al.* (1990)

en diverses espècies de quitònids pertanyents a famílies diferents.

Els quitònids són animals unisexuals que presenten fecundació externa en l'aigua del mar. La gònada masculina està formada en un únic sac amb plects que tenen un epitelí basal sobre del qual reposa l'epitelí germinatiu, en el qual es desenvolupa l'espermatogènesi en sentit centrífug. Els gàmetes madurs



s'agrupen en el cim dels plecs en la llum del testicle i són alliberats pels conductes espermàtics.

L'espermatozoide dels quitònids ha estat descrit com de tipus primitiu, basant-se en les descripcions de morfologia comparada de Franzen (1955, 1956, 1970). Tot i això, en els estudis de diferents espècies s'ha observat una certa modificació respecte del patró de l'autor citat més amunt. Així, Russell-Pinto *et al.* (1984, 1988) descriuen espermatozoides primitius però «modificats» en quatre espècies de poliplacòfors, principalment en *Achantochitona crinita*, espècie molt propera a la que s'ha estudiat en el present treball.

Les modificacions més notables són la projecció del nucli en un llarg i estret filament, la dubtosa presència d'acrosoma com a tal, i la ubicació dels mitocondris (Sakker, 1984). Alguns autors parlen directament de manca d'acrosoma (Sakker, 1984). En canvi, d'altres descriuen un gra preacrosòmic

(Buckalns-Nicks *et al.*, 1988) de dimensions molt reduïdes que no té el procés típic de formació durant l'espermioogènesi, però que es posa de manifest durant la fecundació.

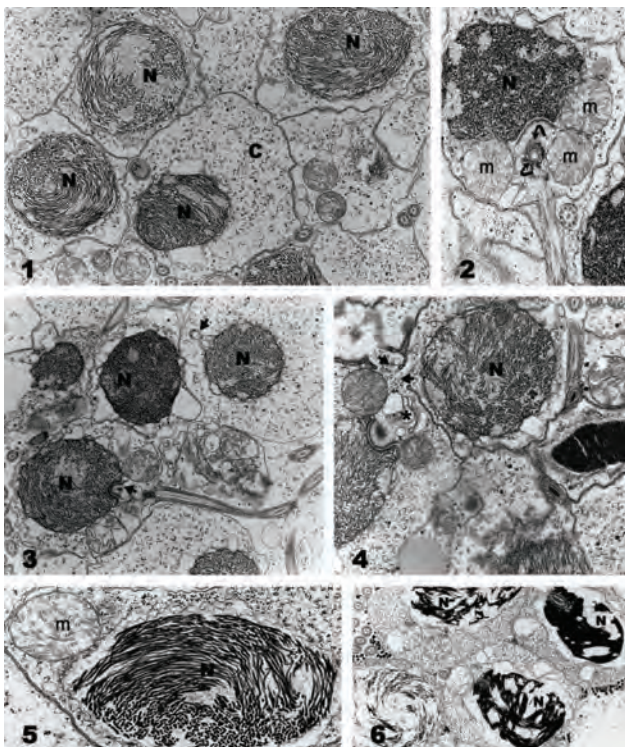
Aquest estudi ha estat precedit de resultats que hem obtingut de l'estudi de la gònada femenina de diverses espècies de quitònids recollits a la costa catalana, principalment de *Trachydermon cinereus* (*Lepidopleurus cinereus*) i d'*Acanthochitona fascicularis* (Durfort *et al.*, 1976 i 1989, entre altres). La presència i disposició de les cèl·lules fol·liculars, que en nombre determinat per a cada espècie embolcal·len la cèl·lula germinal femenina, ha d'influir en el procés de la fecundació.

L'espermatozoide de l'espècie estudiada, *Chaetopleura fulva*, que fins ara no ha estat descrit, presenta cap, peça mitjana i cua, i es pot considerar del tipus primitiu, però modificat per les característiques de l'acrosoma, la situació dels mitocondris i la condensació de la cromatina. És en els canvis que experimenta el nucli en el que ens hem centrat en el present treball.

## MATERIAL I MÈTODES

En l'espècie estudiada les gònades són fàcilment diferenciables. Mentre que les gònades femenines madures de *Chaetopleura fulva* són de color marronós i aspecte granulós pel fet que els oòcits són considerablement grossos (de 250 a 400  $\mu\text{m}$  de diàmetre), la gònada masculina és de color gris verdós, i això fa que es puguin identificar bé els sexes en fer la dissecció dels exemplars. Individus sexualment madurs de *Chaetopleura fulva* procedents de Cubelles i de Vilanova i la Geltrú, recollits els mesos de maig a setembre, varen ser prèviament anestesiats amb  $\text{MgCl}_2$  al 10 % preparat amb aigua de mar, i posteriorment se'n varen aïllar i seccionar les gònades.

Per a l'estudi ultraestructural que presentem es varen sotmetre petits fragments de la gònada masculina a una doble fixació convencional amb glutaraldehyd al 2,5 % tamponat amb PBS 0,1 M, a pH 7,4 a 4° C durant dues hores, i després d'un bon rentat amb la solució tampó es va procedir a una postfixació amb tetraòxid d'osmi al 1 % , igualment preparat amb PBS i al mateix pH durant una hora. Una deshidratació progressiva amb acetona ens permet fer una inclusió amb reïna Spurr (1969). Els talls semifins de control han estat tenyits amb blau de metilè a l'1 % preparat amb bòrax al 10 %. Les seccions ultrafines obtingudes amb un Ultracut (Reichert) han estat contrastades rutinàriament amb acetat d'uranil i posteriorment amb citrat de plom. Les observacions han estat fetes amb microscopis electrònics de transmis-



**Figura 1** Espermàtides amb nucli esfèric (N) i la cromatina poc compacta. Citoplasma (C) ple de glicogen (17500 $\times$ ).

**Figura 2** Espermàtida mitjana. Nucli granulat i fibrillar. El centríol proximal (fletxes) està situat a la fosseta nuclear. Mitocondris (m) en disposició asimètrica (19000 $\times$ ).

**Figura 3** Estadi d'espermàtida mitjana. Inici d'un gra preacrosòmic (fletxa) (17000 $\times$ ).

**Figura 4** Ponts citoplasmàtics entre les cèl·lules (fletxes). Complex de Golgi (\*) junt al material dens de la fosseta i entre els mitocondris (19000 $\times$ ).

**Figures 5 i 6** Transició de la compactació de la cromatina: granular, fibrillar i en cabdell. N: nucli, m: mitocondri (22000 $\times$  i 17000 $\times$ ).



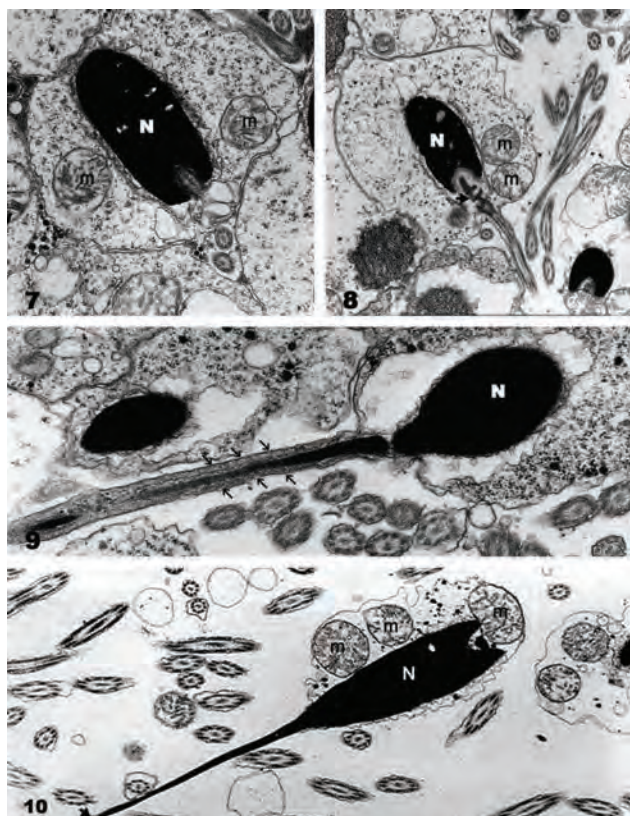
sió Philips 300 i Hitachi H600 AB dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

## RESULTATS

### Morfologia de l'espermatozoide

L'espermatozoide de *Chaetopleura fulva* és una cèl·lula uniflagelada d'uns 60 a 65 µm de longitud. El cap té una forma cònica que es continua amb una estreta extensió filiforme d'uns 3 µm de llargada i 80 nm de diàmetre, cosa que li dona una morfologia peculiar i característica. Està constituït pel material nuclear fortament condensat i una dilatació lateral on se situen els mitocondris (figures 9 i 10)

Els centríols proximal i distal estan envoltats de material electrodens i inclosos en una invaginació posterior del nucli, la fosseta d'implantació (figura 8). El centríol proximal, perpendicular al distal, està connectat a la base del nucli per fibres denses. El centríol distal és paral·lel a l'eix de l'espermatozoide



**Figura 7** Espermàtida tardana. Nucli compacte (N) (18000×).

**Figura 8** Espermàtida amb la peça mitjana formada pels dos centríols (fletxa) i la fosseta nuclear (10000×).

**Figura 9** Projectió anterior del nucli de l'espermatozoide madur (fletxes) (30000×).

**Figura 10** Espermatozoide madur. Mitocondris (m) laterals i basal. A l'extrem del filament nuclear hi ha indicis del gra acrosòmic (fletxa) (22000×).

i donarà lloc a l'axonema del flagel, que es col·loca en posició excèntrica. Des dels doblets perifèrics de microtúbuls s'estenen nou projeccions satèl·lit fins a la membrana plasmàtica. El llarg flagel que surt del centríol distal té la configuració característica de 9+2 microtúbuls.

### Maduració del nucli durant l'espermioquèsi

En acabar l'etapa meiótica, les espermatides es mantenen unides per ponts citoplasmàtics (figura 4). Les espermatides joves tenen el nucli esfèric i la cromatina té un aspecte granulat fi amb algun petit grumoll dens i zones més clares (figures 1 i 2). Es veu també en aquesta etapa el material dens a la base del nucli, formant la fosseta semicircular on es localitzen els centríols proximal i distal, des d'on arrenca el flagel (figura 3). El nucli ocupa bona part del volum cel·lular, només envoltat per una capa de citoplasma, en el qual s'observen moltes acumulacions de glicogen (figura 4).

En l'estadi d'espermàtida mitjana, la cromatina s'organitza en filaments el diàmetre dels quals és de 20-25 nm, com un cabdell en el centre del nucli i enganxats a l'embolcall nuclear en la part basal (figures 4 i 5). En el citoplasma, els tres mitocondris es troben envoltant els centríols.

A partir d'aquest moment comença l'allargament anteroposterior del nucli, i el nucleoplasma mostra una xarxa fibrosa de filaments de cromatina que s'orienten al llarg de l'eix de la cèl·lula (figura 6). Es comença a formar la projecció apical, en l'interior de la qual es veuen filaments de cromatina i no s'observen estructures acrosòmiques ben diferenciades (figura 9). Al final de l'espermioquèsi, la condensació nuclear ha arribat al màxim i pràcticament no hi ha material citoplasmàtic al seu voltant. Aquest procés és molt similar a altres espècies de quitons (Russell-Pinto *et al.*, 1984, 1988; Sakker, 1984). Es dona de manera gradual: granular, fibrillar, en cintes o fibres gruixudes en cabdells i finalment compacte. Una situació semblant, amb algunes diferències notables, s'ha descrit en d'altres molluscs, com ara en els espermatozoides eupirenis de gasteròpodes (Amor *et al.*, 1999), i també en algunes espècies de cefalòpodes (Martínez *et al.*, 2005). En aquest cas els autors ho atribueixen al canvi i la interacció entre les proteïnes i el DNA de la cromatina. En *Chaetopleura fulva* és probable que sigui un procés similar, encara que no ha estat comprovat.

Paral·lelament als canvis en la textura de la cromatina, hi ha un notable canvi de la forma del nucli. En l'estadi més primerenc, com s'ha dit anteriorment, el nucli és esfèric o lleugerament oval, després esdevé en forma de bombeta i finalment té forma cònica

amb l'extensió anterior molt fina a l'extrem de la qual s'intueix un petit gra acrosòmic. La cèl·lula sencera també es modifica, els mitocondris es col·loquen en forma asimètrica, dos en un costat i l'altre a la base del nucli (figura 10).

La manca d'un acrosoma ben desenvolupat, amb un procés de formació típic durant l'espermatogènesi, no descarta la presència d'una estructura anàloga que exerceixi el mateix paper durant la fecundació.

## BIBLIOGRAFIA

- AL-HAJJ, H. A. (1987). «Ultrastructural study of spermiogenesis in the chiton *Acanthopleura haddoni* from the Gulf of Aqaba». *Int. J. Invert. Repr. Development*, 12: 295-308.
- AMOR, M. J.; DURFORT, M. (1990). «Changes in Nuclear Structure During Euphyre Spermatogenesis in *Murex brandaris*». *Molecular Reproduction and Development*, 25: 348-356.
- BUCKLAND-NICKS, J. (1993). «Hull cupules of chiton eggs: Parachute structures and sperm focusing devices?». *Biol. Bull.*, 184: 269-276.
- BUCKLAND-NICKS, J.; KOSS, R.; CHIA, F. S. (1988a). «The Elusive Acrosome of Chiton Sperm». *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 13: 193-198.
- BUCKLAND-NICKS, J.; KOSS, R.; CHIA, F. S. (1988b). «Fertilization in a Chiton: Acrosome-Mediated Sperm-Egg Fusion». *Gamete Research*, 21: 199-212.
- BUCKLAND-NICKS, J.; CHIA, F. S.; KOSS, R. (1990). «Spermiogenesis in Polyplacophora, with special reference to acrosome formation». *Zoomorphology*, 109: 179-188.
- BUCKLAND-NICKS, J.; EERNISSE, D. J. (1993). «Ultrastructure of mature sperm and eggs of the brooding hermaphrodite chiton *Lepidochitona fernaldi* with special reference to mechanism of fertilization». *J. Exp. Zoology*, 265: 567-574.
- BUCKLAND-NICKS, J.; HODGSON, A. N. (2000). «Fertilization in *Callochiton castaneus* (Mollusca)». *Biological Bulletin (Woods Hole)*, 199(1): 59-67.
- DURFORT, M. (1976). «Relation entre les lamelles annelées et le reticululum endoplasmique granulaire dans les oocytes de *Trachydermon cinereus*, Thiele (Mollusque Polyplacophore)». *Annales des Sciences Naturelles-Zoologie et Biologie Animale*, 88(4): 449-457.
- DURFORT, M.; BARGALLÓ, R.; BOZZO, M. G.; LÓPEZ-CAMPS, J.; FONTARNAU, R. (1981). «Forma i ultraestructura dels oòcits de *Trachydermon cinereus*, Thiele (Mollusca, Poliplacophora)». *But. Soc. Cat. Biol.*, 5-6: 229-235.
- DURFORT, M.; GARCIA VALERO, J. (1989). «El complex de Golgi i els grànuls corticals en els oòcits d'*Acanthochitona fascicularis* L. (1767) (Mollusca, Poliplacophora)». *Biologia de la Reproducció*, 1: 131-144.
- EGOZCUE, J. (1999). «La celada genètica de l'espermatozoide humà». *Discurs d'ingrés a la Reial Acad. Ciències i Arts de Barcelona*, 952, Vol. LVII, núm. 7: 273-313.
- HODGSON, A. N.; BAXTER, J. M.; STURROCK, M. G.; BERNARD, R. T. E. (1988). «Comparative spermatology of 11 species of polyplacophora (Mollusca) from the suborders Lepidopleurina, Chitonina and Acanthochitonina». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 235(1279): 161-177.
- MARTÍNEZ, F.; KURTZ, K.; CHIVA, M.; RIBES, E. (2005). «Condensació de la cromatina dins el nucli espermàtic del Cefalòpode *Sepia officinalis*». *Biologia de la Reproducció*, 9. IX Jornades de la Secció de Biologia de la reproducció.
- PEARSE, J. S.; WOOLLACOTT, R. M. (1979). «Chiton sperm: no acrosome?». *American Zoology*, 19: 956.
- RUSSEL-PINTO, F.; AZEVEDO, C.; BARANDELA, T. (1983). «Fine structure of the spermatozoa of *Chiton marginatus* (Mollusca: Amphineura), with special reference to nucleus maturation». *Gamete Research*, 8: 345-355.
- RUSSEL-PINTO, F.; AZEVEDO, C.; OLIVEIRA, E. (1984). «Comparative ultrastructural studies of spermiogenesis and spermatozoa in some species of Polyplacophora (Mollusca)». *Int. J. Invert. Repr. Development*, 7: 267-277.
- SAKKER, E. R. (1984). «Sperm morphology, spermatogenesis and spermiogenesis of three species of chitons (Mollusca, Polyplacophora)». *Zoomorphology*, 104: 111-121.
- SPURR, A. R. (1969). «A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy». *J. Ultrastruct. Res.*, 26: 36-43.

## TRANSICIÓ DE PROTEÏNES, ACETILACIÓ DE LA HISTONA H4 I ESTRUCTURA DE LA CROMATINA EN L'ESPERMIOGÈNESI DE LA SÈPIA (*Sepia officinalis*)

Fina Martínez-Soler, Kathryn Kurtz, Manel Chiva

Dept. de Ciències Fisiològiques II, Facultat de Medicina, Campus de Bellvitge

Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Tel. 934 035 824. [finamartinez@ub.edu](mailto:finamartinez@ub.edu), [lauffykaffyl7@yahoo.com](mailto:lauffykaffyl7@yahoo.com),  
[mchiva@ub.edu](mailto:mchiva@ub.edu).

---

### Resum

En el decurs de l'espermioogènesi del cefalòpode *S. officinalis* les histones són primer desplaçades per una proteïna més bàsica, el precursor de la protamina, que després esdevé la protamina madura mitjançant la deleció dels primers 21 residus N-terminals. Aquesta doble transició proteica provoca una sèrie de remodelacions complexes en l'estructura de la cromatina espermioogènica: la cromatina de tipus somàtic es reorganitza primer en grànuls de 20 nm, posteriorment en fibres de 35 nm i finalment en fibres de 50 nm. En l'última etapa de l'espermioogènesi (fases de condensació) les fibres de 50 nm s'agrupen entre si, es fusionen i donen lloc a la cromatina altament compactada de l'espermatozoide madur. Utilitzant anticossos específics contra la histona H2A, el precursor de la protamina i contra formes hiperacetilades de la histona H4, demostrem que l'organització de la cromatina en grànuls de 20 nm té lloc alhora que la histona H4 es monoacetila (en lys 12), que la transició de grànuls a fibres de 35 nm és deguda a l'entrada del precursor en el nucli, i que la transició de fibres de 35 nm a fibres de 50 nm es produeix alhora que té lloc una hiperacetilació de la histona H4 i la desaparició de les histones romanents en el nucli.

**Paraules clau** Cefalòpode, espermioogènesi, condensació de la cromatina, acetilació.

### Abstract

During the spermiogenesis of the cephalopod *S. officinalis* histones are first replaced by a more basic protein called protamine precursor, which later will become the mature protamine by means of an N-terminal deletion of the first 21 aminoacid residues. This double transition of proteins provokes a complex pattern of chromatin remodeling during spermiogenesis: first the somatic-like chromatin is reorganized into 20 nm granules, later to 35 nm fibres and finally into 50 nm fibers. In the last stages of spermiogenesis (condensation phases) the 50 nm fibers coalesce together to become the highly packed chromatin found in the mature sperm nucleus. Using specific antibodies against histone H2A, protamine precursor molecule and hyperacetylated isoforms of histone H4, we demonstrate that reorganization of somatic-like chromatin into 20 nm granules takes place concomitantly with a monoacetylation of histone H4; that the transition from 20 nm granules to 35 nm fibers are due to the massive entrance of the protamine precursor in the nucleus; and that from 35 nm fibers to 50 nm fibers an hyperacetylation of histone H4 and the removal of the totality of histones occurs.

---

## INTRODUCCIÓ

Durant l'espermioogènesi de la gran majoria d'espècies animals, es donen una sèrie de canvis en les proteïnes que interaccionen amb el DNA i que provoquen remodelacions en la cromatina espermioogènica i un patró determinat de condensació que condueix progressivament a una cromatina molt compactada dins el nucli (reduït en volum) de l'espermatozoide madur.

La variabilitat en els tipus de proteïnes que remo-

delen la cromatina espermioogènica és molt elevada i, per tant, també ho són els patrons en què es condensa la cromatina. Les proteïnes que organitzen la cromatina en l'espermatozoide s'agrupen sota el terme *sperm nuclear basic proteins* (SNBP) i es caracteritzen per ser proteïnes de poc pes molecular i molt bàsiques, fet que els aporta una major afinitat d'interacció pel DNA, cosa que permet una compactació de la cromatina més eficaç. La protamina n'és una d'aquestes.

Antecedents sobre els canvis en la composició

proteica de la cromatina espermiogènica del cefalòpode decàpode *Sepia officinalis* (Rosseau-Prévost *et al.*, 1988; Martin-Ponthieu *et al.*, 1991; Wouters-Tyrou *et al.*, 1991; Martin-Ponthieu *et al.*, 1994) demostren que les histones que organitzen la cromatina en nucleosomes en les espermatides primerenques són primer desplaçades per una molècula precursora de la protamina, que després esdevindrà mitjançant una deleció dels primers 21 residus N-terminal, la protamina madura que hi ha en l'espermatozoide. Tant la forma precursora de la protamina com la protamina madura tenen dues isoformes microheterogènies, T1 i T2, i Sp1 i Sp2, respectivament.

En un altre treball, Couppez *et al.* (1987) demostren que en la gònada de *Sepia officinalis*, la histona H4 presenta diferents isoformes d'acetilació, la no acetilada (41,4 %), mono, di, tri i tetraacetilades (32,3, 18, 6,5 i 2 %, respectivament), i que l'increment del grau d'acetilació té lloc de manera seqüencial en la gònada, on la lisina 12 és el lloc preferencial d'acetilació en la isoforma monoacetilada, les lisines 12 i 5 en la isoforma diacetilada, i les lisines 12, 5 i 16 són les que estan acetilades en la isoforma triacetilada de la histona H4.

Estudis previs des del punt de vista morfològic daten de l'any 1974, en què Maxwell estudia ultraestructuralment les característiques generals de l'espermiogènesi de tres espècies de cefalòpodes decàpodes diferents, entre les quals hi ha *Sepia officinalis* (anomenada en aquest treball *Eusepia officinalis*).

Amb aquests antecedents en ment, el propòsit d'aquest treball és, en primer lloc, fer una reexaminació del procés de condensació de la cromatina espermiogènica de *S. officinalis* i correlacionar cada estructura concreta que adopta la cromatina amb el corresponent canvi en la composició proteica. En segon lloc, per aprofundir més en les causes principals de les transicions estructurals de la cromatina, estudiem també com participa l'acetilació de la histona H4 en aquest procés.

## MATERIAL I MÈTODES

### Gènesi d'antisèrums

**Precursor de la protamina:** La molècula precursora de la protamina de *S. officinalis* (T1 i T2) va ser primer purificada amb HPLC i posteriorment digerida amb quimi tripsina; els pèptids resultants van ser repurificats de nou amb HPLC i el pèptid precursor va ser conjugat amb una proteïna portadora i posteriorment injectat en el conill. L'antisèrum obtingut

va ser testejat amb Western blot (resultats no mostrats aquí), però cal dir que l'anticòs presenta una reacció creuada amb la protamina madura.

**Histona H2A:** La histona H2A va ser primer extreta amb HCl 0,4 N i posteriorment repurificada per cromatografia CM52 (Càceres *et al.*, 1994) utilitzant un gradient de NaCl de 0,2 a 0,8 M i injectada a un conill. L'antisèrum obtingut es va testejar amb Western blot (resultats no mostrats aquí; vegeu Martínez-Soler *et al.*, 2007) i mostren que l'antisèrum és específic per a la histona H2A.

**Anticossos comercials:** Anti H4-ac.K12: Hem utilitzat també l'anticòs comercial contra la histona H4 acetilada específicament en lisina 12 (H4-ac.K12) (*upstate*) que correspon al pèptid N-terminal de la histona H4 acetilada en k12. També l'anticòs contra la histona H4 acetilada específicament en la lisina 16 (H4-ac.K16) (*upstate*), generat a partir del pèptid N-terminal acetilat en K16. En general, en les immunolocalitzacions el marcatge obtingut amb l'anticòs anti H4-ac.K16 ha estat sempre inferior al de l'anti-H4-ac.K12. Una possible explicació a aquest fet podria ser el fet que *in vivo* la lisina 16 ocupa una posició molt propera al cor de la histona H4, fet que podria suposar un epítip força inaccessible per al seu anticòs.

### Microscòpia electrònica

Es varen fixar petites porcions de gònada de *S. officinalis* i es van incloure en Spur per a l'observació d'ultraestructura, i amb Lowicryl per a les immunolocalitzacions.

### Immunolocalitzacions

**H2A i precursor de la protamina:** Vegeu Martínez-Soler *et al.* (2007) per a les condicions experimentals de les immunolocalitzacions d'aquests dos anticossos.

**H4-ac.K12 i H4-ac.K16:** Les reixetes amb els talls ultrafins van ser primer bloquejats amb 0,1 M PBS pH 8,5 / 2 % llet desnatada / 2 % sèrum (*Normal goat serum*) i 20 mM de glicina. Els anticossos van ser incubats durant 2 h a temperatura ambient a una dilució 1:25 i 1:100 per a H4-ac.K12 i 1:100 per a H4-ac.K16 en la solució de bloqueig sense la glicina. L'anticòs secundari utilitzat per a ambdós anticossos ha estat un *goat anti-rabbit* conjugat amb una partícula d'or coloidal de 15 nm de diàmetre, diluït 1:25 en la mateixa solució de dilució que l'anticòs primari; la incubació va ser durant 1 h. Tot el procediment d'incubació va ser realitzat a temperatura ambient.

Amb aquestes condicions de treball els controls negatius (reixetes tractades exclusivament amb l'an-

ticòs secundari) tenien un marcatge nul o gairebé nul.

## RESULTATS

### *Patró de condensació de la cromatina espermiogènica en S. officinalis*

En l'espermioègesi de *S. officinalis*, la cromatina de l'espermàtida inicial experimenta una sèrie de remodelacions que condueixen a la cromatina altament compactada i electrodensa de l'espermatozoide madur. La primera columna de la figura mostra sis imatges que resumeixen el procés de condensació de la cromatina. El nucli de l'espermàtida inicial és rodó (de 4 µm de diàmetre, columna 1, figura A detall) amb una cromatina d'aspecte similar a una cèl·lula somàtica, on es poden apreciar les diferències entre unes zones més electrodenses (heterocromatina) i d'altres més laxes (eucromatina). La primera remodelació que experimenta aquesta cromatina de tipus somàtic consisteix en una homogeneïtzació global (i, per tant, també una homogeneïtzació en la seva composició proteica), en què l'eucromatina i heterocromatina desapareixen i es reorganitzen en grànuls de 20 nm de diàmetre distribuïts uniformement dins el nucli rodó de l'espermàtida, (columna 1, figura B i figura B detall). El següent pas de remodelació, conjuntament amb l'inici d'una lleugera elongació del nucli (columna 1, figura C detall), consisteix en la formació de fibres (columna 1, figura C) que inicialment mesuren 35 nm de diàmetre, i més endavant en l'espermioègesi de 50 nm (columna 1, figura D). Aquesta cromatina fibrillar es troba homogèniament orientada en paral·lel a l'eix d'elongació del nucli.

A partir d'aquest estadi en endavant, les fibres de 50 nm es van fusionant entre si i formen agregats de cromatina condensada cada vegada més grans, que es dipositen en un lateral de la membrana (columna 1, figura E detall) i provoca una compressió lateral del nucli, fins que en l'espermatozoide madur la totalitat de la cromatina es troba altament compactada en un nucli elongat i reduït en volum (columna 1 figura F). Agrupem les fases des de columna 1 figura A-D amb el nom de *fases de remodelació*, perquè en cada pas es dona una remodelació global de la cromatina, i *fases de condensació* en les etapes de la columna 1 figura E i F, ja que més que una remodelació es tracta d'una fusió de les fibres de cromatina preexistents.

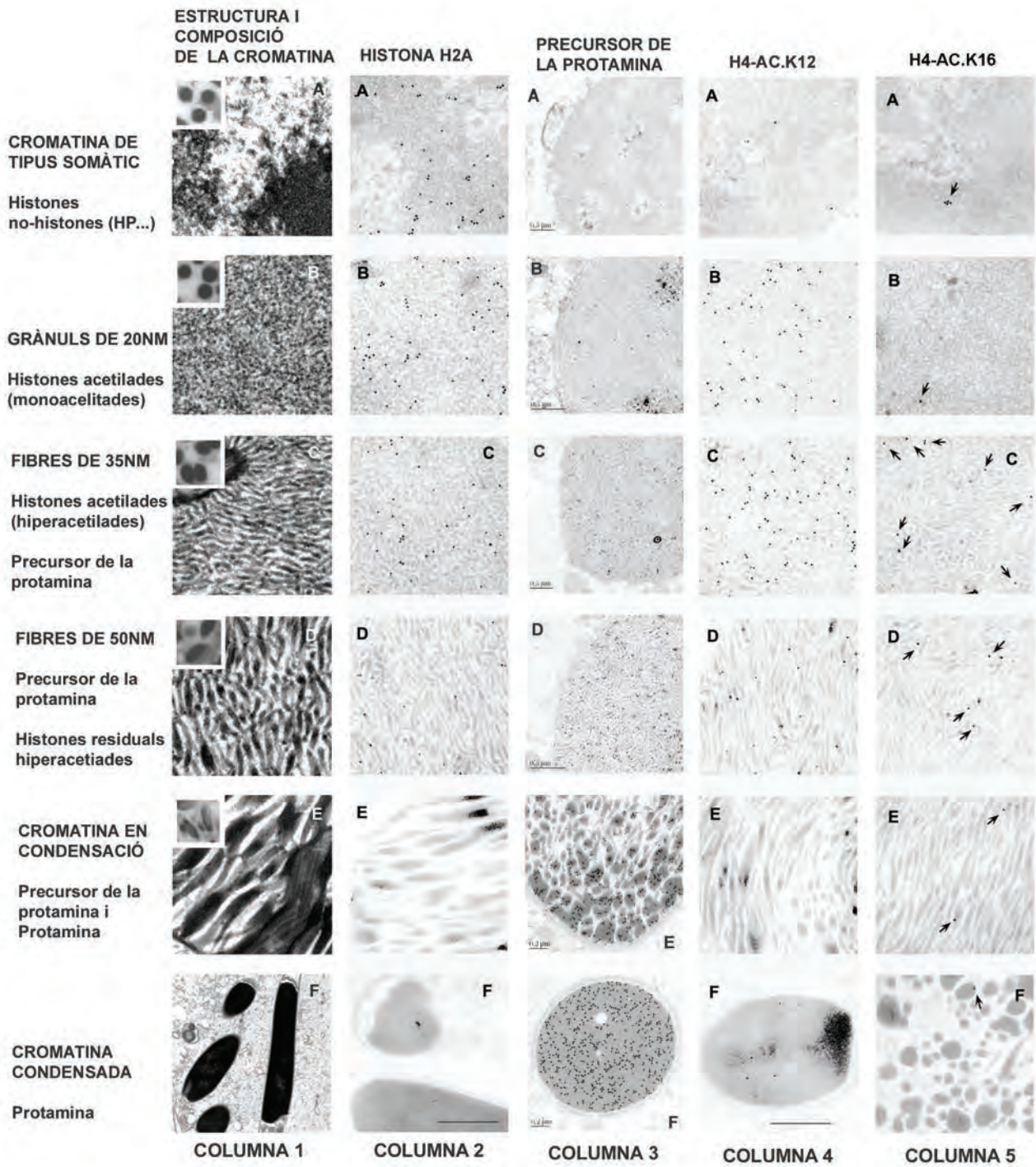
### *Composició proteica de la cromatina espermiogènica de S. officinalis*

**Anti-histona H2A:** Per tal de saber en quin moment de l'espermioègesi comencen a desaparèixer les histones del nucli i són desplaçades pel precursor de la protamina, hem fet immunolocalitzacions amb l'antisèrum de la histona H2A interpretant el marcatge d'aquesta histona com a representatiu de la presència de la resta d'histones en el nucli, i de l'organització de la cromatina en nucleosomes. En la segona columna de la figura es mostren sis imatges en què es resumeixen els resultats obtinguts. En la cromatina de tipus somàtic de l'espermàtida inicial, l'immunomarcatge per a la histona H2A és significatiu i evident, i es localitza preferentment en l'heterocromatina (columna 2, figura A) pel fet que en aquest tipus de cromatina, la concentració de nucleosomes és major (Manochantr *et al.*, 2005; Suphamuntee *et al.*, 2005). La cromatina granular presenta la reacció màxima amb la histona H2A (columna 2, figura B) amb el marcatge homogeni i uniforme, cosa que indica una organització d'aquesta cromatina en nucleosomes, també uniforme. La cromatina fibrillar de 35 nm, (columna 2, figura C) presenta un marcatge lleugerament inferior, més similar a la de tipus somàtic, però continua sent un marcatge significatiu, cosa que indica la presència de la histona H2A (i de la resta d'histones). La figura D de la columna 2 mostra que en les fibres de 50 nm la presència d'histones en el nucli és clarament inferior, però no pas nulla o inexistent (vegeu Martínez-Soler *et al.*, 2006, per als controls de l'anticòs).

A partir de l'entrada a les fases de condensació de la cromatina en endavant, (columna 2, figura E-F), el marcatge per a la histona H2A és inexistent.

**Antiprecursor de la protamina:** La tercera columna resumeix els resultats de la immunolocalització del precursor de la protamina en cada una de les fases de condensació de la cromatina. Les figures A i B de la columna 3 representen la cromatina de tipus somàtic i granular, respectivament; en ambdós estadis el marcatge per al precursor és inexistent, especialment si tenim present que la immunoreactivitat d'aquest anticòs és molt elevada. Per tant, la primera remodelació de la cromatina (cromatina de tipus somàtic a granular) té lloc sense la presència del precursor de la protamina en el nucli. En la següent fase (cromatina fibrillar de 30 nm, columna 3, figura C) el marcatge per a la molècula precursora de la protamina incrementa sobtadament, cosa que indica que la remodelació de grànuls a fibres de cromatina és deguda a la presència massiva del precursor de la protamina dins el nucli.





**Figura Columna 1:** Resum de la condensació de la cromatina i proteïnes que interaccionen amb el DNA durant l'espermioogènesi de *S. officinalis*. En A els nuclis de les espermatides primerenques són cèl·lules rodones (detall) i presenten una cromatina de tipus somàtic (amb eucromatina i heterocromatina). La composició d'aquesta cromatina consisteix en histones (no acetilades) i proteïnes de l'heterocromatina (HP). La primera remodelació de la cromatina consisteix en una reorganització de la cromatina de tipus somàtic a grànuls de 20 nm de diàmetre (B); aquesta cromatina presenta una monoacetilació en la histona H4 i la molècula precursora de la protamina encara no ha entrat en el nucli. En les fibres de 35 nm el nucli ha iniciat l'elongació (C i detall), i es produeix una entrada del precursor de la protamina en el nucli i una hiperacetilació de les histones. La tercera remodelació de la cromatina condueix a la formació de fibres de 50 nm (D): en aquesta cromatina es dona la desaparició de les histones del nucli; les restes de la histona H4 que queda es troba hiperacetilada. A partir de les fibres de 50 nm (E) la cromatina entra en les fases finals de l'espermioogènesi, en què aquestes fibres s'uneixen progressivament entre si, s'acumulen en un lateral de la membrana nuclear (E detall) i provoquen una compressió lateral del nucli. Les causes que responen a aquest procés han de ser la

conversió del precursor a la protamina madura i la completa desfosforilació d'ambdues molècules, que ja l'espermatozoide madur (figura F) presenta una cromatina compacta i electrodensa, en què la protamina desfosforilada és l'única proteïna que interacciona amb el DNA. El nucli mesura 1 µm de diàmetre per 6 µm de llarg, aproximadament. **Columna 2:** Immunomarcatge de la histona H2A en la cromatina espermioègica de *S. officinalis*. A) La cromatina de tipus somàtic reacciona amb la histona H2A, principalment en l'heterocromatina, que és on hi ha una densitat major de nucleosomes. B) La cromatina granular presenta un marcatge homogeni i elevat per a la histona H2A. C) En les fibres de 35 nm es redueix lleugerament el marcatge, però la presència d'histones en el nucli és encara significativa. Les fibres de 50 nm (D) presenten una clara disminució de la reacció amb l'antisèrum, però el marcatge no és nul, cosa que indica una presència d'histones romanents en el nucli. A partir de les fases de condensació de la cromatina (E-F), el marcatge per a la histona H2A desapareix. **Columna 3:** Immunolocalització del precursor de la protamina en la cromatina de *S. officinalis*. Tant la cromatina de tipus somàtic (A) com la de tipus granular (B), no presenten marcatge evident per a la molècula precursora de la protamina. És en les fibres de 35 nm on la cromatina reacciona intensament amb el precursor de la protamina (C); en les fibres de 50 nm el marcatge es manté (D). A partir de les fases de condensació de la cromatina, o bé el precursor o bé la protamina madura interaccionen amb la cromatina espermioègica (E-F). *Nota: Aquestes imatges es troben a un augment inferior que la resta, fet que dificulta veure tan clarament el marcatge de l'anticòs.* **Columna 4:** Marcatge de la histona H4-acK12 en l'espermioègesi de *S. officinalis*. A) La cromatina somàtica no reacciona amb l'anti-ac-H4K12. B) La cromatina granular de 20 nm reacciona fortament amb l'anticòs, i això indica que aquesta cromatina presenta una monoacetilació de la histona H4. Les fibres de 35 nm (C) es troben també monoacetilades, i les fibres de 50 nm (D) presenten una reacció disminuïda però significativa si tenim present que en aquesta cromatina han desaparegut la majoria d'histones. A partir de les fibres de 50 nm fins al final de l'espermioègesi el marcatge desapareix (E-F). **Columna 5:** Immunomarcatge de la histona H4-acK16 en la cromatina espermioègica de *S. officinalis*. Tant la cromatina de tipus somàtic (A) com la granular (B) no presenten marcatge per a l'anticòs, però en les fibres de 35 nm (C) la reacció de la cromatina és la més elevada de tots els estadis espermioègics, cosa que indica una hiperacetilació de la histona H4. Les fibres de 50 nm (D) presenten marcatge significatiu de la histona H4 residual que es troba també hiperacetilada. En les fases de condensació de la cromatina (E-F) el marcatge desapareix.

En les fibres de 50 nm (columna 3, figura D), el marcatge segueix elevat, cosa que indica encara la presència del precursor en el nucli. Com hem comentat en l'apartat de «Material i mètodes», l'antisèrum generat per al precursor de la protamina presenta també una reacció creuada amb la protamina madura (Martínez-Soler *et al.*, 2007); aquest fet implica que en les fases de condensació de la cromatina no podem distingir entre el marcatge del precursor o de la protamina i, per tant, el marcatge es manté elevat fins als últims estadis de l'espermioègesi (columna 3, figura E-F).

**Anti-histona H4 ac.K12:** El marcatge d'aquest anticòs en les diferents fases de la remodelació de la cromatina es mostra resumit en la columna 4. En la cromatina de tipus somàtic, la presència d'histona H4 acetilada en K12 és inexistent (columna 4, figura A), mentre que en la cromatina granular (columna 4, figura B) el marcatge augmenta sobtadament, fet que atribueix el pas de cromatina somàtica a granular a la presència d'H4 acetilada en K12 (vegeu la discussió). La intensitat de marcatge es manté en les fibres de 30 nm (columna 4, figura C), i fins i tot és lleugerament superior. Quan les fibres de cromatina mesuren 50 nm (columna 4, figura D), el marcatge es troba fortament reduït. En les últimes fases de l'espermioègesi, el marcatge és inexistent o equivalent al *background*. (Columna 4, figures E-F.)

**Anti-histona H4 ac.K16:** En general, la reacció

de la cromatina espermioègica amb aquest anticòs és inferior a l'obtingut per a la histona H4ac.K12 (columna 5). És per aquest motiu que hem assenyalat la reacció de l'anticòs amb fletxes. Tant en la cromatina de tipus somàtic (columna 5, figura A) com granular (columna 5, figura B) presenten un marcatge nul. És en les fibres de 30 nm on la cromatina reacciona més intensament amb l'anticòs anti-H4 ac.K12 (columna 5, figura C). En les fibres de 50 nm el marcatge es redueix significativament (columna 5, figura D), i a partir de les fases de condensació de la cromatina (columna 5, figures E-F), el marcatge desapareix.

## DISCUSSIÓ

El procés de compactació i reorganització de la cromatina durant l'espermioègesi és extremadament variable entre les diferents espècies animals. Entre d'altres factors, un dels condicionants més importants d'aquest procés és el tipus de transició proteica que té lloc en el nucli durant l'espermioègesi.

En moltes espècies les histones de les espermàtides primerenques s'hiperacetilen i són directament desplaçades per la protamina (Christensen *et al.*, 1984; Oliva i Dixon, 1991). En aquest tipus de transició proteica, el patró de condensació de la cromatina és relativament simple: a partir d'una cromatina

de tipus somàtic, es remodela a cromatina granular i, finalment, per unió d'aquests grànuls, la cromatina és altament condensada a causa de la presència de la protamina en el nucli.

El model de *Sepia officinalis* representa un grau superior de complexitat en aquesta transició, en què primer les histones són desplaçades pel precursor de la protamina i posteriorment per la protamina madura. Aquest pas addicional produeix un increment en la complexitat del patró de condensació de la cromatina: la doble transició proteica que té lloc en el nucli al llarg de l'espermioogènesi provoca tres remodelacions estructurals en la cromatina: cromatina de tipus somàtic a grànuls de 20 nm, després a fibres de 35 nm i finalment a fibres de 50 nm.

En el present treball hem volgut entendre millor cada pas en la transició proteica i mitjançant anticossos específics (histona H2A, precursor de la protamina i formes hiperacetilades de la histona H4) hem estudiat la composició de proteïnes de les diferents estructures de la cromatina espermioogènica de *S. officinalis*.

En la primera remodelació de la cromatina espermioogènica de *S. officinalis*, l'hetero i eucromatina es reorganitzen en grànuls de 20 nm de diàmetre distribuïts homogèniament dins el nucli. El fet que en aquesta primera transició la cromatina granular manté la totalitat de les histones (columna 2, figura B) i el precursor de la protamina encara no hagi entrat en el nucli (columna 3, figura B), suggereix en primer lloc que els grànuls estan constituïts per nucleosomes i, en segon lloc, que aquesta reorganització de la cromatina de tipus somàtic pot ser deguda a modificacions posttranscripcionals de les histones o a la pèrdua de proteïnes que constitueixen l'heterocromatina. En aquesta cromatina de tipus granular, el marcatge amb l'anticòs anti-H4-ac.K12 augmenta sobtadament respecte a la de tipus somàtic (columna 4, figura A). En canvi, no reacciona amb l'anticòs anti-H4-ac.K16. Considerant que en *S. officinalis* aquests anticossos reaccionen amb les formes mono i triacetilades de la histona H4, respectivament (Couppez *et al.*, 1987), podem atribuir la remodelació de la cromatina en grànuls a una monoacetilació massiva de la histona H4. La segona remodelació de la cromatina de grànuls a fibres de 35 nm és una reacció complexa i interessant, ja que respon a diversos processos: en primer lloc, les fibres de 35 nm tenen una quantitat d'histones similar a la de la cromatina de tipus somàtic (columna 2, figura C), en segon lloc, aquestes histones coexisteixen amb la totalitat (o gairebé la totalitat) del precursor de la protamina en el nucli (columna 3., figura C) i, en tercer lloc, la histona H4 en aquestes fibres es troba hiperacetilada, ja que la reacció d'aquesta cromatina amb

els anticòs anti H4-ac.K12 i K16 és la més elevada de tots els estadis espermioogènics (columna 4, figura C i columna 5, figura C). Així doncs, les fibres de 35 nm respondrien a un estadi d'equilibri de la següent reacció:

$Pp + \text{DNA-Hist.ac} \leftrightarrow Pp\text{-DNA-Hist.ac} \leftrightarrow Pp\text{-DNA} + \text{Hist.ac}$ , en què *Pp* indica precursor de la cromatina (en què aquestes fibres passen a mesurar 50 nm de diàmetre), i respondria a un desplaçament cap a la dreta de la reacció, de manera que gradualment el DNA quedaria unit al precursor de la protamina i desplaçaria les histones hiperacetilades. Aquest fet respon en primer lloc al fet que el marcatge de les histones en aquestes fibres sigui clarament inferior però no nul (columna 2, figura D); en segon lloc, que aquestes histones residuals es trobin hiperacetilades (columna 4, figura D i columna 5, figura D) i, finalment, que la reacció amb la molècula precursora de la protamina sigui elevada (columna 3, figura D).

Una vegada la cromatina espermioogènica ha entrat en les fases de condensació, les histones han desaparegut del nucli i les úniques proteïnes que interaccionen amb el DNA són el precursor de la protamina, la protamina madura i les seves formes fosforilades (Wouters-Tyrou *et al.*, 1991).

## AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat finançat pel projecte atorgat al Dr. Chiva: Ministeri d'Educació i Ciència, núm: BFU 2005-00123/BMC. Volem agrair a la Dra. Núria Cortadelles i Almudena Sotto els seus consells científics.

Totes les observacions de microscòpia electrònica s'han fet als Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona de l'Hospital Clínic, en un Hitachi 4-600 (Hitachi Ltd., Tòquio, Japó).

## BIBLIOGRAFIA

- CÀCERES, C.; RIBES, E.; MULLER, S.; CORNUDELLA, L.; CHIVA, M. (1999). «Characterization of chromatin-condensing proteins during spermiogenesis in a neogastropod mollusc (*Murex brandaris*)». *Mol. Reprod. Dev.*, 38: 440-452.
- CHRISTENSEN, M. E.; RATTNER, J. B.; DIXON, G. H. (1984). «Hyperacetylation of histone H4 promotes decondensation prior to histone replacement of protamines during spermatogenesis in rainbow trout». *Nucleic Acid Res.*, 12: 4575-4592.
- COUPEZ, M.; MARTIN-PONTHIEU, A.; SAUTIÈRE, P. (1987). «Histone H4 from cuttlefish testis is sequen-



- tially acetylated. Comparison with acetylation of calf thymus histone H4». *J. Biol. Chem.*, 262: 2854-2860.
- MANOCHANTR, S.; SRETARUGSA, P.; CHAVADEJ, P.; SOBHON, P. (2005). «Chromatin organization and basic nuclear proteins in the male germ cells of *Rana tigrina*». *Mol. Reprod. Dev.*, 70: 184-197.
- MARTIN-PONTHIEU, A.; WOUTERS-TYROU, D.; BÉLAI-CHE, D.; SAUTIÈRE, P.; SCHINDLER, P.; VAN DORSSELAER, A. (1991). «Cuttlefish sperm protamines. 1. Amino acid sequences of two distinct variants». *Eur. J. Biochem.*, 195: 611-619.
- MARTIN-PONTHIEU, A.; WOUTERS-TYROU, D.; PUDLO, B.; BUISINE, E.; SAUTIÈRE, P. (1994). «Isolation and characterization of a small putative zinc finger protein from cuttlefish epididymal sperm cells». *Eur. J. Biochem.*, 220: 463-468.
- MARTÍNEZ-SOLER, F.; KURTZ, K.; AUSIÓ, J.; CHIVA, M. (2007). «Transition of nuclear proteins and chromatin structure in spermiogenesis of *Sepia officinalis*». *Mol. Reprod. Dev.*, 74: 360-370.
- MAXWELL, W. L. (1975). «Spermiogenesis of *Eusepia officinalis* (L.), *Loligo forbesi* (Steenstrup) and *Allo-teuthis subulata* (L.) (Cephalopoda, Decapoda)». *Proc. R. Soc. London B.*, 191: 527-535.
- ROUSSEAUX-PRÉVOST, P.; ENGELHARDT, R. P.; ROUSSEAU, J.; WOUTERS-TYROU, D.; SAUTIÈRE, P. (1998). «Nuclear protein transitions in cuttlefish spermiogenesis: Immunocytochemical localization of a protein specific for the spermatid stage». *Gamete Res.*, 19: 277-290.
- SUPHAMUNGMEE, W.; APISAWETAKAN, S.; WEERACHATYANUKUL, W.; WANICHANON, C.; SRETARUGSA, P.; POOMTONG, T.; SOBHON, P. (2005). «Basic nuclear protein pattern and chromatin condensation in the male germ cells of a tropical abalone, *Haliotis asinina*». *Mol. Reprod. Dev.*, 70: 211-221.
- OLIVA, R.; DIXON, G. H. (1991). «Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement transition». *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 40: 25-94.
- WOUTERS-TYROU, D.; CHARTIER-HARLIN, M. C.; MARTIN-PONTHIEU, A. M.; BOUTILLON, C.; VAN DORSSELAER, A.; SAUTIÈRE, P. (1991). «Cuttlefish spermatid-specific protein T. Molecular characterization of two variants T1 and T2, putative precursor sperm protamine variants Sp1 and Sp2». *J. Biol. Chem.*, 266: 17388-17395



## EL SISTEMA KISSPEPTINA-GPR54 Y SU RELACIÓN CON EL CONTROL NEUROENDOCRINO DE LA REPRODUCCIÓN

Alejandro Mechaly,\* Jordi Viñas, Francesc Piferrer

Departament de Recursos Marins Renovables, Institut de Ciències del Mar (CSIC)  
Passeig marítim, 37-49. 08003 Barcelona. [amechaly@icm.csic.es](mailto:amechaly@icm.csic.es).

---

### Resumen

El descubrimiento de la kisspeptina junto con su receptor, GPR54, y su relación con el control de la pubertad de los mamíferos, es uno de los hallazgos más relevantes en la biología reproductiva de los últimos años. La kisspeptina tiene un efecto directo sobre la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), iniciando la cascada hormonal con efecto final en las gónadas con la liberación de los esteroides sexuales. En este artículo se describe la estructura de los genes (*Kiss-1* y GPR54) y de sus productos proteicos, así como también los mecanismos endocrinos de regulación endógena y los factores externos que afectan al complejo kisspeptina-GPR54. Finalmente, se describe los recientes hallazgos en este tema en peces teleósteos para proporcionar una perspectiva evolutiva.

**Palabras clave** Pubertad, GPR54, kisspeptina, GnRH, gonadotropinas.

### Abstract

The discovery of kisspeptins together with their receptor, GPR54, and their relationships with puberty control in mammals has been described as one of the most important findings in reproductive biology in the last years. Kisspeptin stimulates GnRH initiating the hormonal cascade which ends in the gonads with the secretion of the sex steroids. This paper describes the gene structure of *Kiss-1* and GPR54 and their protein product organization. The endocrine regulation of the mechanism and the exogenous factor affecting the complex Kisspeptin-GPR54 are also discussed. Finally, we describe recent findings in this field concerning teleost fish to provide an evolutionary perspective.

**Key words** Puberty, GPR54, kisspeptin, GnRH, gonadotrophins.

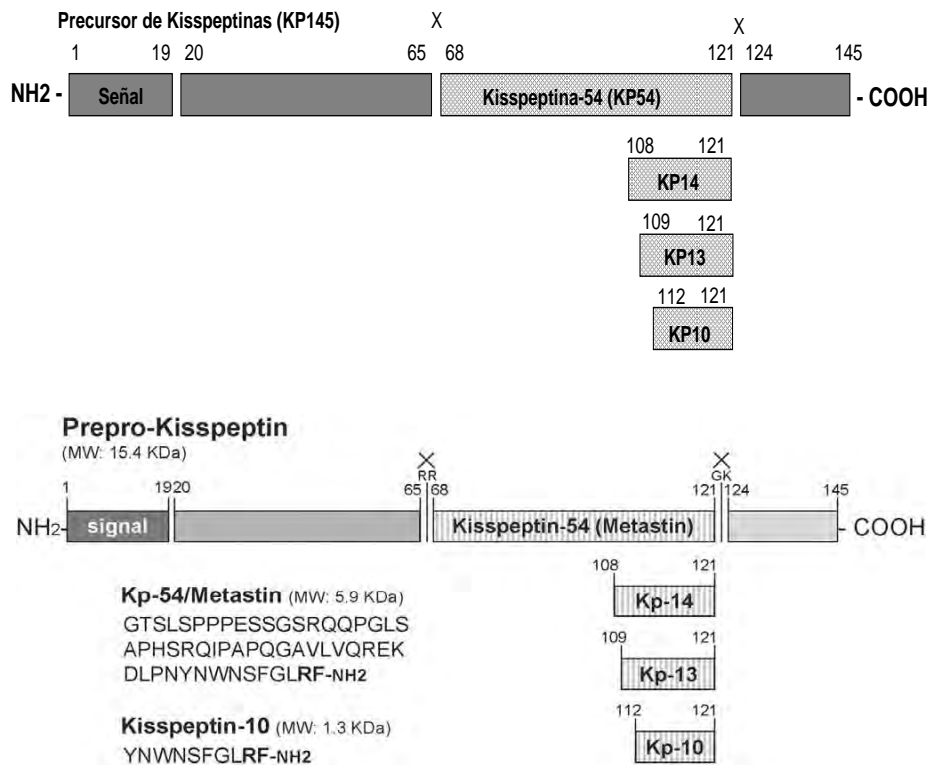
---

## INTRODUCCIÓN

La pubertad es el período del desarrollo que incluye la transición desde un sistema reproductor inmaduro a uno maduro y funcional. Este proceso comporta un control endocrino mediante la acción secuencial de varias hormonas que se originan en el hipotálamo y tienen su efecto final en las gónadas. En mamíferos, donde el proceso es más conocido, el hipotálamo libera la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH), que estimula la hipófisis o pituitaria, que a su vez libera otras dos hormonas mensajeras, las gonadotropinas propiamente dichas, la hormona folículoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). Estas gonadotropinas circulan por el sistema vascular hasta las gónadas, las cuales una vez recibida la señal a través de receptores específicos empiezan a madurar, proceso en el que los esteroides sexuales juegan un importante papel.

Durante el año 1996, se logró aislar el gen *kiss-1*,

el cual había sido considerado un gen tumoral debido a su capacidad de inhibir metástasis en melanomas, motivo por el cual la proteína codificada por este gen se denominó inicialmente *metastina*, (Lee *et al.*, 1996). Sin embargo, a partir de los estudios de su receptor (GPR54), se descubrió que mutaciones en el mismo provocaban hipogonadismo hipogonadotrópico, condición asociada a la no maduración sexual e infertilidad en humanos (de Roux *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003) y ratones (Funes *et al.*, 2003). Más tarde se comprobó en ratones que las mutaciones producidas por este gen podían corregirse mediante la administración exógena de GnRH (Seminara *et al.*, 2003). En cerebros de ratas, la administración central de kisspeptinas producían un efecto inductivo sobre la secreción de las LH (Matsui *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2004) y de las FSH (Navarro *et al.*, 2005). Estos estudios revelaron el rol de la kisspeptina y su receptor, GPR54, como un sistema clave en la regulación de la pubertad, convir-



**Figura 1** Estructura proteica de las kisspeptinas de humanos y del polipéptido precursor (KP145). Los aminoácidos 1 al 19 corresponden a la secuencia señal y las X marcan los sitios de clivaje que originan los productos (KP54, KP14, KP13 y KP10).

tiéndose en uno de los descubrimientos más relevantes realizados en el campo de la biología de la reproducción desde el hallazgo de la GnRH en la década de los setenta (Messenger, 2005). Sin embargo, actualmente los procesos fisiológicos asociados a la actuación de este complejo aún no están perfectamente establecidos.

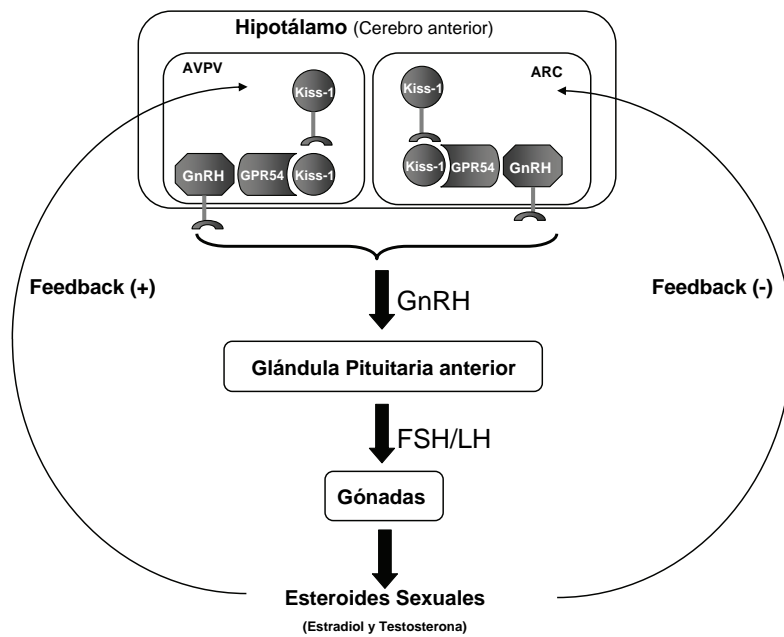
### Estructura molecular de la kisspeptina y la *gpr54*

El gen *kiss-1* está estructurado en tres exones, que en conjunto corresponden a 438 pb en humanos. El producto de este gen es un neuropéptido precursor de 145 aminoácidos (KP145). En esta preproteína existe una secuencia señal (aminoácidos 1 al 19), dos potenciales sitios de clivaje (aminoácidos 57 y 67), y un sitio terminal de clivaje o amidación (aminoácidos del 121-124) (Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001). El mayor péptido producido por el gen *kiss-1* es la kisspeptina-54 (KP54), de 54 aminoácidos y también denominada metastina, pero existen otros polipéptidos derivados del precursor *Kiss-1*, como la kisspeptina-14 (KP14), kisspeptina-13 (KP13) y kisspeptina-10 (KP10) (Kotani *et al.*, 2001) (figura 1). Los últimos 10 aminoácidos de la KP54 parecen ser los más importantes para la activación del receptor GPR54 y son los más conserva-

dos a través de las especies (Stafford *et al.*, 2002). Actualmente la Kisspeptina solo se encuentra secuenciada en tres especies de mamíferos: rata (AY196983), ratón (AB162440) y humano (AY117143).

La unión del receptor GPR54 con el ligando Kiss1 permite la activación de la fosfolipasa C y un incremento intracelular de inositol trifosfato, seguido por movilización de  $Ca^{2+}$ , secreción de ácido araquidónico y activación de ERK1/2 y proteína quinasa mitocondrial (p38 MAP) (Kotani *et al.*, 2001)

La estructura del gen receptor GPR54 es más compleja (5 exones y 4 intrones), pero a su vez mucho más conservada, con un número cercano a los 1200 pb. La proteína GPR54 es un receptor asociado a una proteína G de la familia de las rodopsinas y con un alto porcentaje de identidad con los receptores de la familia de las galaninas (Funes *et al.*, 2003). La GPR54 tiene siete dominios transmembrana hidrofóbicos. La conservación del gen de la GPR54 ha permitido que a partir de su primera clonación en ratas en el año 1999 (Lee *et al.*, 1999), se hayan podido clonar genes ortólogos en otras especies de mamíferos (humano y ratón) (Muir *et al.*, 2001; Stafford *et al.*, 2002) y de peces (tilapia, múgil y cobia) (Parhar *et al.*, 2004; Nocillado *et al.*, 2007; Mohamed *et al.*, 2007).



**Figura 2a** Esquema hipotético del mecanismo de regulación neuroendocrino del sistema kisspeptina-GPR54 y su relación con el eje hipotálamo-pituitaria-gónada (HPG). AVPV, núcleo anteroventral periventricular; ARC, núcleo arcuato del hipotálamo.

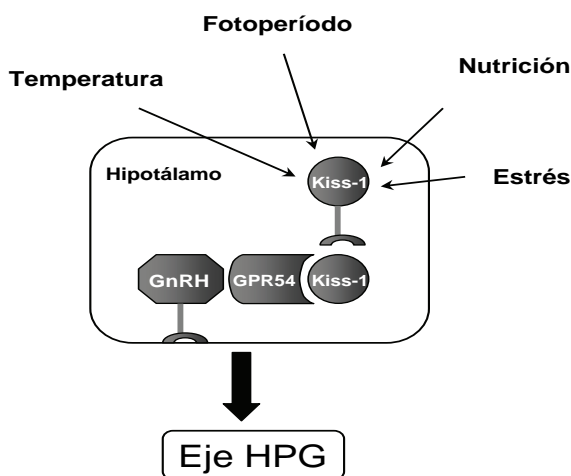
**El sistema Kiss-1-GPR54 y el control neuroendocrino en la reproducción**

Numerosos estudios genéticos y moleculares han sentado las bases del papel del sistema kisspeptina-GPR54 en la regulación de la GnRH y las gonadotropinas y el control neuroendocrino de la reproducción (Seminara *et al.*, 2005). La administración de kisspeptinas (KP54, KP14, KP13 y KP10) en mamíferos estimula marcadamente la secreción de LH, independientemente de la dosis, ruta de administración

y estado de desarrollo (Messenger *et al.*, 2005; Gottsch *et al.*, 2004; Irving *et al.*, 2004).

El receptor GPR54 se encuentra en el cerebro anterior junto a las neuronas hipotálamicas que secretan la hormona GnRH, lo que sugiere que las kisspeptinas, que a su vez se expresan altamente en el cerebro, y en particular en el hipotálamo y los ganglios de la base (Muir *et al.*, 2001), pueden actuar directamente sobre estas neuronas. El control neuroendocrino del sistema se regula por la expresión diferencial de mRNA de *kiss1* entre el núcleo anteroventral periventricular (AVPV) y en el núcleo arcuato (ARC). La kisspeptina estimula la liberación de GnRH provocando la secreción en el sistema vascular de las gonadotropinas (LH y FSH), las cuales tienen su efecto en las gónadas estimulando la producción de los esteroides sexuales. El ciclo se cierra con una regulación en *feedback* de los esteroides sexuales, los cuales inhiben la expresión de *Kiss1* en el ARC o inducen su expresión en el AVPV (figura 2a).

Entre los factores exógenos que afectan al complejo kisspeptina-GPR54 y al eje hipotálamo-pituitario-gonadal (HPG), cabe citar principalmente la temperatura y el fotoperíodo (factores medioambientales) y la nutrición y el estrés (factores fisiológicos) (figura 2b).



**Figura 2b** Modelo esquemático simplificado del control de la reproducción por diversos factores que estimulan al eje hipotálamo-pituitario-gonadal (HPG) vía el receptor GPR54.

### Actualidad del sistema Kiss-1-GPR54 en peces teleósteos

En los últimos dos años, tras haberse reconocido el sistema kiss1/GPR54 como clave en la regulación del eje reproductivo, han aparecido estudios describiendo la clonación del receptor GPR54 en varias especies de peces. Sin embargo hasta la fecha no existe ningún estudio sobre el gen *Kiss-1*, seguramente a causa de su poca conservación. Por otro lado, el gen de la GPR54 en peces comparte la estructura de 5 exones y 4 intrones. Asimismo, a la estructura proteica deducida a través de la secuencia de DNA también se le pueden identificar los siete dominios transmembrana con un grado de conservación muy elevado (Parhar *et al.*, 2004).

### BIBLIOGRAFÍA

- DE ROUX, N.; GENIN, E.; CAREL, J.C.; MATSUDA, F.; CHAUSSAIN, J. L.; MILGROM, E. (2003). «Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100: 10972-10976.
- FUNES, S.; HEDRICK, J. A.; VASSILEVA, G.; MARKOWITZ, L.; ABBONDANZO, S.; GOLOVKO, A.; YANG, S.; MONSMA, F. J.; GUSTAFSON, E. L. (2003). «The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 312: 1357-1363.
- GOTTSCH, M. L.; CUNNINGHAM, M. J.; SMITH, J. T.; POPA, S. M.; ACOHIDO, B. V.; CROWLEY, W. F.; SEMINARA, S.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. (2004). «A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse». *Endocrinology*, 145: 4073-4077.
- IRWIG, M. S.; FRALEY, G. S.; SMITH, J. T.; ACOHIDO, B. V.; POPA, S. M.; CUNNINGHAM, M. J.; GOTTSCH, M. L.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. (2004). «Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat». *Neuroendocrinology*, 80: 264-272.
- KOTANI, M.; DETHEUX, M.; VANDENBOGAERDE, A.; COMMUNI, D.; VANDERWINDEN, J. M.; LE POUL, E.; BREZILLON, S.; TYLDESLEY, R.; SUAREZ-HUERTA, N.; VANDEPUT, F.; BLANPAIN, C.; SCHIFFMANN, S. N.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. (2001). «The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54». *J. Biol. Chem.*, 276: 34631-34636.
- LEE, J. H.; MIELE, M. E.; HICKS, D. J.; PHILLIPS, K. K.; TRENT, J. M.; WEISSMAN, B. E.; WELCH, D. R. (1996). «KISS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene». *J. Natl. Cancer I.*, 88: 1731-1737.
- LEE, D. K.; NGUYEN, T.; O'NEILL, G. P.; CHANG, R.; LIU, Y.; HOWARD, A. D.; COULOMBE, N.; TAN, C. P.; TANG-NGUYEN, A. T.; GEORGE, S. R. [*et al.*] (1999). «Discovery of a receptor related to the galanin receptors». *FEBS Lett.* 446: 103-107.
- MATSUI, H.; TAKATSU, Y.; KUMANO, S.; MATSUMOTO, H.; OHTAKI, T. (2004). «Peripheral administration of metastatin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320: 383-388.
- MESSAGE, S.; CHATZIDAKI, E. E.; MA, D.; HENDRICK, A. G.; ZAHN, D.; DIXON, J.; THRESHER, R. R.; MALLINGE, I.; LOMET, D.; CARLTON, M. B.; COLLEDGE, W. H.; CARATY, A.; APARICIO, S. A. (2005). «Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102: 1761-1766.
- MOHAMED, J. S.; BENNINGHOFF, A. D.; HOLT, G. J.; KHAN, I. A. (2001). «Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia». *J. Mol. Endocrinol.*, 38 (2): 235-244
- MUIR, A. I.; CHAMBERLAIN, L.; ELSHOURBAGY, N. A.; MICHALOVICH, D.; MOORE, D. J.; CALAMARI, A.; SZEKERES, P. G.; SARAU, H. M.; CHAMBERS, J. K.; MURDOCK, P.; STEPLEWSKI, K.; SHABON, U.; MILLER, J. E.; MIDDLETON, S. E.; DARKER, J. G.; LARMINIE, C. G.; WILSON, S.; BERGSMAN, D. J.; EMSON, P.; FAULL, R. [*et al.*] (2001). «AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1». *J. Biol. Chem.*, 276: 28969-28975.
- NAVARRO, V. M.; CASTELLANO, J. M.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, R.; BARREIRO, M. L.; ROA, J.; SANCHEZ-CRIADO, J. E.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. (2004). «Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor GPR54 in rat hypothalamus and potent LH releasing activity of KiSS-1 peptide». *Endocrinology*, 145: 4565-4574.
- NAVARRO, V. M.; CASTELLANO, J. M.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, R.; TOVAR, S.; ROA, J.; MAYEN, A.; BARREIRO, M. L.; CASANUEVA, F. F.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C. [*et al.*] (2005). «Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat». *Endocrinology*, 146:1689-1697.
- NOCILLADO, J. N.; LEVAVI-SIVAN, B.; CARRICK, F.; ELIZUR, A. (2007) Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54), gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*». *Gen. Comp. Endocrinol.*, 150 (2): 278-287.
- OHTAKI, T.; SHINTANI, Y.; HONDA, S.; MATSUMOTO, H.; HORI, A.; KANEHASHI, K.; TERAOKA, Y.; KUMANO, S.; TAKATSU, Y.; MASUDA, Y.; ISHIBASHI, Y.; WATANABE, T.; ASADA, M.; YAMADA, T.; SUENAGA, M.; KITADA, C.; USUKI, S.; KUROKAWA, T.; ONDA, H.; NISHIMURA, O. [*et al.*] (2001). «Metastasis sup-

- pressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor». *Nature*, 411: 613-617.
- PARHAR, I. S.; OGAWA, S.; SAKUMA, Y. (2004). «Laser captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G-protein-coupled receptor (GPR54) during maturation in cichlid fish». *Endocrinology*, 145:3613-3618.
- SEMINARA, S. B.; MESSEGER, S.; CHATZIDAKI, E. E.; THRESHER, R. R.; ACIERNO JR, J. S.; SHAGOURY, J. K.; BO-ABBAS, Y.; KUOHUNG, W.; SCHWINOF, K. M.; HENDRICK, A. G.; ZAHN, D.; DIXON, J.; KAISER, U. B.; SLAUGENHAUPT, S. A.; GUSELLA, J. F.; O'RAHILLY, S.; CARLTON, M. B.; CROWLEY JR, W. F.; APARICIO, S. A.; COLLEDGE, W. H. (2003). «The GPR54 gene as a regulator of puberty». *N. Engl. J. Med.*, 349: 1614-1627.
- SEMINARA, S. B., KAISER, U. B. (2005). «New gatekeepers of reproduction: GPR54 and its cognate ligand, KiSS-1». *Endocrinology*, 146: 1686-1688.
- STAFFORD, L. J.; XIA, C.; MA, W.; CAI, Y.; LIU, M. (2002). «Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor *Kiss1* and its G-protein-coupled receptor». *Cancer Res.*, 62: 5399-5404.





## HISTONES AND NUCLEOSOMES IN CRUSTACEAN SPERM NUCLEI PREVIOUSLY DESCRIBED AS LACKING DNA-ASSOCIATED PROTEINS

Kathryn Kurtz,<sup>1</sup> Fina Martínez,<sup>1</sup> Elsa Fonfría-Subirós,<sup>1,2</sup> Nuria Saperas,<sup>2</sup> Manel Chiva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiological Sciences II, Faculty of Medicine, University of Barcelona

Feixa Llarga, s/n. L'Hospitalet de Llobregat 08907. Tel. 934 035 824. Fax: 934 024 268.

klkurt00@smumn.edu, finamartinez@ub.edu, elsafonfría@gmail.com, nuria.saperas@upc.edu, mchiva@ub.edu.

<sup>2</sup> Department of Chemical Engineering, Polytechnic University of Catalunya, Barcelona

---

### Abstract

The spermatozoa of several decapod crustaceans have unusual morphologies and atypical chromatin when observed in transmission electron microscopy. These sperm consist of a large electro-dense acrosome, completely surrounded by nearly transparent nuclear material, extending into several lateral arms. In the past, much discussion has been focused on the protein components of the labile, nearly transparent spermatid nucleus of several crab species, but most of the cytochemical studies were performed several decades ago and may present unreliable results, due to the techniques used. Here we revisit the study of how DNA is organized in the spermatid nucleus of crustaceans, using as our model two crab species, *Maja bachidactylae* (family Majidae) and *Cancer pagurus* (family Cancridae), using updated techniques to reconcile the fundamental question of how the chromatin is organized in sperm of these species.

**Key words** Sperm, nucleosome, chromatin, crustacean, micrococcal nuclease.

### Resum

Els espermatozoides de diversos crustacis decàpodes tenen morfologies anormals i la cromatina atípica quan s'observen al microscopi electrònic de transmissió. Aquests espermatozoides consisteixen en un acrosoma molt gran i electrodens que rodeja el nucli per complet. El nucli té braços que s'estenen pels laterals i presenta un aspecte bastant transparent. Al llarg de la història, sempre hi ha hagut controvèrsia pel que fa a la composició proteica de la cromatina del nucli espermàtic, que és molt laxa i gairebé transparent; la majoria d'aquests estudis es van realitzar ja fa temps, i els resultats obtinguts haurien de ser revisats. En aquest treball, estudiem com s'organitza el DNA dins el nucli espermàtic dels crustacis *Maja bachidactylae* (fam. Majidae) i *Cancer pagurus* (fam. Cancridae), utilitzant tècniques més actuals per a donar resposta a una pregunta fonamental que és com s'organitza la cromatina en l'espermatozoide d'aquestes espècies.

---

## INTRODUCTION

Histones are a family of basic proteins found in association with nuclear DNA among nearly all eukaryotes (Vaughn, 1968); a typical eukaryotic nucleus contains about  $5 \times 10^9$  bp of DNA associated non-covalently with five types of histones, resulting in a compact packaging of chromatin (van Holde, 1988). The basic repeating subunit of chromatin formed by the DNA-histone complex is the nucleosome, comprised of about 147 base pairs of DNA wrapped around an octamer of core histones (Zheng and Hayes, 2002). Nucleosomal repeats may vary depending on the species, from 160 bp in yeast to over 200 bp in higher organisms, forming nucleosomal

arrays (Hayes and Hansen, 2001). The DNA-protein composition affecting chromatin architecture in ripe sperm is also variable among species. There are three major categories of sperm: those containing histones, those containing protamine-like proteins, and those containing protamines (Ausió, 1999). One role of sperm proteins is to pack the genetic material into a small volume, resulting in a more hydrodynamic shape for fecundation and DNA protection (Subirana, 1975). In packaging the chromatin, these nuclear proteins decrease the probability of DNA damage by water, enzymes, and bacteria (Subirana and Puigjaner, 1973). Bloch (1969) has categorized five types of histone changes during spermiogenesis, one being "crustacean type", which is the least under-

stood. Published accounts of these sperm support the conclusion that they lack in nuclear basic proteins associated with DNA (Chevaillier, 1966, 1968; Vaughn, 1968a 1968b, 1969, 1972; Langreth, 1969; Vaughn and Hinsch, 1970, 1971). In order to rectify the question concerning how the lax and seemingly unprotected DNA could be organized in the abnormally incompact nucleus of crustacean sperm, we studied the spermatid chromatin composition and packaging of two crab species, using updated techniques including antibodies and micrococcal nuclease digestions. *Maja brachydactyla*, a species which until now has been unstudied, and *Cancer pagurus*, a crab species which has been shown to have a spermatid nucleus depleted of basic proteins (Langreth, 1969) both exhibit nucleosomal chromatin and histones associated to spermatid DNA.

## MATERIALS

Live male *Maja brachydactyla* and *Cancer pagurus* were obtained from fresh sea markets in Barcelona, Spain. Testes and vasa deferentia were immediately dissected and the tissue washed with ice cold buffer A containing 0.25 M sucrose, 10 mM Tris pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.25 mM spermidine, 0.1 mM spermine, and 10 mM benzamidine hydrochloride. The homogenate was either processed further to obtain a population of free sperm for further experimentation, or stored at -20° C with 40% glycerol for later use.

## METHODS

### *Electron microscopy*

Small sections of testes or vasa deferentia from *Maja brachydactyla* and *Cancer pagurus* have been fixed in 2% paraformaldehyde, with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer and embedded in Spurr resin for conventional electron microscopy.

### *Sperm cell purification and protein extraction*

Nuclei were obtained from testis and vasa deferentia of *Maja brachydactyla* and *Cancer pagurus* as in Saperas *et al.* (2006). Briefly, tissues of *Maja brachydactyla* and *Cancer pagurus* were homogenized in buffer A (0.25 M sucrose, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM benzamidine hydrochloride), filtered and centrifuged. Pellets were washed twice more with buffer A containing 0.25% Triton X-100. Purified nuclei were washed with

1 mM Tris/1 mM EDTA pH 8.0, and basic proteins extracted with 5 volumes of 0.4 N HCl, cleared by centrifugation, precipitated and washed with acetone.

### *DNA normalization:*

DNA of purified sperm cells from *Holothria tubulosa* (positive control of sperm containing histones), *M. brachydactyla*, and *C. pagurus* was quantified using A<sup>260 nm</sup> and proteins corresponding to 1 mg DNA were extracted with 0.4 N HCl or SDS. Proteins in association with equal amounts of spermatid DNA from these three models were compared among each other in AU gels (not shown) and SDS gels.

### *Electroforesis*

— *SDS-PAGE*: Total protein extraction was performed as in Chiva and Subirana (1987) and analyzed on 15% SDS-PAGE gels.

— *Acetic acid/urea*: Acetic acid/Urea PAGE gel was performed according to Hurley (1977).

### *Western Blot Analysis*

Western blotting was performed using antiserum for histone H2A, or a commercial antibody for histone H4 from calf thymus (Upstate). The antibodies used, as well as their ECL detection of the HRP-conjugated secondary antibody, were handled under the same conditions as those used in Martinez *et al.* (2007).

### *Obtaining free sperm cell population*

A pure sperm cell population was obtained by filtering the sperm homogenate suspended in ice cold buffer A through 4 layers of gauze, and agitating the filtrate for 15 minutes at 4° C to free sperm cells from spermatophores. The sperm cell suspension was separated from spermatophore capsules and full spermatophores by passing the filtrate through a discontinual sucrose gradient of 0.25 M sucrose, 1 M sucrose, and 2.2 M sucrose. The denser material, being spermatophores and spermatophore capsules, sunk to the interphase of 1 M sucrose and 2.2 M sucrose. After allowing full separation of free sperm from spermatophores in the sperm cell suspension, the top layers containing free sperm suspended in 0.25/1 M sucrose were collected and washed in buffer A. From this point, the sperm cells were used for either swelling experiments, micrococcal nuclease digestions, or protein extractions.

### ***Nuclear swelling tests***

A free sperm cell population was used to perform swelling tests on both species *Maja brachydactyla* and *Cancer pagurus*. Sperm cells of these species were treated with 0.25% Triton X-100/0.1% non ionic detergent to permeabilize the nuclear membrane. Another cell sample was treated with 1mM Tris pH 7.4 to give the cells a hypotonic shock. A third sperm sample was treated with a solution of 1mM Tris pH 7.4 containing 5 mM EDTA, and a fourth sample was incubated with  $5.8 \times 10^{-5}$  M nucleoplasmine from *Xenopus laevis* as in Salvany *et al.* (2004). Observation of nuclear reaction was done on an Olympus DP-11 fluorescent microscope, having stained the nuclear material with 0.1 mg/ml Hoesch 33258 in distilled water.

### ***Micrococcal nuclease digestion***

Digestions were performed as in Saperas *et al.* (2006). Reactions were performed at 37° C for various times in buffer containing 0.25 M Sucrose, 10 mM Tris pH 8.0, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, and 5 mM benzamidine hydrochloride, and then halted by the addition EDTA to a final concentration of 10 mM. After centrifugation, the supernatants were collected, and pellets resuspended in 10mM Tris pH 7.5 with 0.1 mM EDTA, centrifuged again, and the second pellet resuspended in the same buffer. DNA fragments were analyzed on 1.1% agarose slab gels, and basic proteins were analyzed with AU-PAGE.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### ***Ultrastructural study of sperm from M. brachydactyla and C. pagurus***

Transmission electron microscopy confirms a similar morphology of sperm from these two crab species, demonstrating the typical multistellate sperm morphology described by Moses (1961), Brown (1966), and Hinsch (1969, 1973, 1988). An elecrodense acrosome is surrounded by nuclear material, which is composed of lax chromatin found in characteristic radial arm extensions (figure 1 A,B). DNA appears to lack compaction and organization; it is surrounded by a thick membrane, probably formed by the merging of the nuclear membrane with the double cellular membrane.

### ***Sperm nuclear basic proteins in M. brachydactyla and C. pagurus***

Electrophoresis of basic proteins extracted with 0.4 N HCl (not shown) and total proteins extracted with SDS from sperm (figure 3) showed the presence of histones in sperm of both crab species. No significant difference was found in the quantity of histones associated to 1mg DNA in *M. brachydactyla* when compared to sperm nuclei from *H. tubulosa* which are known to contain histones (Cornudella and Rocha, 1979) (not shown). In *C. pagurus*, there seem to be fewer histones globally associated to 1mg of DNA when compared to both *M. brachydactyla* (figure 3, lanes 1 and 3) and *H. tubulosa* (not shown), a noteworthy result deserving further investigation, as this may be important concerning the nucleosomal distribution throughout the nucleus of this crab species. Western Blotting further corroborates and confirms results shown by AU and SDS gels, with antibody recognition of the presence of both histones H2A and H4 in sperm of *M. brachydactyla* and *C. pagurus*, however showing less intensity of antibody signal in *C. pagurus* in comparison to that observed for *M. brachydactyla* (figure 4A, B, lanes 2 and 4).

### ***Swelling of spermatid nucleus of M. brachydactyla and C. pagurus***

Free sperm of *M. brachydactyla* and *C. pagurus* were exposed to several solutions and their swelling behavior observed and compared that of sperm under the same conditions, which contain a DNA-histone or DNA-protamine nuclear composition. In solution containing a mix of Triton X-100 and non-ionic detergent, which makes the cell membrane more porous, there was no effect on the spermatid nucleus, behaving the same as would a spermatid nucleus containing either histones or protamine (figure 4A, C). The sperm were subject to a hypotonic shock, both with and without the detergent mix, and there was no behavioral change, just as there is no change in sperm containing either histones or protamine. However, when sperm were treated with a hypotonic shock including EDTA, a chelant, the nuclei swelled (figure 4B, D), just as would a nucleus containing histones; nuclei containing protamine associated to DNA are not affected. On the other hand, when nuclei were treated with nucleoplasmin, a nuclear chaperone which reorganizes spermatid DNA by replacing protamine with histones, there was no effect (figure 4A, C); spermatid nuclei containing protamine swell under the effect of nucleoplasmin (Salvany *et al.*, 2004).

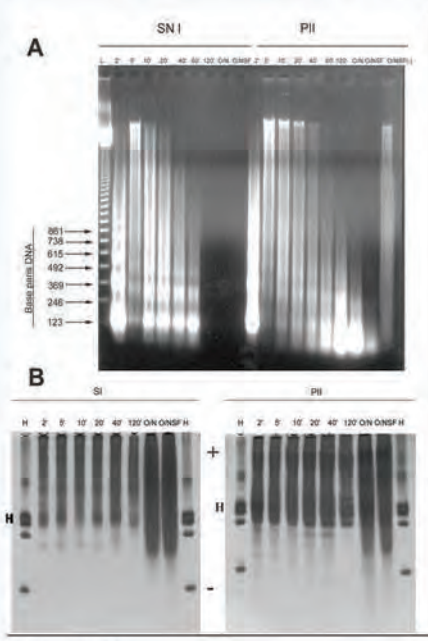
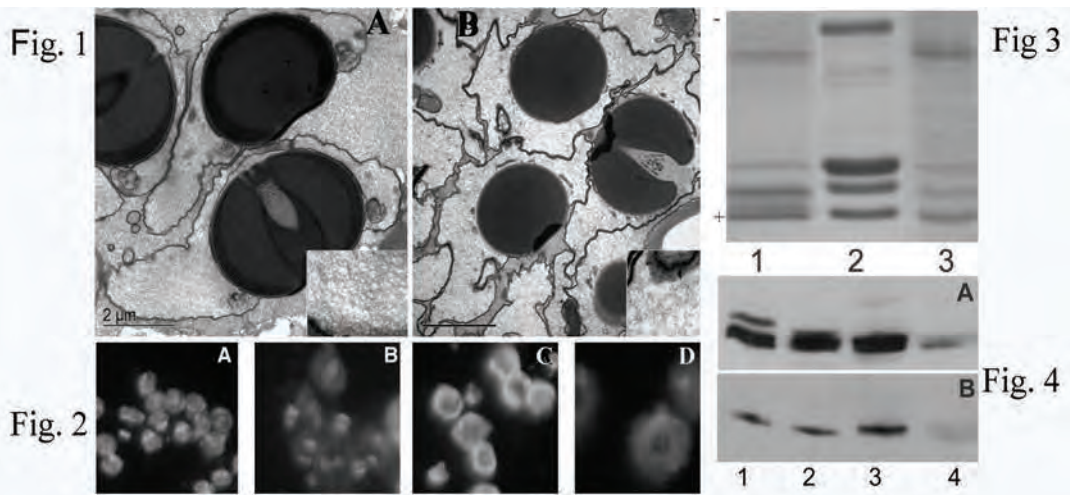


Figure 5

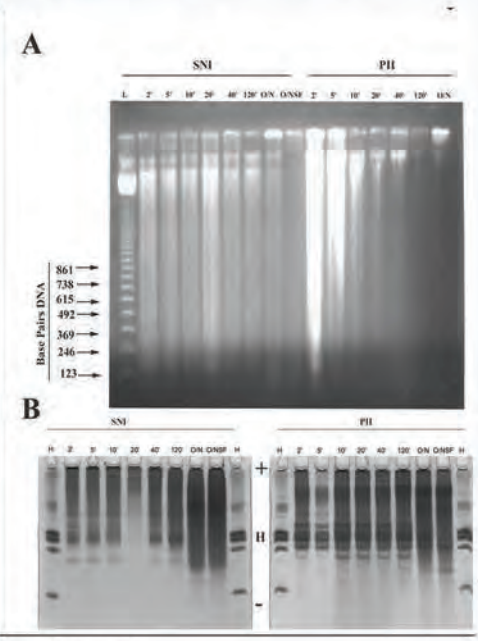


Figure 6

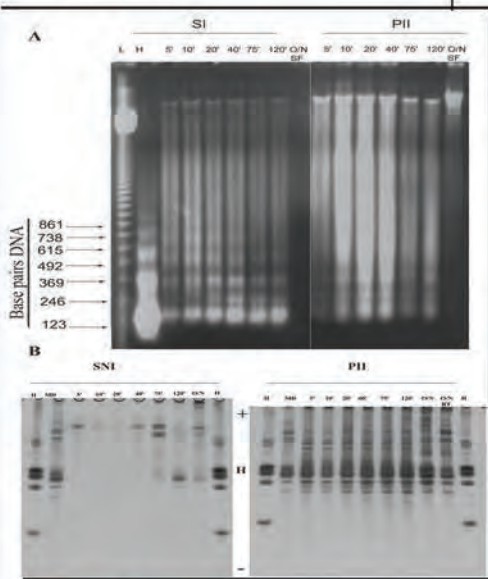


Figure 7

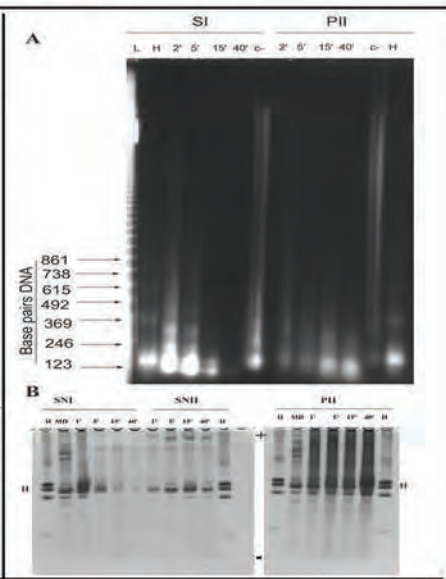


Figure 8

**Figure 1** Ultrastructure of sperm, spermatid chromatin, and spermatophore from *M. brachydactyla* (A) and *C. pagurus* (B). Insets: Amplified detail of the chromatin fibers show a slightly more compact chromatin structure in *M. brachydactyla* (A) than in *C. pagurus* (B), which has a more sparse fiber distribution within the nucleus. Amplifications of insets is equal.

**Figure 2** Swelling behavior of nuclei from *C. pagurus* (A,B) and *M. brachydactyla* (C,D). Swelling is observed with the treatment of Tris/EDTA, shown in B, D. Non-swelling is observed with Tris, Tris/non-ionic detergent, Tris/Triton X-100, and nucleoplasmin, as shown in image A and C.

**Figure 3** SDS gel showing equal amounts of SDS total protein extract from 1 mg DNA. Lane 1: total proteins from vasa deferentia of *M. brachydactyla*; lane 2: Standard of histones from lamprey testes; lane 3: total proteins extracted from vasa deferentia of *C. pagurus*.

**Figure 4** A.- H2A recognition in western blot analysis. B: H4 recognition in western blot analysis. Both blots contain basic proteins extracts from from 1 mg DNA taken from testes or deferent tissue, and separated on acetic acid/urea gels before transfered to PVDF membranes and antibodies treatment. Lane 1.- total basic proteins from testes of *M. brachydactyla*. Lane 2: total basic proteins from vasa deferentia of *M. brachydactyla*; lane 3: total basic proteins from testes of *C. pagurus*; lane 4: total basic proteins extracted from vasa deferentia of *C. pagurus*.

**Figure 5** Nuclease Digestions of sperm from *C. pagurus*. A: 1.1% agarose gel resolving DNA fragments liberated in digest for different times, and compared to standard 123 DNA base pair ladder. B: Basic proteins associated to DNA fragments liberated in digestion (SI) and basic proteins associated to unfragmented DNA (PII). Time intervals are indicated at the head of both DNA and protein gels. ON SF: Sample contained sperm in spermatophore instead of free sperm, left to digest overnight (O/N). H.- Histones.

**Figure 6** Internal nuclease digestions of sperm from *C. pagurus*. A: 1.1% agarose gel resolving DNA fragments liberated in digest for different times, and compared to standard 123 DNA base pair ladder. B: Basic proteins associated to DNA fragments liberated in digestion (SI) and basic proteins associated to unfragmented DNA (PII). Time intervals are indicated at the head of both DNA and protein gels. ON SF: Sample contained sperm in spermatophore instead of free sperm, left to digest overnight (O/N). H: Histones.

**Figure 7** Internal nuclease activity of sperm from *M. brachydactyla*. A: 1.1% agarose gel resolving DNA fragments liberated in internal digestion activity allowed for different times, and compared to standard 123 DNA base pair ladder. B: Basic proteins associated to DNA fragments liberated in internal digestion (SI) and basic proteins associated to unfragmented DNA (PII). Time intervals are indicated at the head of both DNA and protein gels. ON SF: Sample contained sperm in spermatophore instead of free sperm, left to digest overnight (O/N). H: Histones.

**Figure 8** Nuclease Digestions of sperm from *M. brachydactyla*. A: 1.1% agarose gel resolving DNA fragments liberated in internal digestion activity allowed for different times, and compared to standard 123 DNA base pair ladder. B: Basic proteins associated to DNA fragments liberated in internal digestion (SI) and basic proteins associated to unfragmented DNA (PII). Time intervals are indicated at the head of both DNA and protein gels. ON SF: Sample contained sperm in spermatophore instead of free sperm, left to digest overnight (O/N). H: Histones.

### *Micrococcal nuclease digestions*

The results obtained on the assessment of micrococcal nuclease digestion of chromatin from mature sperm cells of *M. brachydactyla* and *C. pagurus* show that there is indeed a nucleo-histone complex organizing the spermatid chromatin, thus hindering enzymatic access to the chromatin in these areas. Sperm chromatin is converted into nucleosome oligomers with the addition of enzyme (figures 5 and 8). Histones associated with these nucleosomal fragments are liberated in the digestion (Figures 5 and 8). However, incubation of the nuclei without enzyme showed chromatin degradation; a digestion pattern similar to that of DNase I (figures 6A and 7A). There is a more defined synergic effect of the internal enzyme and added micrococcal nuclease activity in *M. brachydactyla* (figure 8), as the DNA is

more rapidly digested than that of *C. pagurus* (figure 6) in the positive control with enzyme added. Further experimentation needs to be done to eliminate the prospect that the DNA digestion observed in samples without added enzyme could be due contamination of enzymes from the hepatopancreas. However, the possibility of internal DNase activity in sperm nuclei of crabs is worth further investigation, especially concerning the function this could have in fertilization biology of these animals.

Determination of DNA repeat lengths was done by comparing the resulting DNA fragment motilities to a standard curve derived from DNA fragments of 123 base pair multiples. The resulting sized fragments were extrapolated to what their sizes would be at time 0. This method of nucleosome calculation was performed first on a positive control model, *Holothuria tubulosa*, as has been described by Cor-

nudella and Rocha (1979), and our method produced the same nucleosome size as that which has been published, which is 225 bp. The nucleosome size for both *M. brachydactyla* and *C. pagurus* is about 170 bp, and the core is 145 bp.

One aspect to consider when analyzing the nucleosome found in sperm of these two species is the size of linker DNA. This is the area of the nucleosome with most variability. Within chromatin, the basic unit consists of the core particle and histone H1, with 166 bp of DNA wrapped around the histone octamer and associated with the globular region of H1; this complex is called a chromatosome, or chromatin particle (Bharah *et al.*, 2003). The rest of the DNA included in the nucleosome is called linker DNA, associated with the tail domains of linker histone H1, which folds nucleosomes into higher order a chromatin structure (Widom, 1998). If the nucleosome size corresponds to the size of the chromatosome, then linker DNA portions in the nucleosomes of the crab species studied here are practically non-existent.

Here we disprove the previous reports that the sperm nucleus of crabs is void of basic proteins. With the use of micrococcal nuclease digestions, we show that spermatid DNA is organized into nucleosomes, and that histones are associated with the DNA fragments protected from enzymatic digestion. Some possible reasons for the discrepancy in our results compared with the literature may have to do with the fixation methods used in staining of basic proteins, on which many have based their conclusion that there is an absence of basic proteins in crustacean sperm nuclei (Chevaillier, 1966; Langreth, 1969; Vaughn and Hinsch, 1972). We believe the chemical fixation method could cause artifactual histone migration and chromatin aggregation, and hence unreliable results, both in ultrastructural studies using transmission electron microscopy, as well as cytological and histochemical studies performed on fixed cell nuclei. Further, chromatin of crab sperm has been observed to be highly sensitive by Chevaillier (1968), showing that the chromatin fibers clump unless stabilized by heavy metal ions. Considering sensitivity of sperm from these crabs, buffers used for sperm purification, such as sea water, later replaced by EDTA in the washing technique of Vaughn and Hinsch (1972) exposes the sperm to harsh conditions. It is possible that these sperm, exposed to high ionic strengths and chelating agents or pH changes in the techniques used by earlier investigators, weakened electrostatic histone-DNA affinity, hence resulting in histone migration to other areas of the sperm, such as the acrosome, which has been shown to contain basic proteins ac-

ording to Vaughn and Hinsch (1972). However, a study done by Sellos and le Gal (1981) found the presence of somatic-like histones in sperm of the crustacean *Palaemon serratus*, and their sperm purification method and buffers used are practically identical to those used in our washing method described here.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the Ministry of Education and Science (Spain)-FEDER (grant BFU 2005-00123/BMC). We thank Dra. N. Cortadellas and A. García Soto or their assistance with transmission electron microscopy.

## BIBLIOGRAPHY

- AUSIO, J. (1999). «Histone H1 and the evolution of the sperm nuclear basic proteins». *J. Biol. Chem.*, 274: 31115-31118.
- BHARATH, M. M. S.; CHANDRA, N. R.; RAO, M. R. S. (2003). «Molecular modelling of the chromatosome particle». *Nucleic Acids Research*, 31(14): 4264-4274.
- BLOCH, D. P. (1969). «A catalog of sperm histones». *Genetics*, 61(Suppl.): 93.
- BROWN, G. G. (1966). «Ultrastructural studies of sperm morphology and sperm-egg interaction in the decapod *Callinectes sapidus*». *J. Ultrastruct. Res.*, 14: 425-440.
- CHEVAILLIER, P. (1966). «Contribution a l'étude du complexe ADN-histone dans le spermatozoïde du pagure *Eupagurus bernhardus* L. (Crustace decapode)». *J. Micro.*, 5: 739.
- (1968). «Etude cytochimique ultrastructurale des nucleoproteines dans le spermatozoïde du Pagure *Eupagurus bernhardus* L. (Crustace Decapode)». *J. Microsc.*, 7: 107.
- CHIVA, M.; SUBIRANA, J. A. (1987). «Método per a obtenir protamines testiculars riques en arginina». *Jornades de Biologia Molecular, Secció de Biologia Molecular de la Societat Catalana de Biologia*, 4: 77-80.
- CORNUDELLA, L.; ROCHA, E. (1979). «Nucleosome organization during germ cell development in the sea cucumber *Holothuria tubulosa*». *Biochemistry*, 18: 3724-3732.
- HAYES, J. J.; HANSEN, J. C. (2001). «Nucleosomes and the chromatin fiber». *Current Opinion in Genetics and Development*, 11: 124-129.
- HINSCH, G. W. (1969). «Microtubules in the sperm of the spider crab, *Libinia emarginata* L.». *J. Ultrastruct. Res.*, 29: 525-534.
- (1973). «Sperm structure of of Oxyrhyncha». *Can. J. Zool.*, 51: 421-429.
- (1988). «Ultrastructure of the sperm and sper-

- matophores of the golden crab *Geryon fenneri* and a closely related species, the red crab *G. quinque-dens*, from the eastern gulf of Mexico». *Journal of Crustacean Biology*, 8(3): 340-345.
- HURLEY, C. K. (1977). «Electrophoresis of histones: A modified Panyim and Chalkley system for slab gels». *Anal Biochem*, 80: 624-626.
- LANGRETH, S. G. (1969). «Spermiogenesis in Cancer Crabs». *The Journal of Cell Biology*, 43, 575-603.
- MARTÍNEZ-SOLER, F.; KURTZ, K.; AUSIÓ, J.; CHIVA, M. (2007). «Transition of nuclear proteins and chromatin structure in spermiogenesis of *Sepia officinalis*». *Mol. Reprod. Develop.*, 74: 360-370.
- MOSES, M. J. (1961). «Spermiogenesis in the crayfish (*Procambarus clarkii*). I. Structural characterization of the mature sperm». *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9: 222-228.
- SALVANY, L.; CHIVA, M.; ARNAN, C.; AUSIÓ, J.; SUBIRANA, J.A.; SAPERAS, N. (2004). «Mutation of the Small Acidic Tract A-1 Drastically Reduces Nucleoplasmin Activity». *FEBS Lett.*, 576: 353-357.
- SAPERAS, N.; RIBES, E.; BUESA, C.; GARCIA-HEGART, F.; CHIVA, M. (1993). «Differences in Chromatin condensation during spermiogenesis in two species of fish with distinct protamines». *J. Exp. Zool.*, 265: 185-194.
- SAPERAS, N.; CHIVA, M.; CASAS, M. T.; CAMPOS, L.; EIRÍN-LOPEZ, A.; FREHLICK, L. J.; PRIETO, C.; SUBIRANA, J. A.; AUSIÓ, J. (2006). «A unique vertebrate histone H1-related protamine-like protein results in an unusual sperm chromatin organization». *FEBS J.*, 273: 4548-4561.
- SELLOS, D.; LE GAL, Y. (1981). «Changes in basic nuclear proteins during sperm maturation in *Palaemon serratus* (Crustacea Natantia)». *Cell Differentiation*, 10: 69-77.
- SUBIRANA, J. A. (1975). «On the biological role of basic proteins in the spermatozoa during spermiogenesis». *The biology of the gamete* 239-244.
- SUBIRANA, J. A.; PUIGJANER, L. C. (1973). «X-Ray diffraction studies of nucleoprotamines from molluscs». In: Bergman, E. D.; Pullman, B. [ed.] *Conformation of biological molecules and polymers. The Jerusalem symposia of quantum chemistry and biochemistry, V*. Jerusalem: The Israel Academy of Sciences and Humanities, p. 645-653.
- VAN HOLDE, K. E. (1988). *Chromatin*. New York: Springer Verlag.
- VAUGHN, J. C. (1968a). «Histone metabolism in the crab *Emerita analoga*: Spermiogenesis and early embryogenesis». *J. Cell. Biol.*, 39: 138.
- (1968b). «Changing nuclear histone patterns during development I. Fertilization and early cleavage in the crab *Emerita analoga*». *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 16(7): 473-479.
- VAUGHN, J. C.; HINSCH, G. W. (1970). «Fractionation and characterization of nuclear and acrosomal components of the sperm of the spider crab, *Libinia emarginata*». *Amer. Zool.*, 10: 523.
- VAUGHN, J. C.; HINSCH, G. W. (1971). «Isolation and characterization of chromatin and DNA from the sperm of the spider crab, *Libinia emarginata*». *J. Cell Sci.*, 11(1): 131-152.
- VAUGHN, J. C.; THOMSON, L. A. (1972). «A kinetic study of DNA and basic protein metabolism during spermatogenesis in the sand crab *Emerita analoga*». *Journal of Cell Biology*, 52: 322-337.
- WIDOM, J. (1998). «Structure, dynamics and function of chromatin *in vitro*». *Annu. Rev. Biophys Biomol. Struct.*, 27: 285-327.
- ZHEN, C.; HAYES, J. J. (2003). «Structures and Interactions of the Core Histone Tail Domains». *Biopolymers*, 68: 539-546.





## ASPECTES DEL CICLE GONADAL DEL MOLLUSC BIVALVE *Callista chione* (L. 1758): ESTUDI PRELIMINAR

Eva Galimany,<sup>1\*</sup> Montserrat Ramón,<sup>2</sup> Marc Baeta,<sup>3</sup> Mercè Durfort<sup>4</sup>

<sup>1</sup> IRTA, St. Carles de la Ràpita

Crta. Poble Nou, s/n. 43540 St. Carles de la Ràpita. [eva.galimany@irta.es](mailto:eva.galimany@irta.es).

<sup>2</sup> IEO-Centre Oceanogràfic de les Balears, Palma de Mallorca

<sup>3</sup> ECOPROGES SL, Barcelona

<sup>4</sup> Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

---

### Resum

El desenvolupament gonadal del bivalve venerid *Callista chione* es va estudiar a la costa central Catalana (NW mar Mediterrània). La població analitzada habita fons sorrencs de 5 a 30 metres de fondària entre els rius Tordera i Besòs. L'objectiu de l'estudi és determinar el desenvolupament gonadal de l'espècie. Amb aquesta finalitat, es van recollir 30 individus mensualment, entre gener de 2005 i gener de 2006, es van mesurar amb un peu de rei i se'ls van extreure part de les gònades per conservar-les per a estudi histològic.

El desenvolupament gonadal es va classificar segons l'escala histològica proposada per Valli (1994), amb sis estadis diferents: 0 per a immadur, 1 per a l'aparició de petits fol·licles, 2 per a fol·licles formats que continguin cèl·lules germinals, 3 per a gònades madures, 4 per a l'emissió de les cèl·lules germinals madures, i 5 per a la degradació d'estructures reproductores romanents. També es van fer mesures de la talla d'oòcits i es va estimar la talla de primera maduració. La temperatura de l'aigua es va registrar diàriament a 10 metres de fondària i va oscil·lar entre 12,2° C el mes de març i 23,5° C el mes de juliol.

Els resultats mostren que *C. chione* té la capacitat de reproduir-se durant tot l'any, tot i que els períodes de posta més importants es donen a la primavera i a la tardor. D'aquests dos períodes, el principal té lloc d'abril a juny i l'altre, menys important, de setembre a novembre. D'acord amb el cicle gonadal, els oòcits són més grans quan les gònades estan madures, i els oòcits madurs mesuren 60-90 µm de longitud. La talla de primera maduració es va estimar en 30 mm.

**Paraules clau** bivalve, *Callista chione*, mar Mediterrània, oòcits, reproducció.

### Abstract

The gonadal development of the venerid bivalve *Callista chione* was studied in the Catalan coast (N. W. Mediterranean Sea). The population sampled inhabits between Tordera and Besòs Rivers at depths ranged from 5 to 30 meters in coarse sand bottoms.

The purpose of the study is to determine the gonadal development of the species. Therefore, 30 individuals were collected monthly from January 2005 to January 2006, measured with a caliper and a portion of the gonadal tissue removed and preserved for histological analysis.

Gonadal development was classified according to the gonadal scale for histology studies proposed by Valli (1994) identifying 6 different stages: 0 for immature, 1 for appearance of small follicles, 2 for follicles formed and containing germinal cells, 3 for gonads fully ripe, 4 for emission of the mature germinal cells, and 5 for degradation of the remaining sexual structures. Oocyte sizes were measured and size at first maturity was estimated. Water temperature at 10 meters depth was taken daily and ranged from 12,2 °C in March to 23,5 °C in July.

Results show that *C. chione* is capable of reproducing the whole year through although the most important spawning periods happen in spring and autumn. Two spawning periods were identified, the main one lasting from April to June and the other from September to November. According to the gonadal cycle, oocytes are larger when the gonads are ripe measuring, the ripe oocytes, between 60-90 µm of length. Size at first maturity was estimated at 30mm.

---

## INTRODUCCIÓ

*Callista chione* és un mollusc bivalve de la família Veneridae molt comú a la mar Mediterrània. La seva àrea de distribució s'amplia fins l'oceà Atlàntic, i viu enterrat en fons sorrenca o sorrenca i fangosos de fins a 100 metres de fondària, tot i que generalment habita zones poc profundes.

A Catalunya, *C. chione* s'anomena vulgarment *petxina lluenta* o *petxinot de sang*. És un bivalve de closca gran i robusta que assoleix 6 cm d'alçada, 7 cm de longitud i 3,5 cm d'espessor (Calvín Calvo, 1995). L'espècie és unisexual i filtradora. *C. chione* no presenta dimorfisme sexual i només és possible determinar el sexe dels individus mitjançant l'estudi de les gònades (Pérez Camacho i Román, 1987).

A la mar Mediterrània es pesca de forma artesanal i esdevé una espècie de valor comercial important i elevat consum.

En aquest treball es presenten els resultats corresponents a l'estudi del cicle gonadal, l'estimació de la talla de primera maduració juntament amb la des-

cripció morfològica de l'espermatzoide amb microscòpia electrònica.

## MATERIAL I MÈTODES

L'estudi gonadal de *Callista chione* es va dur a terme a la zona central de la costa catalana entre els rius Besòs i Tordera. Els individus procedien de la pesca comercial.

Per a l'estudi histològic es van analitzar 30 individus mensualment entre gener de 2005 i gener de 2006. Els exemplars es van mesurar amb un peu de rei i les talles estaven compreses entre 31 i 95 mm de longitud. A continuació se'ls va extreure una porció de les gònades, es van conservar 24 h en formol tamponat al 4 % i es van conservar en alcohol de 70°. Per a poder fer l'estudi histològic, els teixits van ser deshidratats i inclosos en parafina de 60° C de punt de fusió.

La temperatura de l'aigua es va registrar a 10 m de fondària diàriament durant tot el període d'estudi amb una sonda de temperatura.

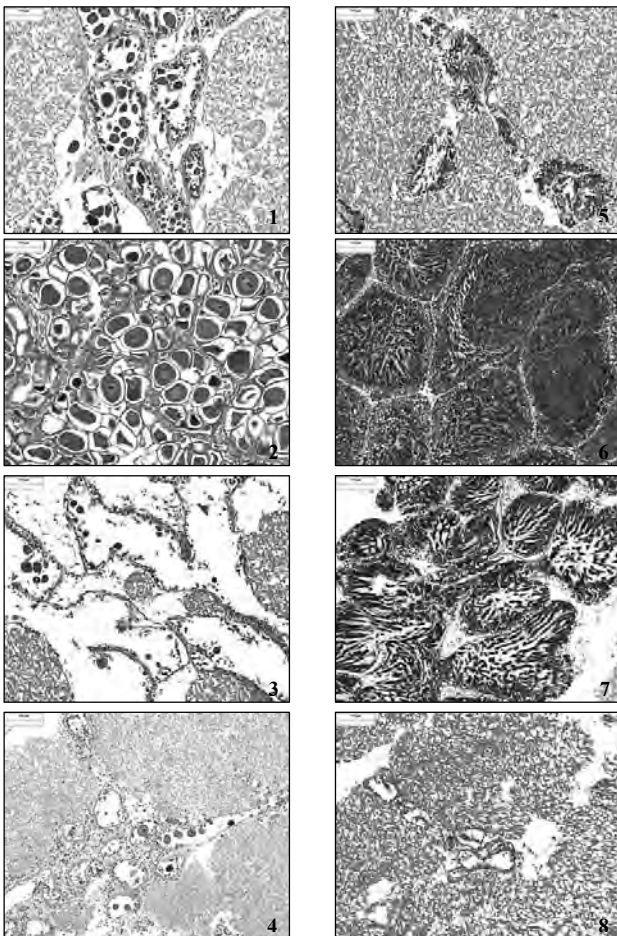
### Cicle gonadal

Per al seu estudi es van fer talls de 5 µm de gruix, es van tenyir amb hematoxilina-eosina i es va usar DPX com a medi de muntatge. El cicle gonadal es va classificar segons l'escala proposada per Valli (1994) amb sis estadis diferents: 0 per a individus immadurs, 1 en aparèixer petits fol·licles, 2 en formar-se fol·licles ben definits amb cèl·lules germinals al seu interior, 3 per a gònades madures, 4 per a l'emissió de les cèl·lules germinals madures, i 5 per a la degradació de les estructures sexuals romanents (figura 1).

Amb l'estat sexual dels individus analitzats es va calcular el percentatge mensual de cada un dels estadis gonadals.

Per a estudiar l'evolució de la mida dels oòcits al llarg de l'any es van analitzar deu individus femella de cada mes i es va mesurar la llargada màxima en un total de 60 oòcits per individu. Per tal d'estandarditzar les dades es van mesurar només els oòcits als quals es veia el nucli i, en el cas de ser oòcits pedunculats, es va mesurar la llargada total amb peu inclòs.

En el cas de la gònada masculina es van caracteritzar els espermatozoides amb microscòpia de rastreig.



**Figura 1** Fotografies amb microscòpia òptica de talls histològics de gònada de femella, estadis del 2 al 5 consecutivament (1.1-1.4) i de mascles, estadis del 2 al 5 consecutivament (1.5-1.8).

### Talla de la primera maduració

Durant els períodes de l'any en què es van identificar un major nombre d'exemplars madurs es van agafar entre 50 i 60 individus de mides compreses entre 17 i 95 mm de longitud per tal de determinar-ne la talla de primera maduració (talla en què el 50 % dels individus de la població són sexualment madurs). Aquesta talla s'ha estimat ajustant una corba logística als valors dels percentatges del individus madurs per talla, mitjançant una anàlisi de regressió no lineal iterativa. La corba correspon a l'expressió:

$$P = a / I + ((a - b) / b) e^{-cn},$$

on  $P$  és la proporció d'individus madurs en cadascun dels intervals de talla,  $I$  la longitud mitjana de l'interval, i  $a$ ,  $b$  i  $c$  els paràmetres que defineixen la corba.

## RESULTATS

La temperatura de l'aigua va oscil·lar entre 12,2° C el mes de març i 23,5° C el mes de juliol.

### Cicle gonadal

Els resultats mostren que *C. chione* té la capacitat de reproduir-se al llarg de tot l'any a la costa catalana (figura 2). Els períodes de posta més significatius es donen a la primavera i tardor. La maduració gonadal s'inicia pel desembre i els fol·licles romanen madurs en gran part de la població des de febrer fins a març. Entre març i abril comença un primer període de posta que presenta un màxim al mes de maig i es perllonga fins al juny. Durant l'estiu, quan la temperatura de l'aigua és elevada, es combinen períodes de maduració i degradació de gònades i s'observa una disminució important en la quantitat de postes

emeses. Passats els mesos de calor, s'observa un segon període important de posta des de setembre fins el novembre. La degradació de les gònades també es dona en aquests mateixos mesos, de manera que pel desembre tornen a madurar i a iniciar-se el cicle. La proporció de mascles i femelles al llarg del cicle va ser de 1:1.

En algunes femelles que fan posta entre gener i març i en el mes d'octubre es troben els estadis 2 i 4, maduració i alliberament de gàmetes madurs, conjuntament en un mateix individu.

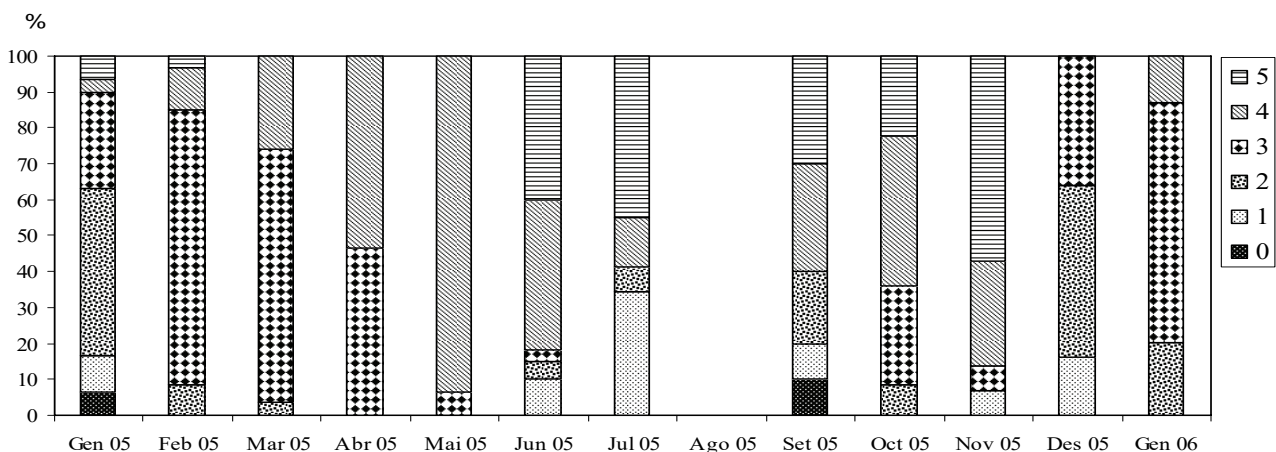
Es presenta concordança entre la mida dels oòcits i l'estadi del cicle gonadal de *C. chione*. Els oòcits madurs al llarg del cicle gonadal oscil·len entre 60-90 µm de longitud i s'observen majoritàriament en els mesos d'hivern i principi de primavera, tot i que al llarg de tot el cicle se'n poden trobar.

Les talles mínimes mensuals dels oòcits són força similars entre si. Això s'explica perquè en la majoria de mesos hi ha oòcits de talla petita, ja sigui perquè estan en formació o bé en degradació, en nombre més o menys elevat segons els estadis predominants de maduració gonadal. El que sí que varia són les talles màximes obtingudes entre els diferents mesos.

S'observen oòcits pedunculats des de moments previs a la maduració de les gònades fins a la degradació de les estructures reproductives, i mesuren des de 35 µm fins a 171,34 µm.

Els espermatozoides madurs, que mesuren 5,6 ± 0,4 µm de longitud de la punta de l'acrosoma a l'inici del flagel, s'estructuren en un acrosoma en forma de con, un nucli allargat, una curta peça intermèdia i un únic flagel final. La peça intermèdia es compon d'un anell de cinc mitocondris esfèrics (figura 3).

La maduració de les gònades masculines presenta força sincronia amb les femenines amb l'excepció del mes de setembre de 2005. En aquest mes, un elevat nombre de mascles presenten estadis de formació de nova gònada (estadis 1 i 2), fet que es contraposa



**Figura 2** Freqüència relativa dels diferents estadis del cicle gonadal de *C. chione* durant el període d'estudi.

amb les femelles (estadis de posta i degradació). Això tendeix a equiparar-se el mes d'octubre de 2005 i, finalment, queda en sincronia el mes de novembre de 2005.

### **Talla de la primera maduració**

La talla de la primer maduració s'estima en 30 mm. La talla de maduració massiva, en la qual el 95 % dels individus estan madurs, s'estableix en 51 mm.

## **DISCUSSIÓ I CONCLUSIÓ**

L'estudi del cicle gonadal de *C. chione* al litoral català mostra que pot reproduir-se al llarg de tot l'any. Cal esmentar que per a les talles analitzades, entre els 31 i els 95 mm de longitud, tots els individus eren adults (Metaxatos, 2004). Els dos períodes principals de posta que s'observen són des de finals d'hivern fins a la primavera i a la tardor. El primer període de posta és el més important a causa de la gran quantitat d'individus que es troben emetent les seves gàmetes madures a l'exterior. Aquests resultats difereixen amb els pocs estudis realitzats anteriorment a la mar Mediterrània. Tirado *et al.* (2002) afirmen que l'espècie pot reproduir-se al llarg de tot l'any al litoral de Màlaga però que el període principal de posta es dona a la primavera. A diferència del present estudi, l'emissió de gàmetes predomina entre febrer i juny, sense trobar postes gaire abundants a la tardor ni a l'hivern. Per altra banda, Valli *et al.* (1983-1984, 1994) troben postes al golf de Trieste (Itàlia) entre març i setembre, sense observar cap posta la resta de l'any.

Diverses espècies de bivalves tenen la característica de presentar dos estadis diferents de maduració en un mateix individu (Tirado *et al.*, 2002). En el nostre estudi, aquest fenomen només s'ha observat en fe-

melles i no en mascles, i també s'ha vist per a altres espècies de bivalves venèrids (Manzi *et al.*, 1985). Això podria ser una característica de la població estudiada i es podria explicar com una adaptació a incrementar el temps de fecundació de les femelles; així, les femelles podrien cobrir un ampli període de temps en el qual els mascles alliberarien, tard o d'hora, els seus espermatozoides. En el mesos en què s'han observat gònades amb dos estadis diferents, de gener a març de 2005 i octubre de 2005, la majoria de mascles presentaven gònades madures. Així, les femelles ja tindrien oòcits madurs a l'aigua que esperarien la fertilització dels espermatozoides quan aquests s'alliberessin i alhora fabricarien nous oòcits per assegurar tenir-ne de madurs en continu i seguir alliberant-los.

S'observa una concordança entre el cicle gonadal de l'espècie i la mida dels oòcits de les femelles. Els oòcits madurs tenen un rang de talles de 60-90 µm de longitud, a diferència del que va trobar Metaxatos (2004), que mesuraven de 95 a 120 µm. Aquesta diferència pot ser deguda al fet que Metaxatos examina frotis gonadals en lloc de talls histològics.

Les talles mínimes dels oòcits són similars al llarg del cicle estudiat a causa de la coexistència de diferents estadis gonadals en els mateixos mesos al llarg de tot l'any, i per això generalment se'n troben de petits, en més o menys quantitat, bé sigui per la nova formació d'aquests o bé per la seva degradació. Les talles màximes, però, són més variables, i la majoria corresponen a oòcits pedunculats.

El cicle gonadal presenta una sincronia entre les gònades masculines i femenines amb l'excepció del mes de setembre de 2005, en què les gònades femenines presenten estadis d'alliberació i sobretot degradació d'oòcits, mentre que les masculines presenten els primers estadis de maduració. Això no té un efecte especial en el cicle reproductiu de l'espècie, ja que la sincronia queda restablerta el mes de novembre de 2005, abans de la posta principal, de manera que durant les postes la sincronia entre sexes és total.

Les observacions de microscòpia de rastreig realitzades coincideixen amb els resultats obtinguts per Nicotra i Zappata (1991) a excepció de la longitud del cap de l'espermatozoide, que en el nostre cas és de  $5,6 \pm 0,4$  µm, i no de 4 µm.

## **AGRAÏMENTS**

Aquest estudi ha estat possible gràcies a la Direcció General de Pesca i Afers Marítims de la Generalitat de Catalunya.



**Figura 3** Espermatozoides de *Callista chione*.

També cal agrair Francesc Padrós i la Cooperativa de Petxinaires d'Arenys de Mar per la col·laboració.

## BIBLIOGRAFIA

- CALVÍN CALVO, J. C. (1995). *El ecosistema marino Mediterráneo, guía de su flora y fauna*. Murcia: J. Carlos Calvín.
- MANZI, J. J.; BOBO, M. Y.; BURRELL, V. G. J. (1985). «Gametogenesis in a population of the hard clam, *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus), in North Santee Bay, South Carolina». *The Veliger*, 28: 186-194.
- METAXATOS, A. (2004). «Population dynamics of the venerid bivalve *Callista chione* (L.) in a coastal area of the eastern Mediterranean». *Journal of Sea Research*, 52: 293-305.
- NICOTRA, A.; ZAPPATA, S. (1991). «Ultrastructure of the mature sperm and spermiogenesis in *Callista chione* (Mollusca, Bivalvia)». *Invertebrate Reproduction and Development*, 20: 213-218.
- PÉREZ CAMACHO, A.; ROMÁN, G. (1987). *Reproducción en acuicultura*. CAICYT (Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica). Madrid: J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta.
- TIRADO, C.; SALAS, C.; LÓPEZ, I. (2002). «Reproduction of *Callista chione* L., 1758 (Bivalvia: Veneridae) in the littoral of Málaga (souther Spain)». *Journal of Shellfish Research*, 21: 643-648.
- VALLI, G.; BIDOLI, E.; MARUSSI, C. (1983-1984). «Preliminary observations on reproduction and biometry in *Callista chione* (L.) (Mollusca, Bivalvia) of the Gulf of Trieste». *Nova Thalassia*, 6: 97-103.
- VALLI, G.; MARSICH, N.; MARSICH, M. (1994). «Riproduzione, biometria e contenuto di metalli in *Callista chione* (L.) (Mollusca, Bivalvia) del Golfo di Trieste nel corso di un ciclo annuale». *Bolletino della Società Adriatica di Scienze*, 75, 441-464.





## ENUCLEACIÓ QUÍMICAMENT INDUÏDA D'OÒCITS DE RATOLÍ PER A L'APLICACIÓ EN PROTOCOLS DE TRANSFERÈNCIA NUCLEAR

Nuno Costa-Borges, Sheyla González, Josep Santaló, Elena Ibáñez\*

Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona  
08193 Bellaterra. elena.ibanez@uab.cat.

---

### Resum

L'antimitòtic colcemid ha estat usat prèviament per a l'enucleació d'oòcits de ratolí i boví en protocols de transferència nuclear. En aquest estudi es pretén explorar, a part del colcemid (COLC), el potencial d'altres agents antimitòtics, com el nocodazole (NOC) i la vinblastina (VIN), per a l'enucleació induïda d'oòcits preactivats de ratolí de dues soques diferents (CD-1 i B6CBAF1). L'exposició a l'antimitòtic no va afectar les taxes d'activació dels oòcits, però els tractaments amb COLC o VIN van tenir un efecte inhibitori en les taxes d'extrusió del segon corpuscle polar (CP). Les taxes d'enucleació van ser significativament diferents segons la soca d'oòcits emprada, i les més elevades es van aconseguir en els oòcits CD-1 quan, després d'activats, es van tractar amb VIN (63,8 %) o NOC (41,9 %) durant 15 min, o amb COLC (66,1 %) durant 30 min i, tot seguit, es van cultivar en medi sense antimitòtic fins a les 2 h postactivació (p.a.). Prolongant el temps de cultiu en medi sense antimitòtic, el percentatge d'oòcits enucleats va disminuir significativament i de manera similar en tots els tractaments a les 6 h (20,3-34,9 %) i a les 20 h (10,2-16,1 %) p.a. Aquesta disminució podria ser deguda a la reintegració dels cromosomes a dins de l'oòcit després d'una extrusió incompleta del segon CP, o a la refusió del segon CP amb l'oòcit enucleat. Els resultats demostren que, a més del COLC, també la VIN i el NOC poden ser emprats amb èxit en la preparació d'oòcits enucleats de ratolí, però es recomana l'eliminació del segon CP a les 2 h p.a. per tal d'obtenir una enucleació irreversible de l'oòcit.

**Paraules clau** enucleació induïda, antimitòtics, oòcits.

### Abstract

Colcemid has been previously used to prepare enucleated mouse and bovine oocytes for nuclear transfer procedures. This study was designed to explore the potential of other antimitotic drugs, nocodazole (NOC) and vinblastine (VIN), besides colcemid (COLC), to induce enucleation in two strains of pre-activated mouse oocytes (CD-1 and B6CBAF1). Exposure to the antimitotic did not affect rates of oocyte activation, but treatments with COLC or VIN had an inhibitory effect in second polar body (PB) extrusion. The rates of oocyte enucleation differed significantly in a strain-specific manner, and the highest results were achieved in CD-1 oocytes when they were pre-activated and treated with VIN (63.8 %) or NOC (41.9 %) for 15 min or with COLC (66.1 %) for 30min, and then cultured in drug-free medium for up to 2 h post-activation (p.a.). Further culture of oocytes after drug withdrawal resulted in a significant and similar decrease in enucleation rates for all treatments by 6 h (20.3-34.9 %) and 20 h p.a. (10.2-16.1 %). This decrease might be caused by the reintegration of the chromosomes into the oocyte after incomplete second PB extrusion, or by re-fusion of the second PB to the enucleated oocyte. Our results show that both VIN and NOC, in addition to COLC, can be successfully applied to produce enucleated mouse cytoplasts. However, removal of the second PB at 2 h p.a. is recommended in order to achieve an irreversible oocyte enucleation.

**Key words** induced enucleation, antimitotics, oocytes.

---

## INTRODUCCIÓ

En l'última dècada, animals de diferents espècies de mamífer han estat clonats mitjançant la tècnica de transferència nuclear de cèl·lules somàtiques (SCNT), però les taxes d'èxit continuen essent molt

baixes (<5 %; Campbell *et al.*, 2005). L'enucleació de l'oòcit receptor és un pas determinant d'aquesta tècnica a causa de la importància de l'oòcit enucleat (citoplast) en la correcta reprogramació del nucli transferit i en el posterior desenvolupament de l'embrió reconstruït. En els protocols habituals de SCNT,

**Taula 1** Comparació de les taxes d'enucleació total i parcial entre els oòcits de les soques B6CBAF-1 i CD-1.

Tractament	Soca	n	OÒCITS		
			NO ENUCLEATS % (n)	PARCIALMENT ENUCLEATS % (n)	ENUCLEATS % (n)
CONTROL	B6CBAF1	56	91,1 % (51) <sup>a</sup>	5,3 % (3) <sup>a</sup>	3,6 % (2) <sup>a</sup>
	CD-1	51	98 % (50) <sup>a</sup>	0 % (0) <sup>a</sup>	2 % (1) <sup>a</sup>
COLC 30'	B6CBAF1	62	59,7 % (37) <sup>a</sup>	29 % (18) <sup>a</sup>	11,3 % (7) <sup>a</sup>
	CD-1	56	33,9 % (19) <sup>b</sup>	19,7 % (11) <sup>a</sup>	46,4 % (26) <sup>b</sup>
NOC 15'	B6CBAF1	61	86,8 % (53) <sup>a</sup>	4,9 % (3) <sup>a</sup>	8,2 % (5) <sup>a</sup>
	CD-1	62	58,1 % (36) <sup>b</sup>	4,8 % (3) <sup>a</sup>	37,1 % (23) <sup>b</sup>
VIN 15'	B6CBAF1	55	69,1 % (38) <sup>a</sup>	21,8 % (12) <sup>a</sup>	9,1 % (5) <sup>a</sup>
	CD-1	58	36,2 % (21) <sup>b</sup>	15,5 % (9) <sup>a</sup>	48,3 % (28) <sup>b</sup>

**Taula 2** Comparació de les taxes d'extrusió del segon corpuscle polar (2 CP) entre els oòcits de les soques B6CBAF-1 i CD-1 a les 2 h postactivació.

Tractament	Soca	n	OÒCITS	
			SENSE 2 CP o PARCIALMENT EXTRUÏT % (n)	AMB 2 CP COMPLETAMENT EXTRUÏT % (n)
CONTROL	B6CBAF1	56	16,1 % (9)	83,9 % (47) <sup>a</sup>
	CD-1	51	3,9 % (2)	96,1 % (49) <sup>a</sup>
COLC 30'	B6CBAF1	62	37,1 % (23)	62,9 % (39) <sup>a</sup>
	CD-1	56	28,5 % (16)	71,5 % (40) <sup>a</sup>
NOC 15'	B6CBAF1	61	11,5 % (7)	88,5 % (54) <sup>a</sup>
	CD-1	62	6,4 % (4)	93,6 % (58) <sup>a</sup>
VIN 15'	B6CBAF1	55	45,4 % (25)	54,6 % (30) <sup>a</sup>
	CD-1	58	20,7 % (12)	79,3 % (46) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Els superíndexs indiquen diferències estadísticament significatives ( $p < 0,05$ ) entre les dues soques de ratolí per a cadascun dels tractaments.

s'utilitzen oòcits en metafase II per a la preparació dels citoplasts, que són enucleats aspirant la placa metafàsica mitjançant tècniques de micromanipulació (enucleació mecànica). Malgrat que aquest és un mètode molt eficient pel que fa a les taxes d'enucleació, tècnicament és un procediment invasiu i traumàtic per a l'oòcit. A més, l'enucleació no tan sols comporta l'eliminació dels cromosomes de l'oòcit, sinó també del fus meiótic i d'una porció significativa de volum citoplasmàtic on hi ha factors moleculars importants per a la posterior activació de l'oòcit reconstruït i per als primers estadis del desenvolupament embrionari (Wakayama i Yanagimachi, 1998). D'altra banda, tot i que el fus meiótic es pot intuir en el citoplasma dels oòcits d'algunes soques de ratolí amb sistemes òptics de Nomarski o Hoffman

(Wakayama *et al.*, 1998), pel que fa als oòcits de la majoria d'espècies d'interès ramader és necessari tenyir-los amb Hoechst 33342 i irradiar-los amb llum ultraviolada (UV) per a localitzar la cromatina abans de dur a terme l'enucleació. La irradiació UV, malgrat que és breu, pot comprometre també la capacitat de desenvolupament d'aquests oòcits enucleats mecànicament (Smith, 1993).

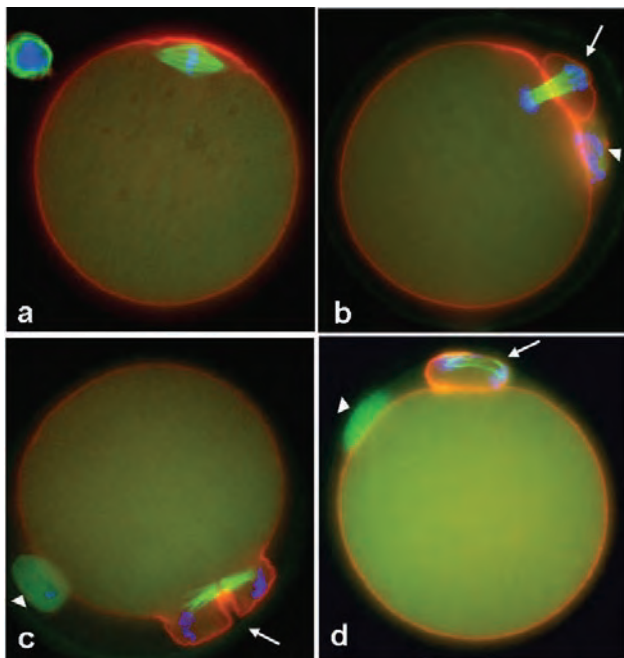
Amb l'objectiu de millorar i simplificar el protocol d'enucleació dels oòcits, s'han desenvolupat diverses alternatives (revisat en Fulka *et al.*, 2004 i Li *et al.*, 2004). Una de les més atractives és l'enucleació químicament induïda, basada en el tractament d'oòcits prèviament activats amb agents antimitoètics. Com a resultat d'aquest tractament la progressió meiótica normal de l'oòcit es veu alterada, i tota la

cromatina és expulsada en el segon corpuscle polar (CP), i això dona lloc a un òocit enucleat, amb una pèrdua mínima de citoplasma i sense necessitat d'aplicar tècniques de micromanipulació (Ibáñez *et al.*, 2003). L'eficiència d'aquest tractament ha estat demostrada amb l'obtenció de ratolins clonats a partir de la reconstrucció per transferència nuclear de citoplasts preparats mitjançant enucleació químicament induïda fent servir l'antimitòtic colcemid (Baguisi i Overström, 2000; Gasparrini *et al.*, 2003).

L'objectiu principal d'aquest treball és explorar, a part del colcemid, el potencial d'altres agents antimítotics com el nocodazole i la vinblastina per a induir l'enucleació d'òocits de ratolí. Tenint en compte els treballs previs realitzats amb el colcemid, en què s'observava un clar efecte del fons genètic de l'òocit en les taxes d'enucleació (Ibáñez *et al.*, 2003), aquest estudi s'ha dut a terme utilitzant òocits de dues soques diferents de ratolins (CD-1 i B6CBAF1).

## MATERIAL I MÈTODES

Els procediments experimentals descrits han estat aprovats per la Comissió d'Ètica en l'Experimenta-



**Figura 1** Òocits de ratolí de la soca CD-1. a) Òocit control en metafase II, no activat ni tractat amb antimítotíc. b) Òocit activat control, no tractat amb antimítotíc, fixat a les 2 h p.a. i que presenta un segon CP completament expulsat. c) Òocit tractat amb antimítotíc i parcialment enucleat, amb un doble segon CP no expulsat completament. d) Òocit tractat amb antimítotíc i enucleat, amb una extrusió completa del segon CP. Els caps de les fletxes indiquen el primer CP, i les fletxes el segon CP.

ció Animal i Humana (CEEAH) de la Universitat Autònoma de Barcelona.

### Obtenció dels òocits

Els òocits es van obtenir de femelles de ratolí (6-12 setmanes d'edat) de la soca no consanguínia CD-1 i de la soca híbrida B6CBAF1 (C57BL/6JxCBA/J). Les femelles van ser superovulades mitjançant la injecció intraperitoneal de 5 UI de PMSG seguida de 5 UI d'hCG 48 h més tard. Els òocits en metafase II es van recuperar de l'oviducte a les 16 h post-hCG i, després d'un breu tractament amb hialuronidasa (156 U/ml) i dos rentats en medi mKSOM-H (Biggers *et al.*, 2000), es van processar tal com es descriu a continuació.

### Activació partenogenètica dels òocits i tractament antimítotíc

Els òocits es van activar en etanol 7 % durant 5 min. Immediatament després, els òocits de ratolí de la soca CD-1 es van tractar amb colcemid (COLC; 0,4 µg/ml), nocodazole (NOC; 0,3 µg/ml) o vinblastina (VIN; 0,1 µg/ml) durant 15, 30 o 60 min a 37° C i 5 % de CO<sub>2</sub> en medi de cultiu KSOM (Biggers *et al.*, 2000) sense calci i amb 10 mM de clorur d'estronci. Finalitzat el temps de tractament, els òocits es van rentar i es van cultivar en el medi amb estronci sense antimítotíc fins a les 2 h postactivació (p.a.) i, en cas dels millors tractaments, fins a les 6 h o 20 h p.a. (es considera com temps 0 p.a. el moment en què els òocits s'exposen a l'etanol).

Els òocits B6CBAF1 es van sotmetre únicament als tractaments que van resultar més efectius en la soca CD-1 pel que respecta a les taxes d'enucleació a les 2 h p.a.: COLC (0,4 µg/ml) durant 30 min; NOC (0,3 µg/ml) i VIN (0,1 µg/ml) durant 15 min.

### Fixació dels òocits i anàlisi per immunofluorescència

Els òocits es van fixar a les 2, 6 o 20 h p.a. mitjançant la incubació durant 30 min a 37° C en *microtubule stabilizing buffer* (MTSB-XF) (Messinger i Albertini, 1991), i van ser guardats a 4° C en *blocking solution* (Wickramasinghe i Albertini, 1992). Posteriorment els òocits 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 (Costa-Borges *et al.*, 2006). L'observació i anàlisi dels òocits es va dur a terme en un microscopi d'epifluorescència equipat amb filtres específics i un sistema de captura d'imatges.

### Anàlisi estadística

Tots els tractaments es van repetir almenys tres vegades i es van analitzar aproximadament 50 oòcits per grup. Els resultats obtinguts es van analitzar mitjançant el test de *chi-quadrat* ( $\chi^2$ ) o el test exacte de Fisher. Valors de  $P < 0,05$  es van considerar estadísticament significatius.

## RESULTATS

Els oòcits que tenien la totalitat de la cromatina a dins del segon CP es van classificar com a enucleats o parcialment enucleats, en funció de si l'extrusió del segon CP era completa o incompleta, respectivament (figura 1). Les taxes més altes d'enucleació es van obtenir per als oòcits preactivats de la soca CD-1 que es van tractar amb VIN (63,6 %) o NOC (41,9 %) durant 15 min o amb COLC (66,1 %) durant 30 min i, tot seguit, es van cultivar en medi sense antimetabòlic fins a les 2 h p.a. (figura 2), el temps necessari perquè els oòcits de ratolí expulsin el segon CP (Ibáñez *et al.*, 2005). El percentatge total d'oòcits enucleats respecte al total d'oòcits activats en aquesta soca va resultar significativament superior al que es va obtenir en els oòcits B6CBAF1 per als mateixos tractaments (taula 1). El tractament amb els antimetabòlics no va afectar les taxes d'activació dels oòcits de cap de les dues soques (91,8-100 % CD-1 i 89,9-96,8 % B6CBAF1), però, en canvi, un percentatge significatiu dels oòcits tractats amb COLC (28,5 % i 37,1 %) o amb VIN (20,7 % i 45,4 %) no va mostrar una extrusió completa del segon CP. Aquest efecte no es va observar ni en el

grup control (3,9 % i 16,1 %) ni en el de NOC (6,4 % i 11,6 %) (taula 2).

En allargar el temps de cultiu dels oòcits CD-1 en medi sense antimetabòlic fins a les 6 o les 20 h p.a. les taxes d'enucleació van disminuir significativament i de manera similar per a tots els grups (20,3-37,7 % a les 6 h p.a. i 10,2-16,1 % a les 20 h p.a.), en comparació amb les obtingudes per als mateixos tractaments a les 2 h p.a. (figura 2). Gairebé cap dels oòcits analitzats en aquests grups presentava un segon CP parcialment extruït.

## DISCUSSIÓ

En els treballs previs amb colcemid en oòcits de ratolí i de vaca, s'havia demostrat que l'eficiència de la tècnica d'enucleació induïda depenia del temps d'exposició dels oòcits a l'antimetabòlic i del moment en què s'inicia el tractament després de l'activació (Ibáñez *et al.*, 2003; Fischer-Russell *et al.*, 2005). En ratolí, els millors resultats es van obtenir quan els tractaments s'iniciaven immediatament després de l'activació. També es va concloure que la progressió meiòtica dels oòcits activats no és interrompuda pel tractament amb colcemid, però les taxes d'enucleació són limitades per l'efecte inhibitori d'aquest en l'extrusió completa del segon CP (Ibáñez *et al.*, 2003). En aquest treball demostrem com, a part del colcemid, també la vinblastina sembla tenir un efecte inhibitori en l'extrusió completa del segon CP en oòcits de ratolí. Malgrat tot, aquests dos antimetabòlics, juntament amb el nocodazole, poden ser aplicats amb èxit en la preparació de citoplasts enucleats de ratolí. L'eficiència dels tractaments emprats depèn

**Figura 2** Comparació de les taxes d'enucleació respecte al total d'oòcits CD-1 activats entre els diferents tractaments antimetabòlics a les 2 h, 6 h i 20 h postactivació. Les diferents lletres en la part superior de les columnes indiquen diferències estadísticament significatives ( $P < 0,05$ ) entre tractaments pel que respecta al total d'oòcits enucleats.

de la soca d'òcits utilitzada, tal i com s'havia demostrat prèviament amb el colcemid (Ibáñez *et al.*, 2003). Les taxes màximes d'enucleació obtingudes a les 2 h p.a. per a la soca CD-1 (66,1 %-41,9 %) van ser estadísticament superiors a les obtingudes per a la soca B6CBAF1 i força superiors a les màximes descrites en estudis previs amb el colcemid per a oòcits de ratolí de la soca no consanguínia CF-1 (20 %; Ibáñez *et al.*, 2003). La disminució significativa en el nombre d'òcits CD-1 enucleats a les 6 i 20 h p.a. en comparació amb les 2 h p.a. podria ser deguda a una possible reintegració dels cromosomes en l'òocit després d'una extrusió incompleta del segon CP, o a la refusió del segon CP amb l'òocit enucleat durant el període d'incubació dels oòcits en el medi sense antimitòtic. Per aquest motiu, es recomana l'eliminació mecànica del segon CP a les 2 h p.a. per tal d'asolir l'enucleació irreversible dels oòcits.

Per finalitzar, cal apuntar que la competència dels citoplasts preparats amb aquest mètode no es pot assegurar fins al moment que aquests siguin reconstruïts per transferència nuclear i puguin garantir el correcte desenvolupament de l'embrió clonat. De tota manera, el naixement de ratolins clonats a partir de la reconstrucció per SCNT d'òcits enucleats químicament amb colcemid (Baguisi i Overström, 2000; Gasparini *et al.*, 2003) demostra que el tractament dels oòcits receptors amb aquest agent antimitòtic no és incompatible amb la seva viabilitat.

## AGRAÏMENTS

Els autors agraeixen a Jonatan Lucas i a Marc Puigcerver el suport tècnic. Aquest treball ha estat finançat pels projectes MEC BIO 2006-11792; DGR 2004-XT00054 i 2005-SGR00437, i també parcialment per la *Fundação para a Ciência e Tecnologia* de Portugal (SFRH/BD/31263/2006).

## 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.
- CAMPBELL, K. H.; ALBERIO, R.; CHOI, I. [et al.] (2005). «Cloning: eight years after Dolly». *Reprod. Domest. Anim.*, 40: 256-268.
- COSTA-BORGES, N.; SANTALÓ, J.; IBÁÑEZ, E. (2006). «Preparación de citoplastos receptores para transferencia nuclear mediante enucleación química de ovocitos». *Rev. Iberoam. Fertil. Reprod. Hum.*, 23(3): 163-172.
- FISCHER-RUSSELL, D.; IBÁÑEZ, E.; ALBERTINI, D. F. [et al.] (2005). «Activated bovine cytoplasts prepared by demecolcine-induced enucleation support development of nuclear transfer embryos in vitro». *Mol. Reprod. Dev.*, 72: 161-170.
- FULKA, J. JR.; LOI, P.; FULKA, H.; PTAK, G. [et al.] (2004). «Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts». *Trends Biotechnol.*, 22: 279-283.
- GASPARRINI, B.; GAO, S.; AINSLIE, A. [et al.] (2003). «Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation». *Biol. Reprod.*, 68: 1259-1266.
- 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.
- IBÁÑEZ, E.; ALBERTINI, D. F.; OVERSTRÖM, E. W. (2005). «Effect of genetic background and activating stimulus on the timing of meiotic cell cycle progression in parthenogenetically activated mouse oocytes». *Reproduction*, 129: 27-38.
- 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.
- WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R. (1998). «Fertilisability and developmental ability of mouse oocytes with reduced amounts of cytoplasm». *Zygote*, 6: 341-346.
- WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C.; ZUCCOTTI, M. [et al.] (1998). «Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei». *Nature*, 394: 369-374.
- WICKRAMASINGHE, D.; ALBERTINI, D. F. (1992). «Centrosome phosphorylation and the developmental expression of meiotic competence in mouse oocytes». *Dev. Biol.*, 152: 62-74.



## DERIVACIÓ DE LÍNIES DE CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES HUMANES: ENVERS EL CULTIU EN CONDICIONS LLIURES DE XENOBIÒTICS I EN CONDICIONS QUÍMICAMENT DEFINIDES

I. Rodríguez,<sup>1\*</sup> A. Raya,<sup>1</sup> B. Aran,<sup>1</sup> A. Consiglio,<sup>1</sup> Y Muñoz,<sup>1</sup> A. Veiga,<sup>1,2</sup> J. C. Izpisua<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Banc de línies cel·lulars, Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMR[B])

Dr Aiguader, 88, 4a. 08003 Barcelona. [irodriguez@cmrb.eu](mailto:irodriguez@cmrb.eu).

<sup>2</sup> Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus

<sup>3</sup> Salk Institute. La Jolla, EUA

---

### Resum

Les cèl·lules mare embrionàries humanes (hESC) són una font potencial per a la curació de moltes malalties conseqüència d'un dèficit de funció cel·lular. Per a ser acceptades per a la seva utilització clínica són necessàries unes condicions de cultiu lliures de xenobiòtics i sota condicions de *good manufacturing practices* (GMP). Aquí presentem les nostres dades actuals de derivacions de línies de hESC i de la caracterització inicial dels protocols dels medis *xenobiotic-free* i químicament definit per la propagació de hESC. En concret, presentem la derivació de cinc noves línies de hESC. A més a més, proposem que el plasma humà i els seus derivats poden ser una bona alternativa als derivats de sèrum animal extensament utilitzats i que el medi químicament definit N2-B27 prèviament caracteritzat pot mantenir el cultiu de les nostres línies de hESC. Finalment, presentem evidències que la laminina, la fibronectina i el col·lagen IV humans són tres possibles alternatives per a mantenir aquest cultiu evitant l'ús de cèl·lules de suport.

**Paraules clau** Cèl·lules mare embrionàries, *xenobiotic-free*, derivació, condicions definides.

### Abstract

Human embryonic stem cells (hESC) represent a potential source for the cure of many loss-of-function cellular diseases. However, if hESC are to be used in clinical applications, their derivation and culture should be carried out under xenobiotic-free and good manufacturing practice conditions. Here we present our current data on derivation of hESC lines and on the initial characterization of protocols for both xenobiotic-free and chemically-defined media for hESC propagation. Specifically, we present the derivation of five new hESC lines. In addition, we show that human plasma and its derivatives may be good alternatives to the widely used animal-derived serum products and that the previously characterized chemically-defined medium N2-B27 supports the propagation of our hESC lines. Finally, we present evidence showing that human laminin, fibronectin and collagen IV may be valid alternatives to feeder cells for hESC culture.

---

## INTRODUCCIÓ

Les cèl·lules mare embrionàries humanes han esdevingut una revolució científica els últims anys a causa de la seva capacitat potencial de formar qualsevol tipus cel·lular del organisme. Moltes malalties produïdes per un dèficit de funció cel·lular tenen amb les hESC una porta oberta a la curació (Thomson *et al.*, 1998).

Tot i això, la seva aplicació en teràpia clínica requereix unes condicions de cultiu concretes per tal d'evitar riscos potencials alhora que un rebuig immunitari addicional o la possible transmissió de malalti-

es de qualsevol origen. La derivació i el cultiu tradicional de hESC inclou l'ús de productes d'origen animal, tal com el KO-Serum Replacement, la gelatina i la pronasa. Publicacions recents descriuen possibles noves fonts de proteïna humana que permeten substituir les d'origen boví (Amit *et al.*, 2004; Genbacev *et al.*, 2005), i alternatives a l'ús de pronasa o gelatina durant la derivació i cultiu de les línies (Klimanskaya *et al.*, 2005; Elleström *et al.*, 2006).

Una vegada s'aconsegueixen eliminar els xenobiòtics del cultiu de les hESC, el següent pas és aconseguir derivar una línia en aquestes condicions de cultiu i sota condicions de treball de *good manufac-*



*turing practice* (GMP), per tal de possibilitar la seva futura utilització en teràpia clínica.

Per una altra banda, la tendència dels laboratoris de recerca en hESC es mantenen les cèl·lules en unes condicions de cultiu el més definides possible (Lu *et al.*, 2006; Ludwig *et al.*, 2006; Shuyuan Yao *et al.*, 2006). D'aquesta manera es pot mantenir un control absolut sobre els factors que les mantenen indiferenciades i, per tant, quins són els factors que, afegits al medi, poden induir una diferenciació dirigida envers una estirp celular en concret.

## MATERIAL I MÈTODES

### Derivació i cultiu

Els embrions, procedents de cicles de fecundació *in vitro*, van ser donats per les parelles progenitores després de cinc o més anys d'emmagatzement en nitrogen líquid, un cop obtingut el seu consentiment informat, l'aprovació del comitè ètic de l'Institut Universitari Dexeus, l'aprovació de l'Institut de Salut Carlos III i del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya.

Després de la descongelació, els embrions van ser cultivats fins l'estadi de blastocist. La zona pellúcida es va eliminar incubant els embrions amb pronasa o Acid Tyrode's, segons el cas. Els embrions sense zona van ser transferits a plaques d'un pou central amb gelatina (Cambrex) sobre una monocapa de *human foreskin fibroblasts* (HFF) irradiats a 37° C i 5 % CO<sub>2</sub> en medi hES (hESm: Knockout Dulbecco's modified Eagle's KO-DMEM) suplementat amb 2 mmol/l GlutaMAX (Gibco, InVitrogen corporation), 0,05 mmol/l 2-mercaptoetanol (Gibco, InVitrogen corporation), 8 ng/ml *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (Invitrogen), 1 % *non-essential amino*

*acids* (Cambrex), 20 % *knockout serum replacement* (InVitrogen), 50 u/ml de penicillina i 50 µg/ml d'estreptomicina (ambdues de Gibco, InVitrogen corporation). El medi es va reemplaçar diàriament a partir del tercer dia de cultiu.

Les HFF van ser cultivades amb *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) (InVitrogen) suplementat amb 10 % de sèrum fetal boví (FBS) (Gibco, InVitrogen corporation), 100 u/ml de penicillina i 100 µg/ml d'estreptomicina (ambdues de Gibco, InVitrogen corporation).

Les plaques es van controlar diàriament fins que es va veure un creixement de les cèl·lules de la massa celular interna (ICM) prou gran per a fer un *split* mecànic de la colònia inicial (figura 1). D'aquesta manera, cada 5-7 dies es van passar mecànicament les colònies en petits fragments a una placa amb una monocapa de HFF nova.

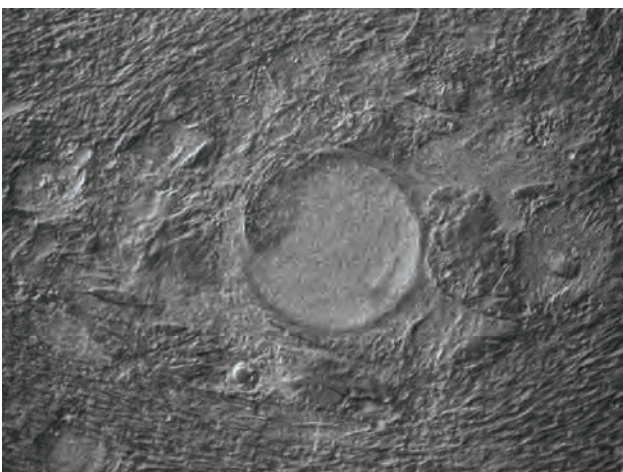
Les colònies van ser criopreservades periòdicament en petits fragments en criotubs (NUNC, Roskilde, Dinamarca) en 90 % FBS i 10 % DMSO (Sigma) a una taxa de refrigeració d'1° C/min i emmagatzemats en nitrogen líquid. Les cèl·lules van ser descongelades a 37° C i cultivades per a assegurar la seva capacitat de supervivència.

### Caracterització de les línies hESC

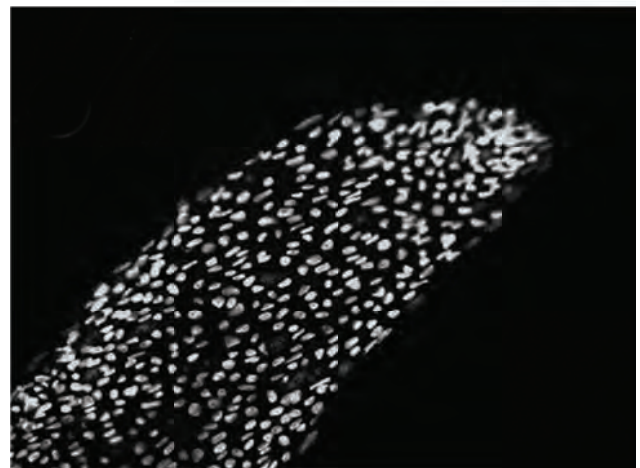
Es van realitzar cariotips mitjançant el mètode de *G-banding* analitzant 15 metafases després de cultivar les colònies 30 minuts amb 2 µl/ml de colcemid (Invitrogen).

L'activitat fosfatasa alcalina es va provar mitjançant el *kit* Alkaline Phosphatase Red Membrane Substrate Solution (Sigma) després de fixar les cèl·lules dos minuts amb paraformaldehid (PFA) al 4 % a temperatura ambient (TA).

Els marcadors de indiferenciació es varen posar de manifest mitjançant un test immunocitoquímic.



**Figura 1** Creixement de la ICM de l'ES[3] després de dotze dies en cultiu sobre una monocapa de HFF.



**Figura 2** Colònia de l'ES[2] positiva per Oct4.

Les colònies varen ser cultivades sobre *polystyrene slide flasks* (NUNC, Roskilde, Denmark) i fixades 5 minuts amb PFA 4 % a TA. Les colònies varen ser incubades amb els anticossos primaris per a *stage-specific embryonic antigen* (SSEA)-3, SSEA-4, *tumor-related antigen* TRA-1-60 i TRA-1-81, SOX-2 (Chemicon International, Inc., Temecula, CA), *octamer binding transcription factor-4* (OCT-4) (Santa Cruz Biotechnology, Califòrnia, EUA) i NANOG (Abcam, Cambridge, RU). A continuació, els portes van ser incubats dues hores a TA amb els anticossos secundaris Cy2 and Cy3 (Jackson Immuno Research, Suffolk, RU). Els anticossos primaris i secundaris varen ser diluïts 1:20 i 1:100, respectivament, excepte NANOG, que es va diluir 1:500.

L'antigen leucocitari humà (HLA) es va analitzar mitjançant la metodologia de tipificació basada en la seqüència amb el *kit* AlleleSEQR HLA Sequencing (Atria Genetics). Per l'estudi de microsatèl·lits es va realitzar una PCR *multiplex* de 9 microsatèl·lits o STR (*short tandem repeats*) més el gen de l'amelogenina (per a detectar el cromosoma Y), amb marcatge fluorescent amb el *kit* AmpliFISTR Profiler Plus (Applied Biosystems).

Per a la demostració de la pluripotencialitat *in vitro* es van generar *embryoid bodies* (EB) aixecant mecànicament colònies senceres de hESC i mantenint-les en suspensió 3-4 dies en hESM. A continuació es van cultivar sobre *slide flasks* amb gelatina durant 15-25 dies abans de fixar-les 15 minuts amb PFA al 4 %. Com a anticossos primaris es varen fer servir  $\alpha$ -actinina (SIGMA) com a marcador de mesoderm,  $\beta$ -tubulina (Covance) com a marcador de

ectoderm i  $\alpha$ -fetoproteïna (Dako) com a marcador d'endoderm.

La pluripotencialitat *in vivo* de les hESC es va demostrar mitjançant la injecció intramuscular d'aproximadament 1 milió de cèl·lules en ratolins amb una immunodeficiència severa combinada (SCID) per a induir la formació de teratomes. Després de dos mesos els ratolins van ser sacrificats i els teratomes desenvolupats van ser analitzats mitjançant tècniques d'histologia convencional i immunofluorescència.

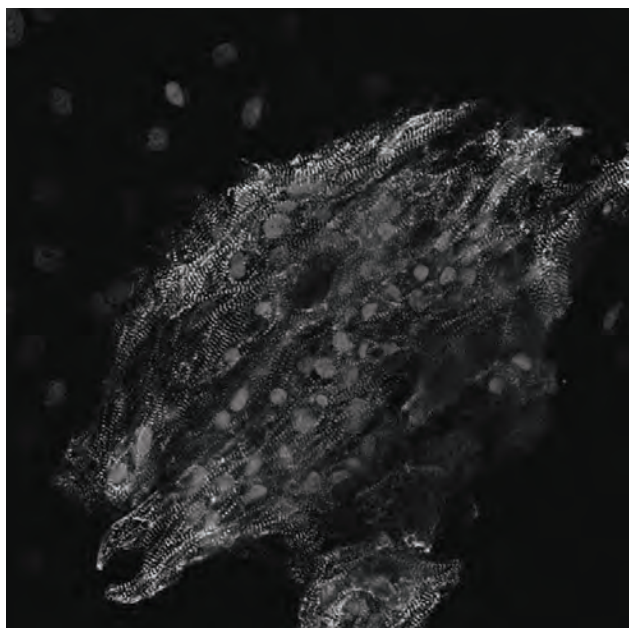
### Cultiu lliure de xenobiòtic

Es van testear quatre medis diferents de composició idèntica a l'hESM en els quals se substitueix el KO-Serum Replacement per plasma humà (HP) (Grifols) al 10 i al 20 % i per sobrenedant de crioprecipitat de plasma humà (SCP) (Grifols) al 10 i al 20 %.

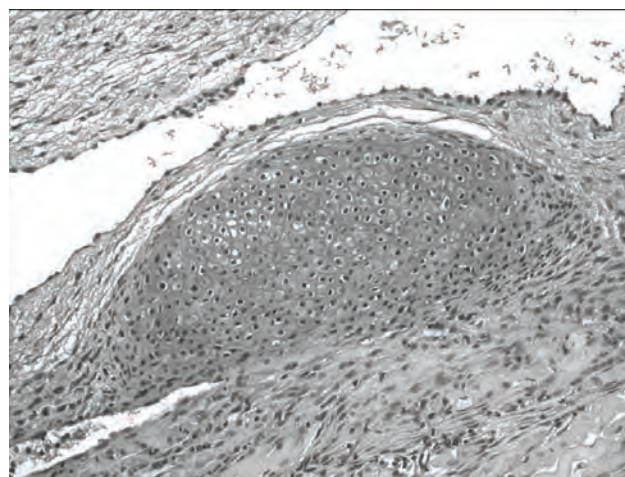
El medi es va anar canviant progressivament afegint un 25 % més de medi *xenofree* el tercer dia després de cada *split* fins arribar a un 100 % del medi propi de cada condició.

### Cultiu en condicions definides

Es van testear dos medis químicament definits. Un, el N2-B27, conté DMEM/F12, suplement N2 (1 $\times$ ) i B27 (1 $\times$ ) (ambdós de Gibco, InVitrogen corporation), Glutamax 2 mM, 2-mercaptoetanol 0,11 mM, NEAA (100 $\times$ ), bFGF 100  $\mu$ g/ml, 50 u/ml de penicil·lina i 50  $\mu$ g/ml d'estreptomicina (ambdues de Gibco, InVitrogen corporation). El segon medi testejat (N2-B27-LC) incorpora un suplement de *lipid concentrate* (Gibco, InVitrogen corporation). Les cèl·lules es cultiven originàriament en medi condicionat per



**Figura 3** Creixement diferenciat de ES[2] positiu per  $\alpha$ -actinina.



**Figura 4** Teixit condroide present en un teratoma procedent de la injecció de cèl·lules de l'ES[2] a ratolins SCID.



fibroblasts embrionaris murins (MEF) i es canvia a un 25 % addicional de medi definit a cada *split*.

Per una altra banda es van testejar matrius de proteïnes extracel·lulars humanes o sintètiques. Les matrius provades contenen laminina a 5 µg/cm<sup>2</sup> (Sigma), fibronectina a 5 µg/cm<sup>2</sup> (BD), collagen IV a 0,1-10 µg/cm<sup>2</sup> (BD), PuraMatrix (BD) i fibrina (Gri-fols) (Ludwig *et al.*, 2006).

## RESULTATS

En una sèrie es van descongelar sis blastocists dels quals quatre (66,7 %) van sobreviure i es van sembrar. D'aquests quatre van resultar dues línies de hESC: l'ES[2] i l'ES[3]. En una sèrie posterior es van descongelar 55 embrions en estadis primerencs (pronucleis o cèl·lules), dels quals 38 (69,1 %) van sobreviure i 13 (34,2 %) van arribar a blastocist. D'aquests 13, van resultar tres noves línies de hESC: ES[4], ES[5] i ES[6].

L'ES[2] i l'ES[3] procedeixen d'embrions d'una mateixa parella. Ambdues línies varen presentar un cariotip normal (46, XY). També van donar resultat positius per a tots els marcadors d'indiferenciació testejats: SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, Nanog, SOX2 i Oct4 (figura 2 i resultats no mostrats) i per a l'activitat fosfatasa alcalina. La tipificació HLA va ser idèntica i homozigòtica en les dues línies, mentre que l'anàlisi de microsatèl·lits mostrava una compatibilitat pròpia de línies germanes.

La diferenciació *in vitro* va posar de manifest la capacitat de les dues línies de formar teixits procedents de les tres capes germinals: mesoderm ( $\alpha$ -actina) (figura 3), ectoderm ( $\beta$ -tubulina) i endoderm ( $\alpha$ -fetoproteïna). Els teratomes resultants de la diferenciació *in vivo* estaven composts de teixits procedents de les tres capes germinals, tals com epiteli



**Figura 5** Colònies de l'ES[2] cultivades 1:1 HP (20%) / hESM.

respiratori, teixit condroide (figura 4) i acúmuls neuronals.

L'embrió del qual procedeix l'ES[4] va ser tractat amb pronasa, mentre que l'ES[5] i l'ES[6] van ser derivades prèvia eliminació de la zona pellúcida amb Acid Tyrode's, evitant d'aquesta manera la pronasa a les derivacions, un dels xenobiòtics d'ús freqüent. Les tres línies es troben actualment en procés de caracterització.

El cultiu en condicions lliures de xenobiòtics, amb els medis amb HP i SCP, mostren una clara tendència a la diferenciació. Tot i això, el cultiu amb HP i SCP (100 % de medi *xenofree*) permet mantenir les línies indiferenciades de manera continuada i amb una eficàcia suficient. En una anàlisi preliminar sembla que les cèl·lules cultivades en HP al 20 % (figura 5) són les que més tendeixen a la diferenciació, mentre que les cultivades en SCP al 10 % mostrarien la tendència més baixa.

El procés de test els nous medis definits es troba en les fases inicials. Actualment les cèl·lules estan sent cultivades en paral·lel amb N2-B27 i N2-B27-LC amb un 25 % de medi definit i un 75 % de medi condicionat i no s'observa cap alteració al cultiu.

Pel que fa a les matrius extracel·lulars, uns resultats molt preliminars mostren que la laminina, la fibronectina, el collagen IV i les seves combinacions ofereixen un suport acceptable al creixement de les hESC.

## CONCLUSIONS

La derivació de línies de hESC sobre HFF i el seu cultiu en presència de xenobiòtics és una tècnica ja descrita i reproducible en les condicions publicades. Tot i això, prèviament a la seva possible utilització clínica s'han d'aconseguir derivar i mantenir noves línies en condicions GMP i lliures de xenobiòtics.

L'eliminació de la gelatina del cultiu de les HFF, la substitució de la pronasa per Acid Tyrode's, la sembra del blastocist sencer o aïllar la ICM mecànicament per evitar la utilització d'anticossos i complement d'origen animal, i també la substitució del KO-SR per una font de sèrum humà són possibles i suposen el primer pas per a assolir una derivació en condicions lliures de xenobiòtics.

De les fonts humanes testejades, tant l'HP com l'SCP al 10 o al 20 % poden representar una font de proteïna acceptable per a substituir el KO-SR, però sembla que el SCP al 10 % és capaç de mantenir millor l'estat indiferenciat de les colònies. Una vegada es pugui mantenir amb èxit el cultiu de les actuals línies en aquestes condicions, serà possible plantejar

la derivació de noves línies de hESC en condicions totalment lliures de xenobiòtics.

Un altre objectiu important a assolir és el d'aconseguir cultivar les colònies de hESC en les condicions químicament més definides possibles per tal de poder controlar en tot moment quins són els factors que afecten la seva diferenciació o indiferenciació. Els medis definits N2-B27 i N2-B27-LC poden mantenir el cultiu indiferenciat de les hESC. Per una altra banda, sembla que la laminina, la fibronectina i el collagen són capaços de mantenir el cultiu de les hESC per si sols o combinant-los entre si.

## BIBLIOGRAFIA

- AMIT, M.; SHARIKI, C.; MARGULETS, V. [et al.] (2004). «Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells». *Biol. Reprod.*, 70: 837-845.
- ELLERSTRÖM, C.; STREGEL, R.; MOYA, K. [et al.] (2006). «Derivation of a Xeno-Free Human Embryonic Stem Cell Line». *Stem. Cells*, 24: 2170-2176.
- GENBACEV, O.; KRTOLICA, A.; ZDRAVKOVIC, T. [et al.] (2005). «Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders». *Fertil. Steril.*, 83: 1517-1529.
- KLIMANSKAYA, I.; CHUNG, Y.; MEISNER, L. [et al.] (2005). «Human embryonic stem cells derived without feeder cells». *Lancet*, 365: 1636-1641.
- LU, J.; HOU, R.; BOOTH, C. J. [et al.] (2006). «Defined culture conditions of human embryonic stem cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 103: 5688-5693.
- LUDWIG, T. E.; LEVENSTEIN, M. E.; JONES, J. M. [et al.] (2006). «Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions». *Nat. Biotechnol.*, 24: 185-187.
- SHUYUAN, Y.; SHUIBING, C.; ERGENG, H. [et al.] (2006). «Long term self-renewal and directed differentiations of human embryonic stem cells in chemically defined conditions». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 6907-6912.
- THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S. [et al.] (1998). «Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts». *Science*, 282: 1145-1147.



## DERIVACIÓ DE CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES A PARTIR DE BLASTÒMERS AÏLLATS DE RATOLÍ

S. González, E. Ibáñez, N. Costa-Borges, J. Santaló

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

08193 Bellaterra. Tel. 935 811 112. Fax 935 812 295. *Sheyla.Gonzalez@uab.cat, Elena.Ibanez@uab.cat,*  
*NunoLuis.Borges@uab.cat, Josep.Santaló@uab.cat.*

---

### Resum

La derivació de les cèl·lules mare embrionàries (ESC) s'ha fet tradicionalment a partir de la massa cel·lular interna (ICM) a l'estadi de blastocist, però aquest procés, a més de produir ESC que no són totipotents, té l'inconvenient que es destrueix l'embrió del qual procedeixen aquestes ESC. Al nostre estudi pretenem establir línies d'ESC a partir d'estadis previs a blastocist i a través de l'aïllament de blastòmers, ja que les cèl·lules resultants podrien ser totipotents i es contribuiria a resoldre la qüestió ètica de la destrucció dels embrions emprats. Per a portar a terme aquest objectiu es van fer servir embrions de ratolins provinents de l'encreuament SV129 × C57Bl i es van aïllar els blastòmers que constituïen els grups de 1/4, 2/4, 1/8, 2/8, 3/8, 4/8 i mòrula. L'estadi de blastocist es va fer servir com a control positiu. D'un total de 108 embrions es van aconseguir establir un total de 19 colònies d'ESC corresponents als grups de 1/4, 2/8, 3/8, 4/8, mòrula i blastocist. Amb aquest estudi s'ha arribat a determinar que tant l'estadi embrionari del qual procedeixen els blastòmers com el nombre de blastòmers aïllats tenen influència a l'hora d'establir línies d'ESC de ratolí.

**Paraules clau** ESC, ICM, blastocist, blastòmers, mòrula.

### Abstract

Embryonic stem cells (ESC) are typically derived from the inner cell mass (ICM) at the blastocyst stage but this process can not produce totipotent cells and destroys the embryos from which the ESC are derived. We have carried out a study to try to derive ESC from isolated blastomeres at preblastocyst stages because the resultant ESC may be totipotent and we could contribute to solve the ethical controversy of destroying embryos. SV129 × C57Bl F1 mouse embryos were used and blastomeres were removed constituting groups of 1/4, 2/4, 1/8, 2/8, 3/8, 4/8 and morula. Blastocyst stage was used as a positive control. A total of 19 ESC-colonies from the 1/4, 2/8, 3/8, 4/8, morula and blastocyst groups were derived out of 108 embryos. In our study we have determined that the embryonic stage and the number of isolated blastomeres have an influence in deriving mouse ESC.

**Key words** ESC, ICM, blastocyst, blastomeres, morula.

---

## INTRODUCCIÓ

L'interès creixent per obtenir línies d'ESC va fer que l'any 1981 dos grups d'investigadors independents desenvolupessin una tècnica per a establir un cultiu de cèl·lules pluripotencials a partir d'embrions de ratolí (Evans i Kaufman, 1981; Martin, 1981).

Les tècniques habituals d'establiment de línies d'ESC han fet servir la ICM de l'embrió a estadi de blastocist (Brook i Gardner, 1997). Posteriorment a aquesta pràctica habitual inicial es van començar a intentar establir línies a partir d'estadis embrionaris previs a blastocist (Delhaisie *et al.*, 1996; Eistetter *et*

*al.*, 1997; Tesar, 2005). Però, malgrat tot, encara es tenen poques dades sobre la possibilitat de desenvolupar ESC a partir de cèl·lules embrionàries aïllades procedents d'embrions en estadis previs a blastocist (Chung *et al.*, 2005; Klimanskaya *et al.*, 2006).

Per tal de contribuir a resoldre aquesta qüestió, el nostre estudi pretén determinar la influència de l'estadi embrionari i el nombre de cèl·lules aïllades a l'hora de derivar línies d'ESC. A través de diferents experiments, hem intentat establir línies d'ESC a partir de blastòmers aïllats d'estadis previs a blastocist. El fet d'emprar un nombre reduït de blastòmers de l'embrió també ens portarà a contribuir a resoldre

**Taula 1** Percentatge de colònies d'ESC tenint en compte la influència de l'estadi embrionari.

Estadi embrionari	Nombre grups	Total colònies ESC	% colònies / Nr. grups
4 cèl·lules	118	4	3,4
8 cèl·lules	108	7	6,5
mòrula	23	6	26,1
blastocist	17	2	11,8

**Taula 2** Percentatge de colònies d'ESC segons el nombre de blastòmers aïllats.

Grup	Nombre grups	Total colònies ESC	% colònies / Nr. grups
1/4emb	78	4	5,1
2/4emb	40	0	0
1/8emb	59	0	0
2/8emb	27	3	11,1
3/8emb	8	1	12,5
4/8emb	14	3	21,4
mòrula	23	6	26,1
blastocist	17	2	11,8

les qüestions ètiques i morals sobre la destrucció d'embrions, que són especialment importants en el cas d'embrions humans. A més, cal fer especial referència al fet que fins al moment ningú no ha descrit l'establiment de línies d'ESC a partir de blastòmers aïllats procedents d'embrions de 4 cèl·lules.

Un altre aspecte interessant de fer servir estadis embrionaris previs a blastocist és que les ESC derivades de la ICM del blastocist no són totipotents; en concret, no poden donar trofocoderm (Smith, 2001) i podria limitar el potencial de diferenciació d'aquestes ESC. Per tant, resulta important avaluar si les ESC derivades a partir d'estadis preblastocist tenen efectivament la capacitat de ser totipotents o si, pel contrari, evolucionen fins a estadis similars a ICM i després esdevenen ESC.

## MATERIALS I MÈTODES

### *Obtenció d'embrions de ratolí*

Els embrions de ratolí de 2 cèl·lules van ser obtinguts de l'encreuament de femelles de la soca SV129 amb mascles C57Bl, ja que ofereixen un major rendiment en termes d'obtenció de línies d'ESC (Brook i Gardner, 1997).

Les femelles van ser superovulades mitjançant la injecció intraperitoneal de 5 UI de PMSG seguides

de 5 UI de hCG 48 hores més tard. Immediatament després les femelles superovulades es van col·locar en grups de dues amb un mascle de la soca C57Bl, per tal que les fecundés. Al cap de 48 hores es va procedir al sacrifici dels animals per dislocació cervical i a la perfusió dels oviductes amb medi KSOM-H (Biggers *et al.*, 2000) per a obtenir-ne els embrions.

### *Cultiu dels embrions*

Els estadis embrionaris analitzats van ser els de 4, 8 cèl·lules i mòrula. Com a controls positius de la derivació d'ESC es va emprar l'estadi de blastocist.

Així, els embrions de 2 cèl·lules obtinguts es van cultivar en medi KSOMaag (Biggers *et al.*, 2000) fins a assolir els estadis esmentats.

### *Obtenció de blastòmers aïllats*

Els blastòmers dels embrions en estadi a 4 i 8 cèl·lules van ser separats en els grups de 1/4, 2/4, 1/8, 2/8, 3/8, 4/8. L'aïllament d'aquestes cèl·lules embrionàries es va portar a terme a través de dos protocols.

D'una banda, els blastòmers van ser aïllats a través de l'exposició a una solució de pronasa que induïx la digestió de la zona pellúcida. Posteriorment, per tal de separar els blastòmers, els embrions es van incubar en una solució de PBS sense  $Ca^{++}$  ni  $Mg^{++}$  i



suplementat amb EDTA, juntament amb una lleu aspiració per a trencar les unions intercel·lulars entre blastòmers.

L'altre mètode d'aïllament va consistir en realitzar una biòpsia embrionària mitjançant micromanipulació. Es va foradar la zona pellúcida amb una solució àcida de Tyrode i a través d'aquest forat i amb una pipeta de micromanipulació es van extreure els blastòmers.

### Derivació d'ESC de ratolí

La derivació de les ESC es va portar a terme sobre una monocapa de fibroblasts de ratolí inactivats (FSTO) amb 1 µg/ml de mitomicina C, que són necessaris per al manteniment de la indiferenciació cel·lular.

Els blastòmers aïllats es van dipositar sobre la monocapa de FSTO.

El cultiu es va portar a terme en medi DMEM suplementat amb 1mM L-glutamina, 0,1 mM d'aminoàcids no essencials, antibiòtics, 15 % de sèrum fetal boví (FCS), 0,1 mM de β-mercaptoetanol i 10<sup>3</sup> U/ml de *mouse recombinant leukemia inhibitory factor* (LIF) i en una atmosfera al 5 % de CO<sub>2</sub> i a 37° C.

Al cap d'uns 2-3 dies en cultiu, quan s'observaven petites colònies i sense deixar que comencessin a diferenciar espontàniament, van ser disgregades via tripsinització i sembrades en un placa nova de FSTO per tal d'incrementar el nombre de cèl·lules.

### Caracterització de les línies de ESC

Per tal de confirmar que les colònies obtingudes són realment ESC indiferenciades, vàrem extreure l'RNA total cel·lular, vàrem realitzar una RT-PCR

amb *primers* a l'atzar i, finalment, vàrem realitzar una PCR amb *primers* específics per als marcadors d'indiferenciació Oct-4 i Rex-1. Com a controls positius es van analitzar ESC comprovades i el gen constitutiu GAPDH.

La morfologia de les colònies va ser l'aspecte fonamental a tenir en compte a l'hora de caracteritzar les colònies d'ESC establertes.

### Anàlisi estadística de les dades

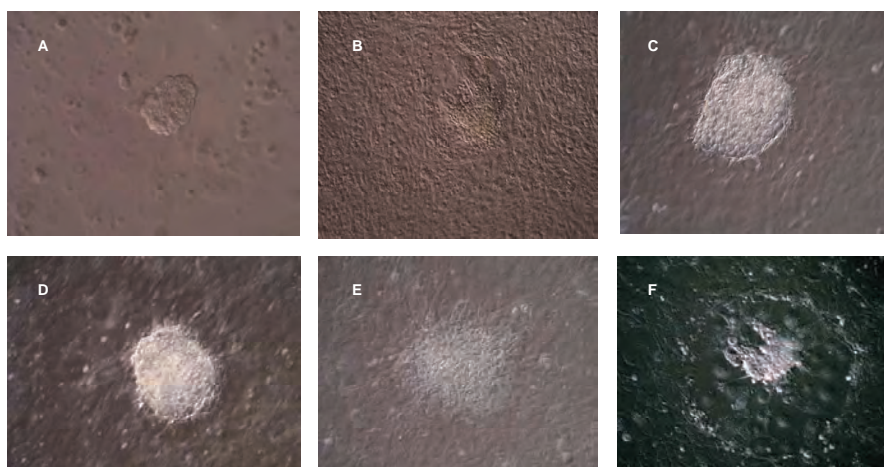
Els resultats van ser analitzats estadísticament mitjançant el test de la  $\chi^2$  o el test exacte de Fisher. Els valors amb  $P < 0,05$  van ser considerats estadísticament significatius.

## RESULTATS

A partir d'un total de 108 embrions es va aconseguir arribar a establir un total de 19 colònies d'ESC. Aquestes colònies corresponen als grups de 1/4, 2/8, 3/8, 4/8, mòrula i blastocist (figura 1A-E).

### Influència de l'estadi embrionari

En analitzar la influència de l'estadi embrionari (taula 1) en l'eficiència de derivació de les ESC, es van trobar diferències significatives ( $P = 0,004$ ), especialment en comparar les colònies derivades a partir de mòrules (26,1 %) amb estadis previs a la compactació (3,4 % per a l'estadi de 4 cèl·lules i 6,5 % per al de 8 cèl·lules). També es va observar que, malgrat que no era estadísticament significatiu, l'estadi a 8 cèl·lules (6,5 % de formació de colònies) era lleugerament més eficaç que el de 4 cèl·lules (3,4 %). L'es-



**Figura 1** Colònies d'ESC. A) Colònia d'ESC derivada de 1/4 al dia 6. B) Colònia derivada de 2/8 al dia 6. C) Colònia procedent de 4/8 al dia 21. D) Colònia procedent de mòrula al dia 28. E) Colònia procedent de blastocist al dia 21. F) Colònia procedent de 3/8 amb la diferenciació envers trofoblast al voltant.

tadi de blastocist triat com a control positiu va donar un 11,8 % de colònies.

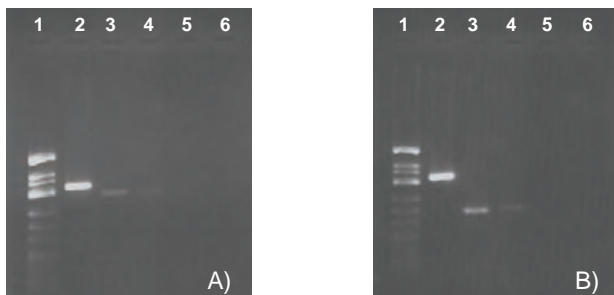
### ***Influència del nombre de blastòmers aïllats***

En referència a la importància del nombre de cèl·lules embrionàries aïllades (taula 2), es va observar que a l'estadi de 4 cèl·lules no es va aconseguir establir cap línia d'ESC del grup de 2/4, mentre que el percentatge de formació de colònies del grup de 1/4 va ser d'un 5,13 %, tot i que és important esmentar que les diferències entre aquests grups no són significatives. En considerar l'estadi de 8 cèl·lules, es va observar que, en general, el percentatge de derivació de colònies d'ESC anava augmentant a mesura que el nombre de blastòmers aïllats s'incrementava. Malgrat aquest fet, només va resultar significativa la comparació entre els grups de 1/8 i 2/8 ( $P = 0,0286$ ), tenint en compte que la contribució del grup de 1/8 a l'hora de formar colònies va ser nul·la. Pel que fa a l'estadi de mòrula, si analitzem la seva importància a la formació de colònies pel que fa al seu nombre cel·lular, es pot observar que el percentatge obtingut va ser el més elevat, amb un 26,1 %.

### ***Resultats de la caracterització de les línies establertes***

De les 19 colònies establertes totes presentaven una morfologia de colònia ben definida als extrems sense diferenciació aparent amb cèl·lules que presenten una mida inferior a les FSTO que les suporten i una morfologia arrodonida. Les colònies que presentaven diferenciació espontània en cultiu al voltant seu es van descartar (figura 1F).

Fins al moment s'han arribat a caracteritzar per RT-PCR dues colònies positives per als marcadors d'indiferenciació Oct-4 i Rex-1 procedents dels



**Figura 2** Detecció de marcadors d'expressió gènica d'una línia procedent de 4/8. A) Detecció del marcador d'expressió gènica Oct-4. B) Detecció del marcador d'expressió gènica Rex-1. Carril 1: marcador de pes molecular ØX174/Hinf I. Carril 2: control positiu del gen constitutiu GAPDH. Carril 3: control positiu d'ESC provades. Carril 4: mostra problema. Carril 5: control negatiu sense retrotranscriptasa. Carril 6: control negatiu sense RNA.

grups de 4/8 (figura 2) i mòrula (figura 3). La resta de colònies es troben pendents de confirmació.

## **DISCUSSIÓ**

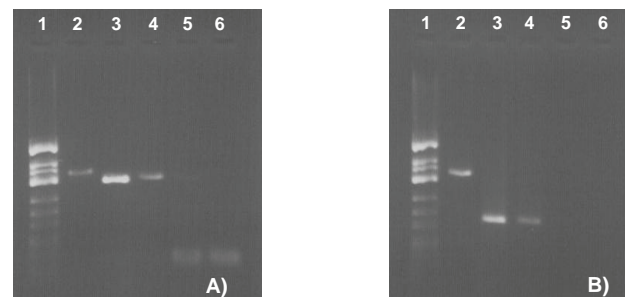
### ***Influència de l'estadi embrionari***

Tal com s'ha demostrat als resultats, l'estadi embrionari té importància a l'hora d'avaluar la seva contribució a la formació de colònies de ESC. S'ha observat que en derivar colònies d'ESC a partir d'embrions en estadis previs a blastocist, l'eficàcia millora a mesura que avança el desenvolupament embrionari, especialment en estadis posteriors a la compactació. L'estadi de mòrula ha demostrat ser el més eficient comparat amb els estadis de 4 i 8 cèl·lules, i millor fins i tot que el grup control de blastocists.

### ***Influència del nombre de blastòmers aïllats***

Pel que fa al nombre de blastòmers aïllats, els resultats demostren que a l'estadi de 4 cèl·lules la contribució era similar quan aïllàvem 1 o 2 blastòmers.

Pel que fa a l'estadi de 8 cèl·lules, el percentatge de colònies derivades a partir de 2/8 va ser similar al grup control dels blastocists (11,1 % vs. 11,8 %). D'altra banda, s'ha constatat que la situació òptima era aïllar 2 blastòmers, ja que, a mesura que incrementàvem el nombre de blastòmers aïllats, l'eficiència de derivació de ESC no augmentava significativament, mentre que, òbviament, podria comprometre la viabilitat de l'embrió a partir del qual s'obtenen els blastòmers. Per altra banda, s'observa una bona correlació entre el nombre inicial de cèl·lules i la probabilitat d'obtenir una línia d'ESC.



**Figura 3** Detecció de marcadors d'expressió gènica d'una línia procedent de mòrula. A) Detecció del marcador d'expressió gènica Oct-4. B) Detecció del marcador d'expressió gènica Rex-1. Carril 1: marcador de pes molecular ØX174/Hinf I. Carril 2: control positiu del gen constitutiu GAPDH. Carril 3: control positiu d'ESC provades. Carril 4: mostra problema. Carril 5: control negatiu sense retrotranscriptasa. Carril 6: control negatiu sense RNA.

Aquesta tendència podria explicar que l'estadi de mòrula tingui una major aportació a l'hora de formar colònies d'ESC, ja que està constituït per un nombre més elevat de cèl·lules.

### **Caracterització de les línies establertes**

Els resultats trobats tant pel que fa a la morfologia de les cèl·lules de la colònia com la detecció dels marcadors de cèl·lules indiferenciades ens fan concloure que les colònies derivades *in vitro* són realment colònies d'ESC.

### **CONCLUSIONS**

Pel que fa a l'estadi embrionari emprat, s'han pogut arribar a derivar colònies a partir de l'estadi de 4 cèl·lules. La utilització d'estadis preblastocist és força eficient, especialment a partir de l'estadi de 8 cèl·lules. A més, s'ha vist que l'eficàcia millora a mesura que avança el desenvolupament embrionari, especialment en estadis posteriors a la compactació. Pel que fa al nombre de blastòmers aïllats, s'observa una bona correlació entre el nombre inicial de cèl·lules i la probabilitat d'obtenir una línia d'ESC, la qual cosa podria fer que l'estadi més eficient per a derivar ESC sigui el de mòrula.

### **AGRAÏMENTS**

Aquest treball s'ha realitzat amb el finançament dels projectes del MEC BIO2005-04341 i BIO 2006-11792 i dels projectes DGR 2004-XT00054 i 2005-SGR00437.

### **BIBLIOGRAFIA**

- BAHIA, A.; TAKEUCHI, T.; TANAKA N.; NERI, Q. V.; ROSENWAKS, Z.; PALERMO, G. D. (2005). «Examination of individual blastomeres as a source of stem cells». *Human Reproduction*, 20(suppl. 1): 16-17.
- BIGGERS, J.; MCGUINNIS, L. K.; RAFFIN, M. (2000). «Amino acids and preimplantation development of the mouse in the protein-free KSOM». *Biology of Reproduction*, 63: 281-293.
- BROOK, F. A.; GARDNER, R. L. (1997). «The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(11): 5709-5712.
- CHUNG, Y.; KLIMANSKAYA, I.; BECKER, S.; MARH, J.; LU, S. J.; JOHNSON, J.; MEISNER, L.; LANZA, R. (2005). «Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres». *Nature*, 439(7073): 216-219.
- DELHAISE, F.; BRALION, V.; SCHURBIERS, N.; DESSY, F. (1996). «Establishment of an embryonic stem cell line from 8-cell stage mouse embryos». *European Journal of Morphology*, 34: 237-243.
- EISTETTER, H. R. (1989). «Pluripotent embryonic stem cell lines can be established from disaggregated mouse morulae». *Developmental Growth & Differentiation*, 31: 275-282.
- EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. (1981). «Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos». *Nature*, 292: 154-156.
- KLIMANSKAYA, I.; CHUNG, Y.; BECKER, S.; LU, S. J.; LANZA, R. (2006). «Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres». *Nature*, 444(7118): 481-485.
- MARTIN, G. R. (1981). «Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(12): 7634-7638.
- SMITH, A. G. (2001). «Embryo-derived stem cells: of mice and men». *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 17: 435-462.
- TESAR P. J. (2005). «Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(23): 8239-8244.



## EMBRYONIC STEM CELL TEST (EST): MÉTODO *IN VITRO* PARA EVALUAR LA EMBRIOTOXICIDAD

J. de Lapuente, J. González-Linares, M. Borràs

Unitat de Toxicologia Experimental i Ecotoxicologia, Parc Científic de Barcelona

Josep Samitier, 1-5. 08028 Barcelona. [jlapuente@pcb.ub.es](mailto:jlapuente@pcb.ub.es).

---

### Resumen

La investigación y desarrollo de técnicas *in vitro* se ha convertido en una prioridad de primer rango tanto para las autoridades europeas y estatales como para las propias empresas. El interés que presentan estas técnicas se basa en diversos aspectos determinantes: consideraciones éticas, rapidez y coste. La ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) ha validado recientemente tres técnicas *in vitro* para la evaluación de la embriotoxicidad en la fase de *screening*: *Embryonic Stem Cell Test* (EST), *Micromass* (MM) y *Whole Embryo Culture* (WEC). El presente trabajo muestra la puesta a punto de la técnica EST, testándola en tres moléculas conocidas y basándonos en el protocolo de trabajo de la ECVAM. Creemos conveniente el establecimiento de un protocolo combinando en batería el *Micromass Test* (MM) y el EST, que aumentaría muy significativamente la sensibilidad y la especificidad en la evaluación durante la fase de *screening* de los efectos sobre el proceso reproductivo.

**Palabras clave** Embryonic Stem Cell Test, teratogenia, embriotoxicidad, toxicidad de la reproducción.

### Abstract

Research and development of *in vitro* techniques has become a first order priority, as well for European and national authorities as for private companies. These techniques are of great interest due to ethical considerations, rapidity and cost. ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) has recently validated three of such screening techniques for embriotoxicity assessment: *Embryonic Stem Cell Test* (EST), *Micromass* (MM) y *Whole Embryo Culture* (WEC). The present work shows the implementation in our lab of EST, following the protocol proposed by ECVAM, and testing the performance of the method with three molecules which effects on reproduction are well known. Based on this experience, we suggest that the use of both MM and EST, combined in a battery, would significantly increase sensitivity and specificity of the assessment at the screening stage of toxicological effects on the reproductive process.

---

## INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas mediante las técnicas de transcriptómica y proteómica y el subsiguiente desarrollo de potenciales respuestas terapéuticas mediante la química combinatoria plantea a las empresas farmacéuticas, de manera perentoria, la necesidad de realizar un cribado rápido y eficaz de un número cada vez más elevado de nuevas entidades químicas (NCE).

En estas condiciones, la investigación y desarrollo de técnicas *in vitro* se ha convertido en una prioridad de primer rango tanto para las autoridades europeas y estatales como para las propias empresas. El interés que presentan las técnicas *in vitro* se basa en diversos aspectos determinantes: consideraciones éti-

cas sobre el uso de animales de experimentación, rapidez y coste.

Esta necesidad es particularmente relevante en lo que respecta a aquella información toxicológica que resulta especialmente sensible por diversas razones. Tal es el caso de la Toxicología de la Reproducción, que es la parte de la toxicología experimental que tiene como objeto detectar *cualquier* efecto posible de la sustancia en estudio sobre el proceso reproductivo.

Para ello es preciso diseñar una batería de ensayos que examinen cuidadosamente las diversas partes de dicho proceso, es decir, en el caso más complejo, desde el desarrollo y maduración de los gametos, la cópula, la implantación y el desarrollo embrionario y fetal, hasta el parto, el destete, el crecimiento y la

**Tabla 1** Valores obtenidos de los *end-points*, funciones lineares discriminantes y clasificación embriotóxica de la molécula penicilina G.

Endpoints	IC50 3t3	9056,044
	IC50 d3	2622,644
	ID50 d3	1156,29

Variabes	lg (IC50 3t3)	3,95693852
	lg (IC50 d3)	3,41873934
	(IC50 3t3 - ID50)/IC50 3t3	0,87231842

Funciones discriminantes lineares I, II y III:

I	15,47544215
II	14,00782119
III	-8,409863005

**Clase 1** No embriotoxico  
**Clase 2** Moderadamente embriotoxicos  
**Clase 3** Fuertemente embriotoxicos

**VERDADERO**  
**FALSO**  
**FALSO**

adaptación a la vida independiente, cerrándose el ciclo de estudio al alcanzar la nueva generación su madurez sexual.

Por lo que se refiere a la farmacotoxicología, el interés, por supuesto, se centra en la reproducción de los mamíferos, ya que el objetivo final de estos estudios es la extrapolación a la especie humana, o a las especies de destino en el caso de la medicina veterinaria. En este campo existe una normativa precisa que en la actualidad, para los Estados Unidos de América, Japón y la Unión Europea, se ha unificado en las directrices de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH).

En el caso de la ecotoxicología la situación está menos definida, el campo es muy amplio en cuanto a las especies potencialmente afectadas e incluso al abanico de efectos posibles, y es preciso tener en cuenta numerosos factores con capacidad moduladora, además de eventuales interacciones y efectos indirectos, por lo que las formas de la evaluación toxicológica deben adaptarse a las circunstancias concretas.

Entre los estudios de Toxicología de la Reproducción mencionados, aquellos que se refieren a la embriotoxicidad y a la teratogenia (inducción de malformaciones en los fetos cuando la madre embarazada es expuesta al tóxico) resultan de la mayor importancia, por referirse a aspectos extremadamente sensibles para la opinión pública (en especial a partir del desastre de la talidomida ocurrido entre 1959 y 1964).

Los protocolos establecidos en las normativas ICH son de ejecución larga y resultan considerablemente onerosos en dinero y en animales (es preciso realizarlos en tres especies distintas, una de las cuales debe ser no roedor), por lo cual no pueden ser utilizados en estudios de *screening*, en los que es preciso examinar un número elevado de productos.

De ahí la necesidad de desarrollar técnicas alternativas, especialmente *in vitro*.

Desde que un exhaustivo estudio de validación realizado por la agencia americana de validación de métodos alternativos (ICVAM) condujo a que tanto esta agencia como la europea ECVAM rechazaran formalmente el uso del test FETAX (*Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus*) como técnica alternativa para el *screening* de fármacos, la atención se ha centrado en las técnicas que utilizan cultivos celulares o de embriones enteros. Resumimos a continuación la situación actual.

En la teratogenia *in vitro* (tests alternativos al ensayo en mamíferos) existen tres técnicas que han sido recientemente validadas por ECVAM a través de un estudio inter-laboratorios con 20 productos seleccionados.

Hasta el momento en nuestra Unidad hemos puesto a punto uno de ellos, el Test de Células Madre Embrionarias de Ratón (EST) (Scholz *et al.*, 1999; Piersma, 2004), y hemos iniciado los primeros ensayos para la implementación del Micromass Test (MM) (Spielmann *et al.*, 2002, 2004) y el Cultivo de Embriones Enteros (WEC).

El presente trabajo muestra la puesta a punto de la técnica testándola en tres moléculas conocidas y basándonos en el protocolo de trabajo de la ECVAM (*Embryonic stem cell test for embriotoxicity*)

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las líneas celulares utilizadas fueron: fibroblastos de ratón (3T3 BALB/c Clon A31) (American Type Culture Collection, ATCC, cat. n° CCL-163) y Embryonic Stem Cells, clon D3 (ES-D3) (ATCC cat. n° CRL-1934)

El medio de cultivo utilizado para el ensayo con

**Tabla 2** Valores obtenidos de los *end-points*, funciones lineares discriminantes y clasificación embriotóxica de la molécula 5-fluorouracilo.

Modelo de Predicción

Endpoints	IC50 3t3	0,09243
	IC50 d3	0,03181
	ID50 d3	0,02291

Variables	lg (IC50 3t3)	-1,03418705
	lg (IC50 d3)	-1,49743633
	(IC50 3t3 - ID50)/IC50 3t3	0,75213675

Funciones discriminantes lineares I, II y III:

I	-30,62086747
II	-15,7397735
III	1,458063955

**Clase 1** No embriotóxico  
**Clase 2** Moderadamente embriotóxicos  
**Clase 3** Fuertemente embriotóxicos

**FALSO**  
**FALSO**  
**VERDADERO**

las células ES-D3 estaba compuesto de 20 % Fetal Calf Serum, 2 mM de glutamina, 50 IU/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina, 1 % de aminoácidos no esenciales, 0,1 mM β-mercaptoetanol.

El medio de cultivo utilizado para el ensayo con las células 3T3 estaba compuesto de 10 % Fetal Calf Serum, 4 mM de glutamina, 50 IU/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado utilizando diferentes viales de la misma línea celular, preparándose el medio antes de ser utilizado.

### Diferenciación de la células madres ES-D3

La línea ES-D3 fue cultivada permanentemente en presencia de mLIF (*Mouse Leukemia Inhibitor Factor*) antes de empezar el ensayo, en la fase de expansión del cultivo, para evitar la diferenciación espontánea.

Se testaron tres moléculas a diferentes concentraciones 5-fluorouracilo (0,008; 0,013; 0,02; 0,03; 0,045; 0,068 y 0,1 µg/ml), dexametasona (5,8; 8,8; 13,3; 20; 30; 45 y 67,5 µg/ml) y penicilina G (948; 1422; 2133; 3200; 4800; 7200 y 10800 µg/ml).

Se realizó un cultivo en gota pendiente de una suspensión celular de  $3,75 \times 10^4$  células/ml y se incubaron durante 3 días con 5 % CO<sub>2</sub> a 37° C, para la formación de los cuerpos embrioides (EB). Los EB se depositaron en placas de Petri con tratamiento antiadherente y se mantuvieron dos días en las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Finalmente, los EB de cada concentración, se traspasaron a una placa de 24 pozos y se incubaron durante 5 días. El medio con las concentraciones apropiadas y los controles fueron renovados a los 3 y 5 días después del inicio del ensayo.

A los 10 días se determinó la diferenciación me-

dante la observación en microscopio óptico invertido de los miocardiocitos contráctiles de cada concentración testada.

Bajo las mismas condiciones se realizó un test de calidad de la línea celular y de los solventes de cada molécula (Phosphate Buffered Saline al 1 % para la penicilina G y 5-fluorouracilo y dimetilsulfóxido al 0,25 % en dexametasona)

### Citotoxicidad en células ES-D3 y 3T3

Se prepararon, independientemente, para cada línea celular, una suspensión celular en el medio de cultivo adecuado de  $1 \times 10^4$  células/ml. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron con 5 % CO<sub>2</sub> a 37° C durante 2 h. Tras este periodo se testaron las tres moléculas a diferentes concentraciones: 5-fluorouracilo (0,029; 0,044; 0,066; 0,1; 0,15; 0,225 y 0,337 µg/ml), dexametasona (5,8; 8,8; 13,3; 20; 30; 45 y 67,5 µg/ml) y penicilina G (948; 1422; 2133; 3200; 4800; 7200 y 10800 µg/ml), en ambas líneas celulares. El medio con las concentraciones apropiadas y los controles fueron renovados a los 3 y 5 días después del inicio del ensayo. En el mismo ensayo se utilizaron como control negativos los solventes de cada molécula (Phosphate Buffered Saline al 1 % para la penicilina G y 5-fluorouracilo y dimetilsulfóxido al 0,25 % en dexametasona) y como control positivo *sodium dodecyl sulphate* (SDS) al 0,02 %

Transcurridos 10 días se determinó el crecimiento celular por MTT.

### Cálculo de los end-points

Para calcular los tres diferentes *end-points* necesarios para determinar el grado de embriotoxicidad que



**Tabla 3** Valores obtenidos de los end-points, funciones lineares discriminantes y clasificación embriotóxica de la molécula *dexametasona*.

Modelo de Predicción

Endpoints	IC <sub>50</sub> 3t3	5,26
	IC <sub>50</sub> d3	0,69324
	ID <sub>50</sub> d3	7,47048

VARIABLES	lg (IC <sub>50</sub> 3t3)	0,72098574
	lg (IC <sub>50</sub> d3)	-0,15911639
	(IC <sub>50</sub> 3t3 - ID <sub>50</sub> )/IC <sub>50</sub> 3t3	-0,42024335

Funciones discriminantes lineares I, II y III:

I	-9,331324253
II	-3,744250955
III	-3,085462124

**Clase 1** No embriotóxico  
**Clase 2** Moderadamente embriotóxicos  
**Clase 3** Fuertemente embriotóxicos

**FALSO**  
**FALSO**  
**VERDADERO**

presenta la muestra, según el protocolo aceptado por la ECVAM: Índice de la inhibición de la diferenciación del 50 % de los EB (ID<sub>50</sub>) y concentración de la inhibición de crecimiento del 50 % de las células ES y 3T3 (IC<sub>50</sub> ES y IC<sub>50</sub> 3T3), se utilizó una determinación gráfica.

### Cálculo del grado de embriotoxicidad

El modelo de predicción validado por la ECVAM para el EST está basado en la obtención de tres funciones lineares discriminantes a partir de los 3 *end-points* (ID<sub>50</sub> ES, IC<sub>50</sub> ES y IC<sub>50</sub> 3T3) (Véase la página siguiente):

Y clasificando las moléculas en tres clases: No embriotóxicas (si FI > FII y FI > FIII), Moderadamente embriotóxicas (si FII > FI y FII > FIII) y fuertemente embriotóxicas (si FIII > FI y FIII > FI) (ECVAM y Walmod *et al.*, 2004)

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1, tabla 2 y tabla 3.

Según el modelo propuesto por la ECVAM en su última versión de 2002 para el Embryonic Stem Cell Test clasifican a la molécula *penicilina G* como *no embriotóxica*, a la molécula *5-fluorouracilo* como *fuertemente embriotóxica* y a la molécula *dexametasona* como *moderadamente embriotóxica*.

## DISCUSIÓN

Las tres moléculas testadas han sido clasificadas correctamente según las referencias existentes en la li-

teratura y en los ensayos validados por la ECVAM, por lo que estamos en disposición de realizar el ensayo de manera rutinaria en nuestro laboratorio.

Superada la fase de puesta a punto, con las dificultades que ello puede llegar a presentar, creemos que el test de embriotoxicidad con células madres (EST) es un buen test para la fase de cribaje.

En contra de lo que se afirma en el documento de ECVAM, creemos que no es posible obviar de manera general la utilización de un activador metabólico (fracción S9+), sino que la decisión debe tomarse en cada caso atendiendo a la familia molecular concreta con la que se esté trabajando. Una mejora en el procedimiento de evaluación de la diferenciación en el test EST sería muy importante. En la actualidad, el protocolo aprobado por ECVAM solamente contempla la evaluación visual, siendo «positivos» aquellos cuerpos embrioides en los que se aprecia la contracción celular, tanto si ésta se produce únicamente en una o muy pocas células, y con una frecuencia de latidos muy baja, como si prácticamente todo el cuerpo embriode late con una frecuencia equivalente a la de un corazón. Evidentemente, una forma más precisa de cuantificación repercutiría muy sensiblemente en el poder discriminatorio del ensayo. Hay que señalar que actualmente ya se ha propuesto una técnica para la cuantificación del grado de diferenciación, basada en la tinción inmunohistoquímica de la  $\alpha$ -actinina o de la miosina de cadena pesada (MHC) y la lectura mediante citofluorometría de flujo, o también se han ensayado técnicas de caracterización de la expresión génica mediante TaqMan PCR (Seiler *et al.*, 2005). Estas técnicas, sin embargo, complican considerablemente el protocolo, y no resultan suficientemente manejables para estudios de *screening*.

No obstante, atendiendo a las necesidades concre-

$$\begin{aligned} \text{Función I} & \quad 5,916 \log (\text{IC}_{50} \text{ 3T3}) + 3,50 \log (\text{IC}_{50} \text{ ES}) - 5,307 \frac{(\text{IC}_{50} \text{ 3T3} - \text{ID}_{50})}{\text{IC}_{50}} \text{ ES} - 15,27 \\ \text{Función II} & \quad 3,651 \log (\text{IC}_{50} \text{ 3T3}) + 2,394 \log (\text{IC}_{50} \text{ ES}) - 2,033 \frac{(\text{IC}_{50} \text{ 3T3} - \text{ID}_{50})}{\text{IC}_{50}} \text{ ES} - 6,85 \\ \text{Función III} & \quad -0,125 \log (\text{IC}_{50} \text{ 3T3}) - 1,917 \log (\text{IC}_{50} \text{ ES}) + 1,50 \frac{(\text{IC}_{50} \text{ 3T3} - \text{ID}_{50})}{\text{IC}_{50}} \text{ ES} - 2,67 \end{aligned}$$

tas de una fase de *screening* de fármacos, el bajo porcentaje de falsos positivos (7 %) hace que el *micromass test* resulte un test muy aceptable; el número de falsos negativos, relativamente elevado, hace que, en cambio, resulte problemático en otros escenarios. La combinación de este test con el EST, que presenta un nivel bajo de falsos negativos (9,5 %), ha de permitir mejorar considerablemente nuestra capacidad para distinguir entre no embriotóxicos y embriotóxicos débiles (ECVAM, Buesen *et al.*, 2004)

Por lo tanto, una buena estrategia de *screening* sería, en nuestra opinión, utilizar ambos tests en batería, actuando el MM como primer filtro, y aplicar el EST para aquellos productos que no hayan sido clasificados en el primer test como *embriotóxicos fuertes*.

## BIBLIOGRAFÍA

BUESEN, R.; VISAN, A.; GENSCROW, E.; SLAWIK, B.; SPIELMANN, H.; SEILER, A. (2004) «Trends in improving the embryonic stem cell test (EST): an overview». *ALTEX*, 21(1): 15-22.

ECVAM (EUROPEAN CENTRE FOR THE VALIDATION OF

ALTERNATIVE METHODS) (2002) *Embryonic stem cell test*. <http://ecvam.jrc.it/index.htm>

PIERSMA, A. (2004). «Validation of alternative methods for developmental toxicity testing». *Toxicology Letters*, 149: 147-153.

SCHOLZ, G.; POHL, I.; GENSCROW, E.; KLEMM, M.; SPIELMANN, H. (1999). «Embryotoxicity screening using embryonic stem cells *in vitro*: correlation to *in vivo* teratogenicity». *Cells Tissues Organs*, 165: 203-211.

SEILER, A. E.; BUESEN, R.; VISAN, A.; SPIELMANN, H. (2006). «Use of murine embryonic stem cells in embryotoxicity assays: the embryonic stem cell test». *Methods Mol. Biol.*, 329: 371-395.

SPIELMANN, H.; GENSCROW, E.; BROWN, N. A.; PIERSMA, A. H.; VERHOEF, A.; SPANJERSBERG, M. Q.; HUSKONEN, H.; PAILLARD, F.; SEILER, A. (2004). «Validation of the rat limb bud micromass test in the international ECVAM validation study on three *in vitro* embryotoxicity tests». *Altern. Lab. Anim.*, 32(3): 245-274.

SPIELMANN, H.; LIEBSCH, M. (2002). «Validation successes: chemicals». *Altern. Lab. Anim.*, 30(supl. 2): 33-40.

WALMOD, P.; GRAVEMANN, U.; NAU, H.; BEREZIN, V.; BOCK, E. (2004). «Discriminative power of an assay for automated *in vitro* screening of teratogens». *Toxicology in Vitro*, 18: 511-525.



## CANVIS EN LA CONCENTRACIÓ DE CARNITINA, GLUTAMAT I INOSITOL AL FLUID I ALS ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIS DE PORCÍ

Anna Pruneda,<sup>1\*</sup> Ching-Hei Yeung,<sup>2</sup> Sergi Bonet,<sup>1</sup> Elisabet Pinart,<sup>1</sup> Trevor G. Cooper<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Grup de Reproducció Animal i Humana, Departament de Biologia-INTEA, Facultat de Ciències, Universitat de Girona Campus Montilivi, s/n. 17071 Girona. [anna.pruneda@udg.es](mailto:anna.pruneda@udg.es).

<sup>2</sup> Institute of Reproductive Medicine of the University Domagkstrasse, 11. D-48129 Münster, Alemanya.

---

### Resum

El fluid epididimari conté un nombre elevat de molècules orgàniques, de les quals algunes molècules de baix pes molecular, com l'L-carnitina, el glutamat i el *myo*-inositol, estan implicades en la maduració espermàtica. En aquest estudi s'ha determinat que al llarg del conducte epididimari la concentració de glutamat i carnitina al fluid epididimari lliure d'espermatozoides augmenten, alhora que la concentració de *myo*-inositol disminueix. Al llarg de l'epidídim les variacions en la concentració d'aquests soluts no segueixen el mateix patró que les variacions en la concentració espermàtica; aquestes diferències s'atribueixen a processos de secreció o d'absorció d'aquests osmolits. El contingut de *myo*-inositol a l'interior dels espermatozoides disminueix des del caput distal, mentre que el contingut de glutamat augmenta a partir del caput distal; el contingut de carnitina dels espermatozoides epididimaris no varia al llarg del conducte. Aquests resultats donen suport a la hipòtesi que l'epidídim proporciona glutamat als espermatozoides, el qual pot ser utilitzat per a regular el seu volum en entrar en contacte amb els fluids hipotònics del tracte reproductor femení.

**Paraules clau** mascle reproductor porcí, epidídim, carnitina, glutamat, *myo*-inositol.

### Abstract

In epididymal plasma, high-molecular-weight proteins and smaller molecules such as L-carnitine, glutamate and *myo*-inositol are thought to aid in the conversion of gametes into competent, functional cells. In this study, it has been determined that in epididymal fluid, free of spermatozoa, the concentration of *myo*-inositol decreased in a proximo-distal direction, whereas intraluminal concentrations of L-carnitine and L-glutamate increased distally. As changes in the concentration of these solutes did not parallel changes in sperm concentration, indicative of fluid resorption, this may reflect active secretion or absorption of these solutes. The content of inositol in spermatozoa fell as they moved from the distal caput whereas sperm glutamate increased from the distal caput to more distal regions and carnitine content remained unchanged during epididymal transit. These data are consistent with the hypothesis that epididymal provision of glutamate prepares porcine spermatozoa for the hypotonic challenge of fluids in the sow.

**Key words** boar, epididymis, carnitine, glutamate, *myo*-inositol.

---

## INTRODUCCIÓ

El fluid epididimari conté un elevat nombre de molècules orgàniques de baix pes molecular i solubles en aigua presents a elevades concentracions (mM) (Cooper, 1998); algunes d'aquestes molècules són l'L-carnitina, el glutamat i el *myo*-inositol. Es creu que l'L-carnitina està implicada en la producció d'energia per a la motilitat espermàtica (Ng *et al.*, 2004), i que el glutamat pot ser utilitzat com a substrat oxidatiu per al metabolisme aeròbic dels espermatozoides

(Mann, 1964) o pot millorar la supervivència espermàtica (Tyler i Rothschild, 1951). D'altra banda, el *myo*-inositol un cop transformat a fosfatidilinositol és metabolitzat activament pels espermatozoides i es creu que té un efecte estimulador de la motilitat, la respiració i la glicòlisi dels espermatozoides (Scott i Dawson, 1968). A més, es coneix que aquestes molècules són utilitzades per les cèl·lules somàtiques com a osmolits reguladors de volum (Fürst *et al.*, 2002). Recentment s'ha proposat que els espermatozoides en procés de maduració podrien adquirir

aquests osmolits, els quals participarien en la regulació del volum espermàtic als fluids hipoosmòtics del tracte reproductor femení (Cooper i Yeung, 2003).

L'objectiu d'aquest estudi és determinar com varia la concentració de carnitina, *myo*-inositol i glutamat al fluid i als espermatozoides de les diferents regions epididimàries, i si aquestes substàncies actuen com a osmolits per als espermatozoides en procés de maduració a l'epidídim de porcí.

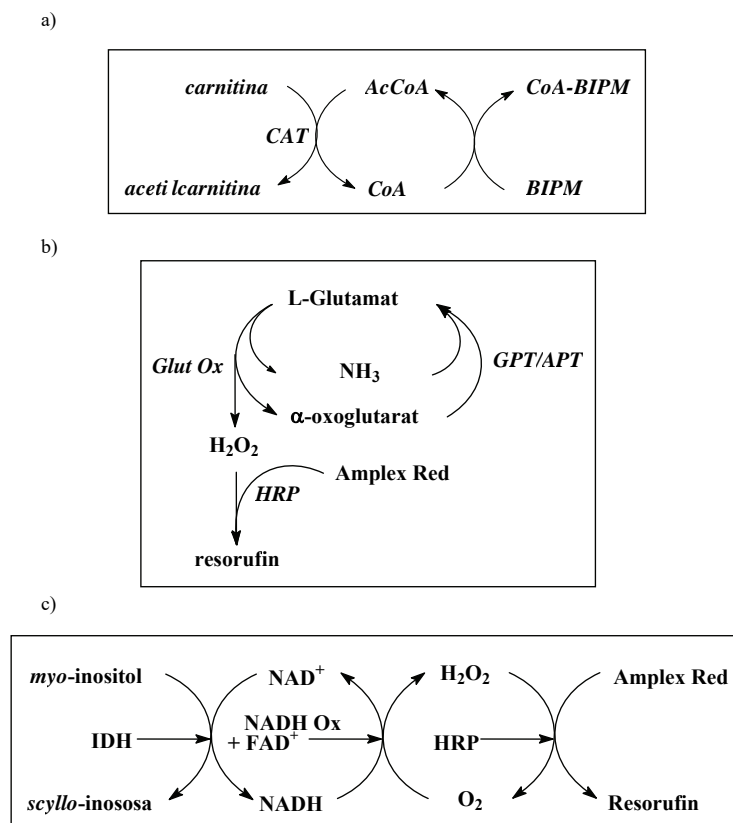
## MATERIAL I MÈTODES

En aquest estudi es van utilitzar sis mascles Pietrain de deu mesos d'edat; de cadascun d'ells es van canular les sis regions epididimàries (caput proximal i distal, corpus proximal i distal, i cauda proximal i distal) per tal d'obtenir-ne el fluid luminal sense diluir. Es va analitzar la concentració espermàtica dels continguts luminals sense diluir i, a continuació, es van processar per tal d'obtenir per separat els espermatozoides epididimaris i el fluid lliure d'espermatozoides.

Per a l'extracció d'osmolits dels espermatozoides epididimaris, se'ls van aplicar 3 polsos d'ultrasons de 3 segons amb el sonicador (25 W; punta d'1,5 mm; Vibra-Cell-Sonicator, Sonics & Materials

Inc. Danbury, Conn, EUA), tot mantenint la mostra en gel.

Totes les anàlisis dels osmolits orgànics es van realitzar amb assajos fluorimètrics modificats per plaques de 96 pouets i es van llegir amb un espectrofluorímetre (SpectraMax GeminiXS Molecular Devices GmbH, Munic, Alemanya). L'anàlisi de la concentració de carnitina es va fer seguint el protocol descrit per Maehara *et al.* (1988). En aquest mètode, l'L-carnitina és convertida a acetilcarnitina per la carnitina-acetiltransferasa (CAT), alhora que l'acetilcoenzim A (AcCoA) és convertit a coenzim A (CoA). El CoA reacciona amb el N-(4-(2-benzimidazolil)-fenil)-maleimida (BIPM) per a donar lloc a un producte fluorescent (CoA-BIPM) que pot ser quantificat amb excitació a 315 nm i emissió a 370 nm (figura 1a). En el cas de l'L-glutamat, aquest és convertit a  $\alpha$ -oxoglutarat,  $\text{NH}_3$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  per la glutamat-oxidasa (Glut Ox). El glutamat és regenerat per l'acció de l'L-alanina- i l'L-glutamat-piruvat-transaminasa (APT i GPT, respectivament) que incrementen la producció d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Aquest  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presència de la Horse Radish Peroxidasa (HRP) converteix l'Amplex Red a resorufina, que podrà ser quantificada per excitació a 560 nm i emissió a 587 nm (figura 1b). Per a l'anàlisi de la concentració d'inositol es va utilitzar el protocol descrit per O'Neill *et al.* (1998) i Yeung *et al.* (2004). En aquest mètode, el *myo*-inosi-



**Figura 1** Seqüència de reaccions de l'assaig de la concentració de carnitina (a), glutamat (b) i *myo*-inositol (c).

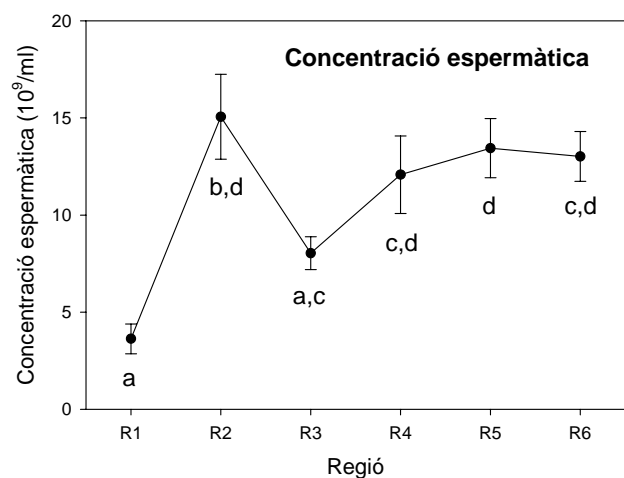
tol és convertit a *scyllo*-inososa per la inositol-deshidrogenasa (IDH), mentre que el dinucleòtid de nicotina i adenina ( $\text{NAD}^+$ ) és reduït ( $\text{NADH}$ ). La NADH-oxidasa ( $\text{NADH Ox}$ ), juntament amb el nucleòtid de flavina i adenina ( $\text{FAD}^+$ ), oxida el  $\text{NADH}$  i converteix l'oxigen a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Finalment, l'Amplex Red en presència de l'HRP reacciona amb l' $\text{H}_2\text{O}_2$  per a produir resorufina, que serà quantificada amb excitació a 530 nm i emissió a 590 nm (figura 1c).

Els resultats obtinguts de l'anàlisi de la concentració d'osmolits orgànics s'expressen com la mitjana  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). L'anàlisi estadística de les dades es va dur a terme amb el programa SigmaStat (versió 3.1; SPSS Inc, Erkrath, Alemanya). Les diferències entre regions epididimàries es van analitzar amb el test de l'ANOVA d'un factor; les dades que no complien la normalitat o l'homoscedasticitat es van analitzar amb una ANOVA d'un factor en rangs. Per a fer les comparacions *post-hoc* es va utilitzar el mètode de Holm-Sidak, i les diferències es van considerar estadísticament significatives quan  $P < 0,05$ .

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

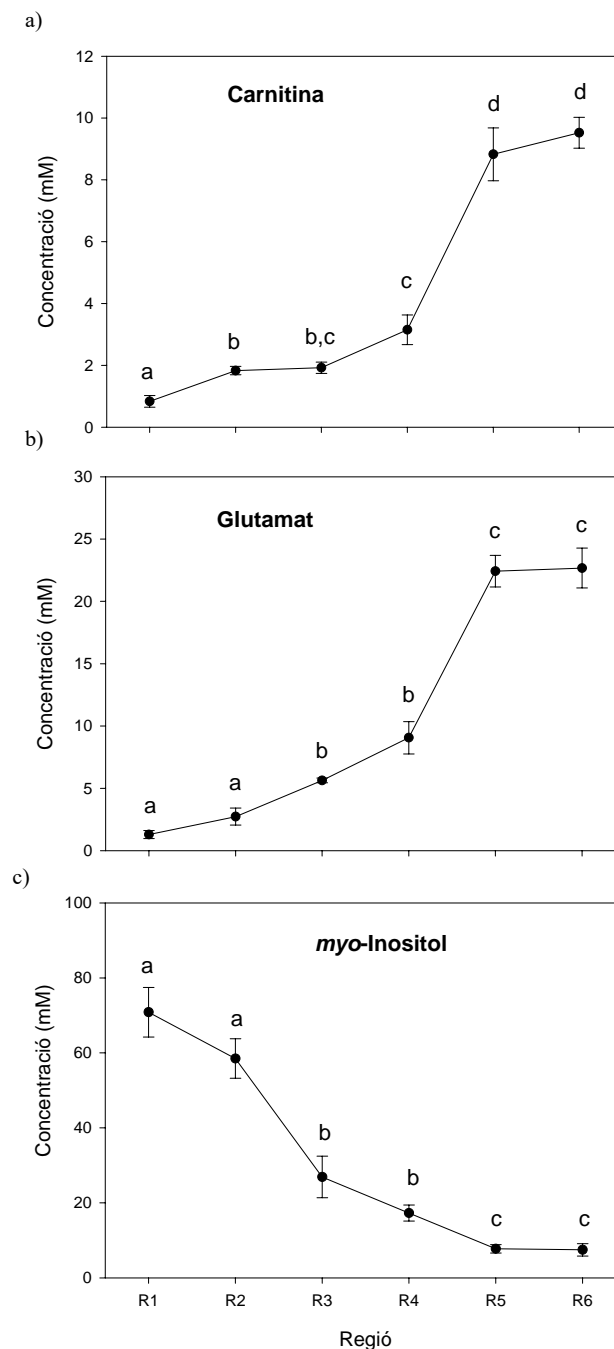
La concentració espermàtica augmenta al caput epididimari, per bé que del caput distal al corpus proximal disminueix, abans de tornar a augmentar de nou fins al cauda epididimari (figura 2).

Les concentracions de carnitina i de glutamat del fluid luminal augmenten al llarg del conducte epididimari, i assoleixen el seu màxim al cauda proximal (10 mM i 23 mM, respectivament) (figura 3). La concentració espermàtica no segueix el mateix patró que la concentració de carnitina i glutamat; per tant, l'augment de la concentració d'aquests osmolits no



**Figura 2** Concentració espermàtica (mitjana  $\pm$  SEM) al fluid de les sis regions epididimàries (R1-R6) dels sis mascles reproductors porcíns. a-d: els valors amb la mateixa lletra no difereixen significativament entre regions.

és conseqüència d'una reabsorció d'aigua, sinó que s'atribueix a processos de secreció o de síntesi de carnitina i glutamat. L'augment de la concentració de carnitina al llarg del conducte epididimari ja havia estat descrit prèviament en porcí (Jeulin i Lewin, 1996). Jeulin *et al.* (1994) demostraren que la carnitina no se sintetitza a l'epidídim, sinó que és transportada des de la sang; posteriorment, s'ha descrit l'existència de transportadors de carnitina a l'epidí-



**Figura 3** Concentració (mitjana  $\pm$  SEM) de carnitina (a), glutamat (b) i *myo*-inositol (c) al de les sis regions epididimàries (R1-R6) dels sis mascles reproductors porcíns. a-d: els valors amb la mateixa lletra no difereixen significativament entre regions.

dim de rates i ratolins (Rodríguez *et al.*, 2002; Cooper *et al.*, 2003).

En els espermatozoides de raça Pietrain la concentració de carnitina no varia al llarg del conducte epididimari (0,28 nmol/10<sup>6</sup> spz) (figura 4), mentre que en els espermatozoides de la raça Large White augmenta de manera progressiva (Jeulin i Lewin, 1996). En altres espècies, com hámsters, conills, marrans i toros (Inskeep i Hammerstedt, 1982; Casillas *et al.*,

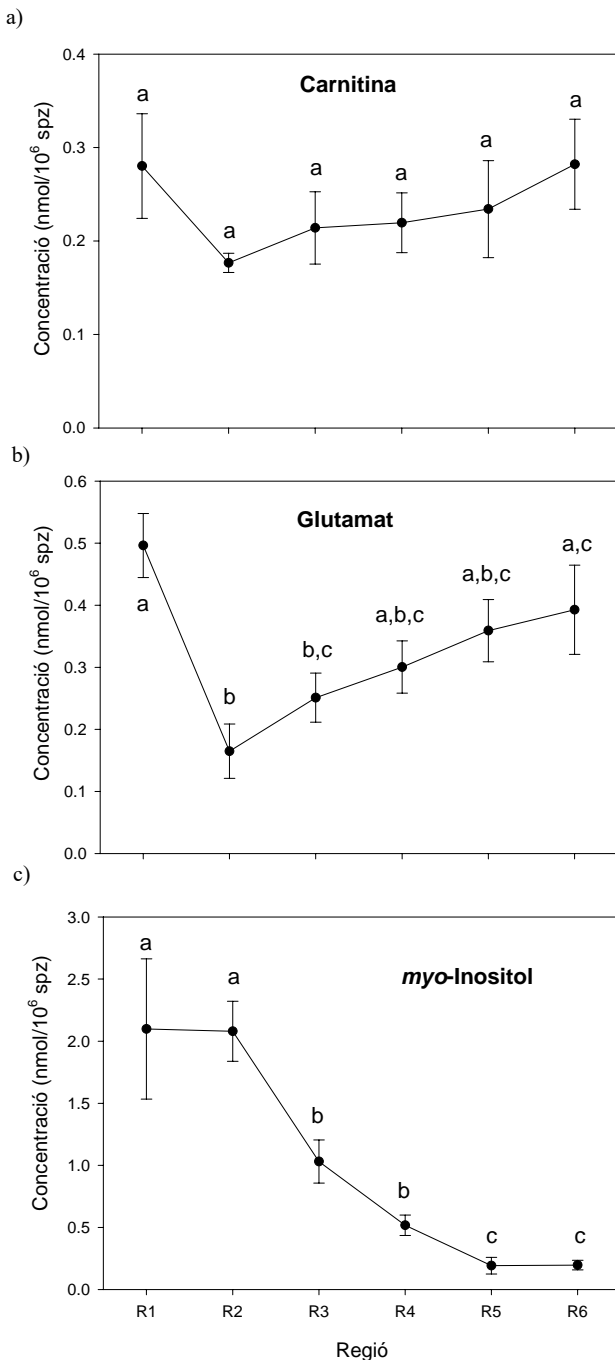
1984), també s'ha descrit un augment de la concentració de carnitina dels espermatozoides al llarg de l'epidídim.

La concentració de glutamat del fluid augmenta de manera progressiva al llarg del conducte epididimari fins a 23 mM al cauda distal (figura 3). Johnson *et al.* (1972) també van trobar una concentració similar de glutamat al fluid del cauda distal de mascles porcins, per bé que aquests autors no van mesurar la concentració d'aquest osmolit a la resta de regions epididimàries. Contràriament, en rata s'ha determinat que la concentració de glutamat disminueix al llarg del conducte epididimari (Hinton, 1990). En ratolí, s'ha descrit la presència de transportadors, que transporten glutamat de la sang cap a la llum del conducte epididimari (Cooper i Yeung, 2003).

Entre el caput proximal i el caput distal s'ha determinat una disminució de la concentració de glutamat en els espermatozoides, tot i que al corpus i al cauda epididimaris aquesta concentració augmenta fins a 0,4 nmol/10<sup>6</sup> spz (figura 4). Aquesta disminució inicial podria reflectir que els espermatozoides estan utilitzant el glutamat per al seu metabolisme, o que els espermatozoides són permeables al glutamat i que, per tant, es produeix un flux de glutamat cap al fluid epididimari. D'altra banda, l'augment de concentració que s'observa als espermatozoides del corpus i el cauda epididimaris podria ser conseqüència de l'adquisició de glutamat des del fluid epididimari.

A diferència de la carnitina i el glutamat, la concentració d'inositol al fluid luminal disminueix des del caput proximal (70 mM) fins al cauda distal (7,5 mM) (figura 3). Hinton *et al.* (1980) determinaren, també en porcí, que la concentració d'inositol al cauda distal era d'1 mM, per bé que en aquest cas tampoc no van mesurar-ne la concentració a la resta de regions epididimàries. Existeixen diferències entre espècies en els nivells d'inositol del fluid epididimari; així, en conills, primats, marrans i toros (Voglmayr i Amann, 1973; Hinton *et al.*, 1980) la concentració d'inositol disminueix al llarg del conducte, mentre que en rates augmenta (Voglmayr, 1974). A l'epidídim de ratolí (Xu i Cooper, observacions no publicades), però no de gos (Kwon *et al.*, 1992), s'ha determinat la presència d'un transportador d'inositol dependent de sodi, tot i que no es coneix en quina direcció transporta aquest substrat.

La concentració d'inositol als espermatozoides epididimaris disminueix des del caput distal fins al cauda distal (0,2 nmol/10<sup>6</sup> espermatozoides) (figura 4), paral·lelament a la concentració d'inositol del fluid epididimari; això suggereix que els espermatozoides són permeables a l'inositol o que l'estan transformant a fosfatidilinositol. Voglmayr i Amann



**Figura 4** Contingut (mitjana ± SEM) de carnitina (a), glutamat (b) i myo-inositol (c) als espermatozoides de les sis regions epididimàries (R1-R6) dels sis mascles reproductors porcins. a-c: els valors amb la mateixa lletra no difereixen significativament entre regions.



(1973) van demostrar que en conill el contingut d'inositol dels espermatozoides testiculars era quatre vegades superior al dels espermatozoides del cauda epididimari, d'acord amb els resultats obtinguts en el present treball.

Així doncs, al fluid epididimari la concentració de glutamat i carnitina augmenten, alhora que la concentració de *myo*-inositol decreix. El contingut de *myo*-inositol dels espermatozoides disminueix des del caput distal, mentre que el contingut de glutamat augmenta a partir del caput distal; el contingut de carnitina dels espermatozoides epididimaris no varia al llarg del conducte. Aquests resultats donen suport a la hipòtesi que l'epidídim proporciona glutamat als espermatozoides, i que aquest glutamat pot ser utilitzat pels espermatozoides per a regular el seu volum en entrar en contacte amb els fluids hipotònics del tracte reproductor femení.

## BIBLIOGRAFIA

- CASILLAS, E. R.; VILLALOBOS, P.; GONZALES R. (1984). «Distribution of carnitine and acetylcarnitine in the hamster epididymis and in epididymal spermatozoa during maturation». *J. Reprod. Fertil.*, 72: 197-201.
- COOPER, T. G. (1998). «EPIDIDYMIS». A: NEILL, J. D.; KNOBIL, E. [ed.] *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press, p. 1-17.
- COOPER, T. G.; YEUNG, C. H. (2003). «Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of cytoplasmic droplets». *Micros. Res. and Tech.*, 61: 28-38.
- COOPER, T. G.; WAGENFELD, A.; CORNWALL, G. A.; HSIA, N.; CHU, S. T.; ORGBIN-CRIST, M.-C.; DREVET, J.; VERNET, P.; AVRAM, C.; NIESCHLAG, E.; YEUNG, C.-H. (2003). «Gene and protein expression in the epididymis of infertile *c-ros* receptor tyrosine kinase-deficient mice». *Biol. Reprod.*, 69: 1750-1762.
- FÜRST, J.; GSCHWENTNER, M.; RITTER, M.; BOTTA, G.; JAKAB, M.; MAYER, M.; GARAVAGLIA, L.; BAZZINI, C.; RODIGHIERO, S.; MEYER, G.; EICHMULLER, S.; WOLL, E.; PAULMICHL, M. (2002). «Molecular and functional aspects of anionic channels activated during regulatory volume decrease in mammalian cells». *Pflugers Archives*, 444: 1-25.
- HINTON, B. T. (1990). «The testicular and epididymal luminal amino acid microenvironment in the rat». *J. Androl.*, 11: 498-505.
- HINTON, B. T.; WHITE, R. W.; SETCHELL, B. P. (1980). «Concentrations of *myo*-inositol in the luminal fluid of the mammalian testis and epididymis». *J. Reprod. Fertil.*, 58: 395-399.
- INSKEEP, P. B.; HAMMERSTEDT, R. H. (1982). «Changes in metabolism of ram sperm associated with epididymal transit or induced by endogenous carnitine». *Biol. Reprod.*, 27: 735-743.
- JEULIN, C.; LEWIN, L. M. (1996). «Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa». *Hum. Reprod.*, 2: 87-102.
- JEULIN, C.; DACHEUX, J. L.; SOUFIR, J. C. (1994). «Uptake and release of free L-carnitine by boar epididymal spermatozoa in vitro and subsequent acetylation rate». *J. Reprod. Fertil.*, 100: 263-271.
- JOHNSON, L. A.; PURSEL, V. G.; GERRITS, R. J.; THOMAS, C. H. (1972). «Free amino acid composition of porcine seminal, epididymal and seminal vesicle fluids». *J. Anim. Sci.*, 34: 430-434.
- KWON, H. M.; YAMAUCHI, A.; UCHIDA, S.; PRESTON, A. S.; GARCIA-PEREZ, A.; BURG, M. B.; HANDLER, J. S. (1992). «Cloning of the cDNA for a Na<sup>+</sup>/*myo*-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein». *J. Biol. Chem.*, 267: 6297-6301.
- MAEHARA, M.; KINOSHITA, S.; WATANABE, K. (1988). «A simple fluorometric method for the determination of serum free carnitine». *Clin. Chim. Acta*, 171: 311-316.
- MANN, T. (1964). *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. Nova York: John Wiley and Sons.
- NG, C. M.; BLACKMAN, M. R.; WANG, C.; SWERDLOFF, R. S. (2004). «The role of carnitine in the male reproductive system». *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1033: 177-188.
- O'NEILL, R. B.; DILLON, S. A.; MORGAN, P. M. (1998). «A coupled enzyme assay for *myo*-inositol». *Biochem. Soc. Trans.*, 26, S84.
- RODRIGUEZ, C. M.; LABUS, J. C.; HINTON, B. T. (2002). «Organic cation/carnitine transporter, OCTN2, is differentially expressed in the adult rat epididymis». *Biol. Reprod.*, 67: 314-319.
- SCOTT, T. W.; DAWSON, R. M. C. (1968). «Metabolism of phospholipids by spermatozoa and seminal plasma». *Biochem. J.*, 108: 457-463.
- TYLER, A.; LORD ROTHSCHILD. (1951). «Metabolism of sea urchin spermatozoa and induced anaerobic motility in solution of amino acids». *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 76: 52.
- VOGLMAYR, J. (1974). «Alpha-chlorohydrin-induced changes in the distribution of free *myo*-inositol and prostaglandin F<sup>2a</sup>, and synthesis of phosphatidylinositol in the rat epididymis». *Biol. Reprod.*, 11: 593-600.
- VOGLMAYR, J. K.; AMANN, R. P. (1973). «The distribution of free *myo*-inositol in fluids, spermatozoa and tissues of the bull genital tract and observations on its uptake by the rabbit epididymis». *Biol. Reprod.*, 8: 504-513.
- YEUNG, C. H.; ANAPOLSKI, M.; SETIAWAN, I.; LANG, F.; COOPER, T. G. (2004). «Effects of putative epididymal osmolytes on sperm volume regulation of fertile and infertile *c-ros* transgenic mice». *J. Androl.*, 25: 216-223.



## **EFFECTE DE L'ADDICIÓ DE PROSTAGLANDINA F<sub>2α</sub> SOBRE LA QUALITAT ESPERMÀTICA DE LES EJACULACIONS DE MASCLES REPRODUCTORS PORCINS**

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

Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana, Departament de Biologia, Institut de Tecnologia Agroalimentària, Facultat de Ciències, Universitat de Girona  
Campus Montilivi, s/n. 17071 Girona. [marc.yeste@udg.es](mailto:marc.yeste@udg.es).

### *Resum*

L'hormona prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) ha estat emprada per a augmentar l'eficàcia reproductiva de les truges. L'objectiu d'aquest estudi fou determinar els efectes de la PGF<sub>2α</sub> sobre la qualitat espermàtica. Així, es van assajar cinc concentracions diferents de prostaglandina (2,50, 5, 10, 12,50 i 25 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml) afegides a dosis seminals refrigerades i destinades a inseminació artificial, procedents de catorze mascles reproductors porcins de la raça Piétrain. Les mostres foren incubades durant 30 min i la qualitat espermàtica fou determinada mitjançant l'anàlisi de la viabilitat, la motilitat i la morfologia espermàtiques, i també el test de resistència osmòtica (ORT). L'anàlisi estadística dels resultats es va dur a terme mitjançant una ANOVA d'un factor amb un nivell de significació ( $\alpha$ ) de 0,05. Es va observar que les concentracions superiors a 12,5 mg/100 ml de PGF<sub>2α</sub> eren citotòxiques, mentre que concentracions inferiors no afectaven els espermatozoides. Així doncs, la PGF<sub>2α</sub> pot ésser utilitzada com a additiu en les dosis seminals en un rang de concentracions igual o inferior a 12,5 mg/100 ml de PGF<sub>2α</sub>.

### *Abstract*

In swine, prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) has been used to improve reproductive performance in swine. The goal of the present work was to determine how the addition of prostaglandin F<sub>2α</sub> affects boar sperm quality. With this purpose, 5 different treatments were performed. Thus, 2.50, 5, 10, 12.50 and 25 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml were added to diluted sperm samples from 14 post-pubertal Piétrain boars selected for artificial insemination (AI). Seminal samples were incubated for 30 min and sperm quality was then tested, for sperm viability, motility, morphology and osmotic resistance test. Statistical analyses were performed using a one-way ANOVA and significance level was set at 0.05. Concentrations of PGF<sub>2α</sub> higher than 12.5 mg/100 ml were cytotoxic while the others did not damage boar spermatozoa. Thus, the other treatments may be used to produce their profitable effects without adverse effects.

## **INTRODUCCIÓ**

La inseminació artificial (AI) ha esdevingut una pràctica rutinària per a la indústria ramadera porcina. La biotecnologia de la reproducció animal s'ha orientat, sovint, en la recerca d'estratègies destinades a augmentar el rendiment dels programes de les AI. És per això que s'ha assajat l'addició de substàncies a les dosis seminals o s'han injectat diversos fàrmacs a les femelles amb l'objectiu d'augmentar les taxes de no retorn a l'estre (NRR), de fecunditat i de prolificitat (Traas i Kustritz, 2004).

Les prostaglandines són eicosanoides, presents en molts teixits dels vertebrats, que duen a terme funci-

ons clau en un ventall força ampli de processos fisiològics (Kingsley *et al.*, 2005).

Concretament, pel que fa a la biologia de la reproducció, les prostaglandines es troben al fluid seminal (Templeton *et al.*, 1978) i al moc cervical (Charbonnel *et al.*, 1982). En humans, s'han estudiat els efectes de diferents tipus de prostaglandines sobre la funció espermàtica (19-OH-PGE, 19-OH-PGF, PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>1α</sub> i PGF<sub>2α</sub>) (Bendvold *et al.*, 1984). La PGF<sub>2α</sub> és un agent contràctil molt important que actua localment sobre la musculatura de l'úter (Gustafsson *et al.*, 1975; Gamcick *et al.*, 1980). L'administració de la PGF<sub>2α</sub> en truges influeix en el transport d'oòcits i en la interacció espermatozoide-zona

pellúcida i en el desenvolupament embrionari (Mwanza *et al.*, 2002).

L'objectiu del present estudi és determinar els efectes de l'addició de diferents concentracions de PGF<sub>2α</sub> en la viabilitat, motilitat i morfologia espermàtiques, la integritat de l'acrosoma i de la beina mitocondrial i la resistència osmòtica dels espermatozoides (ORT) de dosis seminals refrigerades i destinades a AI.

## MATERIAL I MÈTODES

### Obtenció de les dosis seminals

Les dosis seminals foren obtingudes a partir de catorze mascles postpuberals de la raça Piétrain. Els mascles es trobaven confinats en naus climatitzades amb condicions controlades de temperatura i humitat relativa i alimentats mitjançant una dieta ajustada i controlada. Les mostres foren obtingudes mitjançant la tècnica de masturbació manual i munta sobre el maniquí. La fracció rica de l'ejaculació fou filtrada, per eliminar la fracció gelatinosa i diluïda en una relació 1:5 (v/v) amb diluent BTS (Beltsville thawing solution, Cidosa, Tecnovit).

### Concentracions de PGF<sub>2α</sub>

Després de dur a terme diverses proves preliminars, es decidí analitzar cinc tractaments diferents de PGF<sub>2α</sub> (Dinolytic®, Pharmacia, 5 mg PGF<sub>2α</sub>/ml). Les concentracions finals foren 2,50 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml, 5 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml, 10 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml, 12,50 mg

PGF<sub>2α</sub>/100 ml i 25 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml. El control es definí com a concentració 0 mg PGF<sub>2α</sub>/100 ml. Després de l'addició dels tractaments, les mostres foren incubades durant 30 min a 37° C. La viabilitat, motilitat i morfologia espermàtiques, la integritat de la beina mitocondrial i de l'acrosoma i la resistència osmòtica dels acrosomes fou determinada tant per al control com per als diferents tractaments.

### Determinació de la viabilitat espermàtica i de la integritat de la beina mitocondrial i l'acrosoma

La viabilitat espermàtica i la integritat de la beina mitocondrial i de l'acrosoma foren determinades mitjançant un marcatge múltiple amb fluorocroms, i l'observació posterior al microscopi d'epifluorescència (Leica DMLR-XA) a 400 augments (Objectiu: Leica 40X 1.32 HCX PL APO). Les mostres foren marcades amb els fluorocroms seguint el protocol descrit per Bussalleu *et al.* (2005): 1) Hoestch 33258 (específic per a cèl·lules viables; Sigma, St. Louis, MO, EUA), 2) iodur de propidi (específic per a cèl·lules no viables; Sigma, St. Louis, MO, EUA), 3) Mitotracker® Green FM fluorochrome (específic per a la funció del mitocondri; Molecular Probes®, Eugene, OR, EUA) i 4) el conjugat format per la lectina *trypsin inhibitor* (SBTI, procedent de la llavor de soja) i el fluorocrom Alexa Fluor® 488 (específic per a l'acrosoma; Molecular Probes®, Eugene, OR, EUA). Per a cada mostra, es feren tres recomptes de 100 espermatozoides cadascun. Els espermatozoides foren considerats com a viables quan presentaven el nucli, l'acrosoma i la beina mitocondrial intactes. La

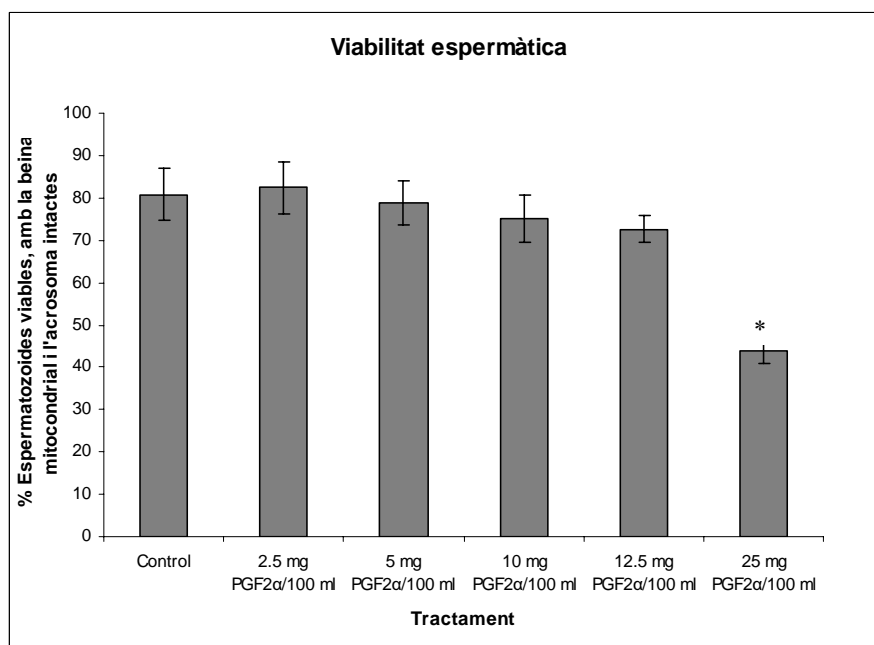


Figura 1 Viabilitat espermàtica. (\*)  $p < 0,05$  respecte del control.

resta d'espermatozoides, és a dir, aquells que presentaven com a mínim el nucli, l'acrosoma o la beina mitocondrial malmesos, foren considerats com a no viables.

### **Determinació de la motilitat espermàtica i d'altres paràmetres cinètics**

La motilitat i la velocitat espermàtiques foren avaluades a 37° C mitjançant el sistema CASA (*computer assisted sperm analyser*), que consistia en un microscopi òptic de contrast de fases (Olympus BX41) i el programari Sperm Class Analyzer (SCA® motility module, Microptic, Barcelona). Per a cada anàlisi, 15 µl de mostra foren dipositades en una cambra de Makler (Selfi-Medical Instruments, Haifa, Israel), prèviament atemperada a 37° C, i observades emprant un objectiu Olympus 10× 0.30 PLAN de contrast de fases negatives. En cada cas, s'analitzaren com a mínim 1.000 espermatozoides. Aquest sistema CASA proporciona per a cada mostra els paràmetres de motilitat i de cinètica espermàtiques següents: percentatge d'espermatozoides mòbils progressius (PMOT, %), percentatge d'espermatozoides mòbils totals (MOT, %), velocitat curvilínia (VCL, µm/s), velocitat mitjana de la trajectòria (VAP, µm/s), velocitat rectilínia (VSL, µm/s), amplitud del desplaçament lateral del cap (ALH, µm); freqüència de batec del cap (BCF, Hz), percentatge de linearitat (LIN, %), percentatge de rectitud (STR, %) i percentatge d'oscil·lació (WOB, %) (Verstegen *et al.*, 2002).

### **Determinació de la morfologia espermàtica**

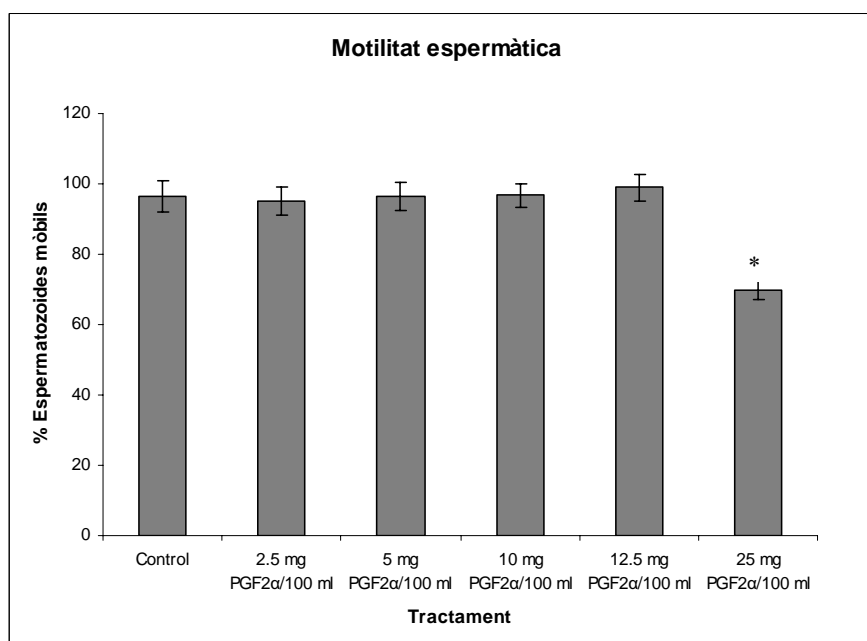
La morfologia espermàtica fou avaluada també mitjançant el sistema CASA i el mòdul de producció del programari Sperm Class Analyser (SCA® 2002 Production module, Microptic, Barcelona). Per a cadascuna de les anàlisis, es dipositaren 5 µl de mostra sobre un portaobjectes i s'incubà durant 30 min a 25° C de temperatura i 100 % d'humitat relativa, per tal d'immobilitzar els espermatozoides. Les mostres foren observades a 200 augments (amb un objectiu Olympus 20 × 0.40 PLAN de contrast de fases positives. Es feren tres recomptes de 100 espermatozoides cadascun, i es van classificar en madurs, immadurs i aberrants (diferenciant morfoanomalies de la cua i del cap de l'espermatozoide) (OMS, 2000).

### **Test de resistència osmòtica (ORT)**

La resistència osmòtica es va assajar seguint el protocol descrit per Rodríguez-Gil i Rigau (1995). Les mostres foren diluïdes (1:9) en una solució hipotònica (1 % Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (w/v), pH 7.4, 102 ± 3 mOsm·Kg<sup>-1</sup>) o una solució isotònica (3.2 % Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (w/v), pH 7.4, 304 ± 7 mOsm·Kg<sup>-1</sup>). S'incubà a 37° C durant 1 h, s'aplicà un mètode de doble marcatge (tinció Giemsa) i es comptaren els percentatges de viabilitat espermàtica i acrosomes alterats. Posteriorment, s'aplicà la fórmula descrita per Sánchez (1991).

### **Anàlisi estadística dels resultats**

Els resultats obtinguts com a percentatges (x) foren



**Figura 2** Motilitat espermàtica. (\*)  $p < 0,05$  respecte del control.

prèviament estandarditzats mitjançant la transformació arcsin  $\sqrt{x}$ . Es dugué a terme una ANOVA d'un factor, considerant el tractament com a factor i el paràmetre descriptor de la qualitat (PMOT, VCL, ORT, ...) com a variable dependent. La comparació entre tractaments es féu mitjançant el test post-hoc de Scheffé. L'anàlisi estadística dels resultats es va dur a terme utilitzant el paquet estadístic SPSS per Windows (versió 13.0). El nivell de significació ( $\alpha$ ) fou establert a 0,05. Els resultats es van expressar com a mitjana  $\pm$  error estàndard de la mitjana (SEM).

## RESULTATS

La figura 1 mostra el percentatge d'espermatozoides viables amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes (mitjana  $\pm$  SEM) per a cada tractament. S'observà una disminució significativa d'aquest percentatge quan la concentració de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  era de 25 mg/100 ml, en comparació amb el control ( $p < 0,05$ ). No s'observaren, en canvi, diferències significatives entre el control i la resta de tractaments ( $p > 0,05$ ).

A la figura 2 es mostren els resultats del percentatge d'espermatozoides mòbils totals (mitjana  $\pm$  SEM). S'observà una reducció significativa ( $p < 0,05$ ), respecte el control, de la motilitat espermàtica en el tractament de 25 mg/100 ml PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . No s'observaren diferències significatives en els altres tractaments. La motilitat progressiva (PMOT) i els altres paràmetres cinètics (VCL, VAP, VSL, BCF, LIN, STR i WOB) (les dades no es mostren) es veuen significativament reduïts ( $p < 0,05$ ) per la concentració de 25 mg/100 ml PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , però no en els altres tractaments. No s'observaren diferències significatives ( $p > 0,05$ ) entre el control i els cinc tractaments per ALH.

No s'observaren diferències significatives entre el control i els respectius tractaments ( $p > 0,05$ ) quan s'analitzà la morfologia espermàtica. En canvi, pel que fa a l'ORT, la resistència osmòtica es veié significativament reduïda ( $p < 0,05$ ) en el tractament de 25 mg/100 ml PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . No s'observaren diferències significatives en els altres tractaments.

## DISCUSSIÓ

La contracció del miometri té un paper bàsic en la fecundació, perquè gràcies a aquestes contraccions els espermatozoides poden arribar a la regió de l'oviducte, en la qual es produeix la fusió de l'oòcit amb l'espermatozoide (Kos i Bilkei, 2004). L'administració via intravenosa o l'additivació de l'ejaculació amb hormones que tenen aquest acció uterotòni-

ca s'ha dut a terme en porcí, utilitzant oxitocina (Odendhal *et al.*, 1990), prostaglandina (Gil *et al.*, 1998) i estradiol (Kirwood i Tacker, 1991).

L'objectiu d'aquest estudi era conèixer els efectes de l'additivació amb l'ecosainoide PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  sobre la qualitat espermàtica de les dosis seminals refrigera- des i destinades a AI.

En concentracions superiors a 12,5 mg/100 ml, la PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  té un efecte deleteri sobre la viabilitat espermàtica, malmet la integritat de l'acrosoma i en compromet la resistència enfront de canvis d'osmolaritat. A més, la concentració de 25 mg/100 ml sembla tenir un efecte supressor de la motilitat espermàtica, que s'observa analitzant diferents paràmetres, probablement provocat per la seva citotoxicitat, encara que aquest efecte també es podria atribuir no solament a aquesta, sinó a d'altres causes. En qualsevol cas, els estudis que s'havien dut a terme fins ara no havien mostrat aquest efecte citotòxic i supressor de la motilitat, perquè s'havien assajat concentracions que corresponien a un rang inferior a 25 mg/100 ml (Cheng *et al.*, 2001; Maes *et al.*, 2002). Per tant, i atès que la PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  té un efecte contràctil d'acció local sobre l'úter, de manera que la seva utilització pot augmentar l'eficiència i l'eficàcia de l'AI (Baldi *et al.*, 1991; Sbracia *et al.*, 1997; Friel *et al.*, 2005), es pot concloure que aquesta hormona pot ésser addicionada a la dosi seminal en concentracions inferiors a 25 mg/100 ml sense que això produeixi efectes nocius sobre la qualitat espermàtica, amb l'objectiu de millorar els resultats de l'AI en porcí.

## BIBLIOGRAFIA

- BALDI, E.; CASANO, R.; CONSTANZA, F. (1991). «Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa». *J. Androl.*, 12: 323-330.
- BENDVOLD, E.; SVANBORG, K.; ENEROTH, P.; GOTTLIEB, C.; BYGDEMAN, M. (1984). «The natural variations in prostaglandin concentration in human seminal fluid and its relation to sperm quality». *Fertil. Steril.*, 41(5): 743-747.
- BUSSALLEU, E.; PINART, E.; YESTE, M.; BRIZ, M.; SANCHE, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; BASSOLS, J.; PRUNEDA, A.; CASAS, I.; BONET, S. (2005). «Development for a protocol for multiple staining with fluorochromes to assess the functional status of boar spermatozoa». *Microsc. Res. Tech.*, 68(5), 227-283.
- CHARBONNEL, B., KREMER, M., GEROZISSIS, K., DRAY, F. (1982). «Human cervical mucus contains large amounts of prostaglandins». *Fertil. Steril.*, 38(1): 109-111.
- CHENG, H.; ALTHOUSE, G. C.; HSU, W. H. (2001). «Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  added to extended boar semen at

- processing elicits in vitro myometrial contractility after 72 hours of storage». *Theriogenology*, 55: 1901-1906.
- FRIEL, A. M.; O'REILLY, M. W.; SEXTON, D. J.; MORRISON, J. J. (2005). «Specific PGF<sub>2α</sub> receptor (FP) antagonism and human uterine contractility *in vitro*». *International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 112: 1034-1042.
- GAMCIK, P.; MESAROS, P.; SCVARC, F. (1980). «Influence of prostaglandins on fertility of sheep with the use of deep-frozen sperm». *Proc. 9th International Conference Animal Reproduction and AI. Madrid*, 3: 149.
- GIL, J.; CHICO, J.; GIL, O.; LÓPEZ, A. (1998). «Increasing swine prolificacy by adding Dinolytic to semen doses». *Proc. 15th IPVS Congress*, 216.
- GUSTAFFSON, B.; EDQVIST, S.; EINARSSON, S.; LINGE, F. (1975). «Fertility of deep frozen ram semen supplemented with PGF<sub>2α</sub>». *Acta Veterinaria Scandinavica*, 16: 468-470.
- KINGSLEY, P. J., ROUZER, C. A., SALEH, S., MARNETT, L. J. (2005). «Simultaneous analysis of prostaglandin glyceryl esters and prostaglandins by electrospray tandem mass spectrometry». *Anal. Biochem.*, 343(2): 203-11.
- KIRWOOD, R. N., THACKER, P. A. (1991). «The influence of adding estradiol to semen on reproductive performance of sows». *Can. J. Anim. Sci.*, 71: 589-591.
- KOS, M.; BILKEI, G. (2004). «Prostaglandin F<sub>2α</sub> supplemented semen improves reproductive performance in artificially inseminated sows». *Anim. Reprod. Sci.*, 80(1-2): 113-120.
- MAES, D. G. D.; MATEUSEN, T.; RIJSSELAERE, T.; DE VliegHER, S.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. (2003). «Motility characteristics of boar spermatozoa after addition of prostaglandin F<sub>2α</sub>». *Theriogenology*, 60: 1435-1443.
- MWANZA, A. M.; EINARSSON, S.; MADEJ, A.; LUNDEHEIM, N.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; KINDAHL, H. (2002). «Postovulatory effect of repeated administration of prostaglandin F<sub>2α</sub> on the endocrine status, ova transport, binding of accessory spermatozoa to the zona pellucida and embryo development of recently ovulated sows». *Theriogenology*, 58(6): 1111-1124.
- ODENHAL, F.; BARTH, T.; JOST, K. (1990). «The effect of Depotocin (carbetocin) added to insemination doses of boar semen on the conception rate of sows and their fertility». *Pig News Info*, 11: 203.
- OMS (2000). *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Sperm and Sperm-Cervical Mucus Interaction*, 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; RIGAU, T. (1995). «Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar semen». *Anim. Reprod. Sci.*, 39: 141-146.
- SÁNCHEZ, R. (1991). «Control de la calidad espermática». *Anaporc.*, 104: 27-33.
- SBRACIA, M.; GRASSO, J.; SYAME, N.; STRONK, J.; HUSZAR, G. (1997). «Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa». *Hum. Reprod.*, 12(9): 1949-1954.
- SCHILLING, E.; VENGUST, M.; BAJT, G.; TOMCIC, M. (1986). «The osmotic resistance (ORT) of boar spermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size». *9th IPVS Congress*, Barcelona, p. 77.
- TEMPLETON, A. A.; COOPER, I.; KELLY, R. C. (1978). «Prostaglandin concentration in the semen of fertile men». *J. Reprod. Fertil.*, 52: 147-150.
- TRAAS, A. M.; KUSTRITZ, M. V. R. (2004). «Effect of administering oxytocin or prostaglandin F<sub>2α</sub> on characteristics of the canine ejaculate». *Can. Vet. J.*, 45: 999-1002.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. (2002). «Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice». *Theriogenology*, 57: 149-179.





## CORRELACIÓ DE PROTEÏNES DE L'ESPERMATOZOIDE HUMÀ AMB LA INTEGRITAT DEL DNA, AMB EL CONTINGUT DE PROTAMINES I AMB ELS NIVELLS DE PRECURSOR DE PROTAMINA 2

Sara de Mateo,<sup>1</sup> Juan Martínez-Heredia,<sup>1</sup> Jose Manuel Vidal-Taboada,<sup>1</sup> David Domínguez-Fandos,<sup>1</sup>  
Josep M. Estanyol,<sup>3</sup> Jose Luis Balleca,<sup>2</sup> Rafael Oliva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratori de Genètica Humana, Grup de Genètica Humana, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, IDIBAPS

Casanova, 143. 08036 Barcelona. [roliva@ub.edu](mailto:roliva@ub.edu).

<sup>2</sup>Unitat de Reproducció Assistida, ICGON, Hospital Clínic, IDIBAPS

[balleca@clinic.ub.es](mailto:balleca@clinic.ub.es).

<sup>3</sup>Unitat de Proteòmica, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, SCT-PCB-IDIBAPS

[jmestanyol@ub.edu](mailto:jmestanyol@ub.edu).

---

### Resum

La tècnica de gels bidimensionals ha permès descriure al voltant de 98 proteïnes que es troben a l'espermatozoide humà (Martínez-Heredia *et al.*, 2006). Aquest treball ha caracteritzat una gran diversitat de proteïnes pel que fa a la seva localització i funció. Estudis de fertilitat masculina indiquen que la integritat del DNA, la relació de protamines i la presència de precursor de protamina P2 són de gran importància (Torregrosa *et al.*, 2006). Per tant, en aquest estudi s'ha caracteritzat la relació en l'expressió d'algunes d'aquestes proteïnes amb paràmetres com la relació P1/P2, la presència de precursors de P2 i el dany en el DNA amb la tècnica de TUNEL. També s'ha trobat una gran quantitat de proteïnes en què l'expressió es correlaciona molt significativament amb l'expressió d'altres proteïnes. Això ens pot portar a identificar la funció d'aquestes proteïnes a l'espermatozoide humà i, per tant, a esbrinar algunes causes d'infertilitat masculina i, en futurs estudis, la possible utilitat diagnòstica i de tractament.

**Paraules clau** Infertilitat, proteòmica, protamina P2, precursor de protamina P2 (preP2), TUNEL.

### Abstract

2D SDS-PAGE assay has allowed us to describe around 98 proteins of the human spermatozoa (Martínez-Heredia *et al.*, 2006). This study has identified a large diversity of proteins with different localization and function. It is also known that the DNA integrity, the protamine ratio and the detection of protamine P2 precursor are important in the study of human fertility (Torregrosa *et al.*, 2006). Therefore, in this study we have described the relation between the protein expression of some proteins of the human spermatozoa and the P1/P2 ratio, the presence of P2 precursor and the DNA integrity by TUNEL assay. We have also found a large number of protein with a expression that correlates with that of other proteins at a high significance. These findings could allow us to identify the function of these proteins in the human spermatozoa and to identify some causes of male infertility. In further studies it may also be useful as a diagnosis tool or to orient the treatment.

**Key words** Infecundity, proteomics, protamines, protamine P2 precursor (preP2), TUNEL assay.

---

## INTRODUCCIÓ I METODOLOGIA

L'espermatozoide humà conté una gran multitud d'altres proteïnes a més de les ja esmentades protamines que compacten el DNA (Oliva i Dixon, 1991). Actualment s'està intentat esbrinar quines són aquestes proteïnes addicionals. Tot i així, el contin-

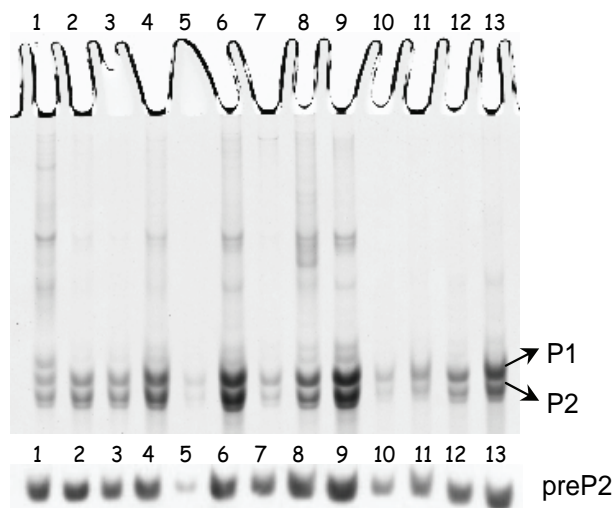
gut de proteïnes de l'espermatozoide humà ja es troba parcialment descrit amb la utilització de la tècnica de gels bidimensionals i la tecnologia MALDI-TOF en l'article del nostre grup publicat a *Proteomics* (Martínez-Heredia *et al.*, 2006). En aquest treball es van picar els *spots* més intensos dels gels 2D i es van identificar 98 proteïnes diferents.

Les protamines són les encarregades d'empaquetar el nucli de l'espermatozoide dins d'una estructura compacta i aerodinàmica gràcies a l'elevada proporció d'arginines que conté la seva seqüència. Una relació de protamines (P1/P2) anòmala i la presència de precursor de protamina P2 (preP2/P2) en els espermatozoides humans està relacionat amb infertilitat (Balhorn *et al.*, 1988; de Yebra *et al.*, 1993, 1998; Aoki *et al.*, 2005; Torregrosa *et al.*, 2006). A més, la valoració del dany al DNA amb la tècnica de TUNEL, que ens permet identificar les cèl·lules apoptòtiques, també mostra una relació amb la infertilitat masculina (Oosterhuis *et al.*, 2000; Torregrosa *et al.*, 2006).

Totes aquestes dades ens han dut a fer aquest estudi, en què es volen trobar relacions entre l'expressió de certes proteïnes de l'espermatozoide humà i els paràmetres ja descrits com a importants per a la infertilitat humana masculina. Sobretot volem identificar aquelles proteïnes que tenen diferències significatives i esbrinar la seva funció en l'espermatozoide i la seva relació amb la causa de la infertilitat.

### Mostres

Aquest estudi s'ha fet amb 44 mostres de semen humà de la Unitat de Reproducció Assistida de l'Hospital Clínic de Barcelona, amb el previ consentiment informat dels pacients, i 10 donants de semen com a controls. D'aquestes 54 mostres es van fer gels 2D amb dues o més rèpliques per augmentar la fiabilitat



**Figura 1** Gel de poliacrilamida acídica tenyit amb Comassie Blue en què es poden observar la protamina P1 i protamina P2 de diverses mostres (carrils 1 al 9) i de l'estàndard de protamines (carrils 10 al 13). A sota veiem una membrana híbrida amb l'anticòs contra el precursor de la protamina P2 (preP2) i la seva detecció quimioluminiscent. Aquest Western Blot correspon a la rèplica del gel tenyit amb Comassie que observem a sobre.

dels resultats. Es va determinar el dany del DNA amb la tècnica de TUNEL de 30 mostres, i la relació de protamines i la determinació de presència de preP2 de 34 mostres. A l'estadística s'han fet servir 101 *spots* dels gels 2D per tal de comparar la intensitat normalitzada d'aquests amb estratificació amb P1/P2, preP2/P2 i dany nuclear.

### Determinació de l'expressió de les proteïnes amb gels bidimensionals

Els gels 2D es van fer segons la metodologia descrita a l'article de Martínez *et al.* (2006). Es van seleccionar els espermatozoides de les altres cèl·lules amb un gradient de Percoll al 50 % (Mengual *et al.*, 2003), es van lisar les cèl·lules i les proteïnes es van separar segons el seu punt isoelèctric (primera dimensió) en tires de 17 cm i un pH de 5 a 8. La segona dimensió o separació per pes molecular es va fer amb gels de SDS al 12 % d'acrilamida. Amb tinció argèntica es van posar de manifest els *spots* que componen les proteïnes de l'espermatozoide. La densitat normalitzada d'un conjunt de 101 *spots* es va determinar amb el programari de BioRad PD-Quest. S'aparellen (*matching*) els *spots* que tenen el mateix punt isoelèctric i el mateix pes molecular com la mateixa proteïna i es comparen les densitats d'aquests entre grups de pacients.

### Determinació de la relació P1/P2 i preP2/P2

L'extracció i determinació de la relació de protamines i la presència de precursor de P2 es troba descrita a l'article del nostre grup de Torregrosa *et al.* (2006). Es van extreure les proteïnes nuclears segons el protocol descrit a de Yebra *et al.* (2005). Aquestes es van separar amb un gel de poliacrilamida acídica per replicat. Un dels gels es va tenyir amb Comassie Blue i l'altre es va transferir a una membrana per a la determinació de precursor de preP2 mitjançant immunotinció quimioluminiscent i Western Blot (figura 1). La membrana es va hibridar amb l'anticòs contra preP2 i es va detectar amb un anticòs secundari que genera un producte quimioluminiscent. Les densitats de P1 i P2 del gel tenyit amb Comassie i la densitat de la banda de preP2 del gel transferit es van determinar amb el programari de BioRad Quantity One.

### Determinació del dany del DNA amb TUNEL

La determinació del dany nuclear o d'apoptosi es va fer segons Torregrosa *et al.* (2006). Es va identificar el percentatge d'espermatozoides TUNEL positius de cada mostra (caps amb fluorescència verda forta)

fent servir l'observació al microscopi òptic de fluorescència amb dos observadors.

### Anàlisi estadística

Mitjançant el programa estadístic SPSS es van determinar les diferències de densitats dels *spots* estratificant segons els paràmetres abans esmentats amb la prova estadística no paramètrica Mann-Whitney. Es van estratificar les mostres segons la relació de protamines en quatre grups: donants, mostres amb P1/P2 normal ( $<$  mitjana dels donants  $\pm$  una desviació estàndard  $<$ ), mostres amb P1/P2 baixa ( $<$  mitjana donants  $\pm$  una desviació estàndard) i mostres amb P1/P2 alta ( $>$  mitjana  $\pm$  desviació estàndard) i es van comparar aquests grups de dos en dos. Es van analitzar estadísticament les diferències d'expressió de proteïnes entre les mostres amb valors extrems de precursor de protamina P2 i de percentatge d'esper-

matozoides TUNEL positius. Les correlacions d'Spearman de les proteïnes amb diferències significatives també es van caracteritzar. A més, es va explorar la possibilitat de trobar proteïnes que tenen una expressió que es correlaciona amb l'expressió d'una altra proteïna. Sorprenentment, es va trobar un conjunt de proteïnes que sembla que es troben relacionades pel que fa a la seva expressió. Es determina una diferència significativa amb  $p < 0,05$  tant per Mann-Whitney com per Spearman.

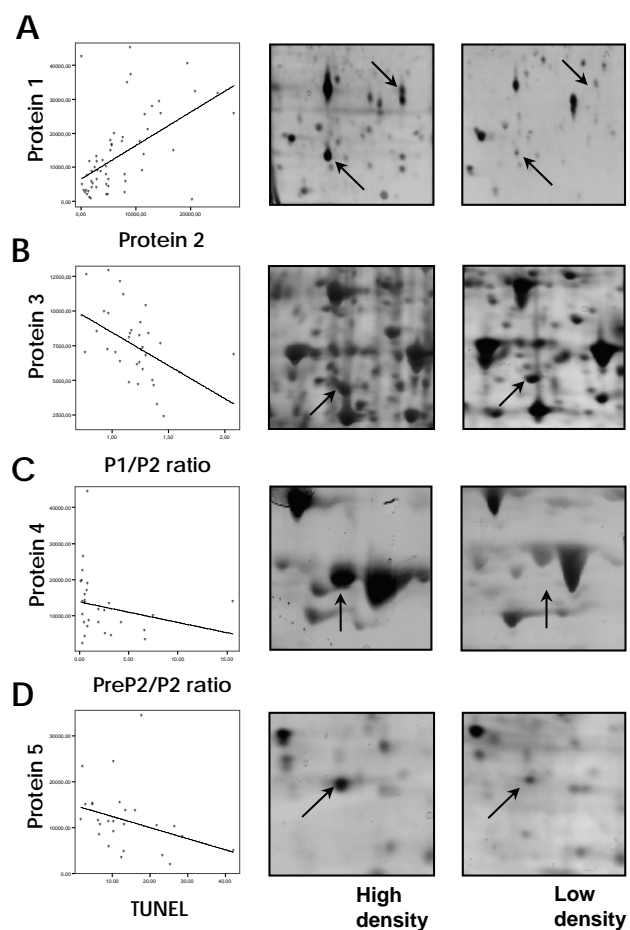
### RESULTATS I DISCUSSIÓ

Estratificant les mostres amb valors de protamines trobem que 20 proteïnes tenen expressió diferencial entre els donants (mitjana = 1,23; desv. est. = 0,16) i les mostres amb P1/P2 normal (1,07-1,39), 16 proteïnes entre donants i mostres amb P1/P2 baixa ( $<$  1,07) i 9 proteïnes entre donants i mostres amb P1/P2 alta ( $>$  1,39). També s'han trobat altres proteïnes que tenen diferències d'expressió comparant les densitats d'aquestes entre els grups de mostres amb P1/P2 normal, baixa i alta. Només una de totes aquestes proteïnes té una correlació significativa amb P1/P2 (figura 2B).

La determinació de la presència de precursor de P2 i la comparació entre les mostres amb més i menys quantitat de preP2 ens indica que hi ha quatre proteïnes que tenen significativament diferent la seva expressió. Hi ha vuit proteïnes més que es troben sobreexpressades a les mostres amb més proporció d'espermatozoides TUNEL positius i una proteïna subexpressada en aquest grup extrem. Tant les quatre proteïnes trobades amb preP2/P2 i les nou amb TUNEL presenten correlacions significatives amb el paràmetre estudiat (figura 2C i D).

Per finalitzar, hem trobat 64 parells de proteïnes en què la seva expressió es correlaciona amb una significació menor de 0,001 i un coeficient de correlació major de  $\pm 0,5$  (figura 2A).

Determinem com a valor de normalitat de relació P1/P2 la mitjana dels donants utilitzats en aquest estudi  $\pm$  una desviació estàndard. Així, hem agrupat els pacients segons el seu valor de P1/P2 en quatre grups: P1/P2 normal, baixa, alta i donants. Comparant les densitats de les proteïnes entre el grup de donants i el grup de pacients amb P1/P2 normal observem que hi ha un gran nombre de proteïnes amb diferències d'expressió. Això ens pot indicar que hi ha altres anomalies en l'espermatozoide, que no es relacionen amb el contingut de protamines, i que fan que els pacients tinguin problemes de fertilitat. Aquestes altres anomalies en l'espermatozoide poden estar relacionades amb aquestes proteïnes dife-



**Figura 2** A) Diagrama de dispersió d'un parell de proteïnes que tenen una correlació d'Spearman  $<$  0,001 i un coeficient de correlació  $>$  0,5. Al costat dret veiem la comprovació visual de la diferència d'expressió d'aquestes dos proteïnes. B) Diagrama de dispersió d'una proteïna que té una correlació significativa ( $P < 0,05$ ) amb P1/P2. C) PreP2/P2 i D) TUNEL, i al costat dret les comprovacions visuals de cadascuna.

rencials. Com calia esperar, també trobem una gran varietat de proteïnes que es trobem més o menys expressades en pacients amb P1/P2 baixa o alta comparat amb els donants. Aquestes proteïnes són de gran importància, ja que ens poden portar a identificar quines són importants en l'empaquetament correcte del nucli espermàtic i, per tant, quines són importants en la fertilitat masculina.

La reducció de protamina 2 i l'augment del seu precursor també es relacionen amb la mala qualitat dels espermatozoides (de Yebra *et al.*, 1998). Hem trobat un conjunt de proteïnes que tenen expressió diferencial entre els grups de pacients amb elevat i baix contingut de preP2. L'estudi d'aquestes proteïnes també ens podria indicar les causes o conseqüències de l'elevada presència de precursor i, per tant, la seva relació amb la infertilitat.

Pel que fa a la integritat del DNA, se sap que un elevat dany provoca una reducció de la viabilitat dels espermatozoides i que aquest dany està relacionat amb el contingut de protamines (Aoki *et al.*, 2006; Torregrosa *et al.*, 2006). Això ens indica que les proteïnes que es troben sub o sobreexpressades en els espermatozoides amb elevat dany al DNA són importants per a futurs estudis de fertilitat. Un exemple d'algunes d'aquestes proteïnes són les subunitats del proteasoma.

La troballa més sorprenent d'aquest treball és la enorme quantitat de proteïnes en què la seva expressió es troba relacionada amb l'expressió d'altres proteïnes amb una significació molt elevada ( $p < 0,001$ ). És de gran importància determinar quina relació hi ha entre aquestes proteïnes per tal de trobar quines vies moleculars poden estar afectades en la infertilitat.

Aquest treball ens està donant una gran informació per a trobar les causes moleculars d'alguns casos d'infertilitat masculina. Posteriors estudis ens ajudaran a entendre quina és la funció d'aquestes proteïnes, la seva localització en l'espermatozoide amb tècniques d'immunocitoquímica que ja s'estan posant en marxa, i la possible utilització d'aquestes proteïnes com a diagnòstic i potser com a orientació en el tractament d'algunes causes d'infertilitat humana masculina.

## AGRAÏMENTS

Subvencionat amb el projecte de recerca del Ministeri de Ciència i Tecnologia U-2006-BMC03479-O (Plan Nacional I+D) i per fons europeus. S. de M. es troba subvencionada per la beca predoctoral de la Generalitat de Catalunya FI.

## BIBLIOGRAFIA

- AOKI, V. W.; LIU, L.; CARRELL, D. T. (2005). «Identification and evaluation of a novel sperm abnormality in a population of infertile males». *Hum. Reprod.* 20: 1298-1306.
- AOKI, V. W.; EMERY, B. R.; LIU, L.; CARRELL, D. T. (2006). «Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity». *J. Androl.*, 27: 890-898.
- DE YEBRA, M.; BALLESCÀ, J. L.; VANRELL, J. A.; BASAS, L. L.; OLIVA, R. (1993). «Complete selective absence of protamine P2 in humans». *J. Biol. Chem.*, 268: 10553-10557.
- DE YEBRA, M. (1995). *Alteracions del contingut de nucleoproteïnes de les cèl·lules espermàtides. Relació amb la infertilitat en l'home*. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona.
- 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.
- MARTÍNEZ-HEREDIA, J., ESTANYOL, J. M., BALLESCÀ, J. L., OLIVA, R. (2006). «Proteomic identification of human sperm proteins». *Proteomics*, 6: 4356-4369.
- MENGUAL, L. (2003). *Infertilitat masculina: causes, factors de risc genètic i caracterització molecular dels espermatozoides*. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona.
- TORREGROSA, N.; DOMÍNGUEZ-FANDOS, D.; CAMEJO, M. I.; SHIRLEY, C. R.; MEISTRICH, M. L.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. (2006). «Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients». *Hum. Reprod.*, 21: 2084-2089.
- OLIVA, R.; DIXON, G. H. (1991). «Protamine genes and the histone to protamine replacement reaction». *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.*, 40: 25-94.
- OOSTERHUIS, G. J.; MULDER, A. B.; KALSBEK-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.

## **DIFERÈNCIES D'EXPRESSIÓ PROTEICA ENTRE MOSTRES DE PACIENTS ASTENOZOOSPÈRMICS I NORMOZOOSPÈRMICS**

Juan Martínez-Heredia,<sup>1</sup> Sara de Mateo,<sup>1</sup> José M Vidal-Taboada,<sup>1</sup>  
José Luis Ballecà,<sup>2</sup> Rafael Oliva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Grup de Genètica Humana, IDIBAPS, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona  
Casanova, 143. 08036 Barcelona. *roliva@ub.edu*.

<sup>1</sup> Servei de Genètica, Hospital Clínic i Provincial

<sup>2</sup> Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia. Hospital Clínic i Provincial  
Villarroel, 170. 08036 Barcelona.

---

### *Resum*

El nostre laboratori ha descrit parcialment el proteoma de l'espermatozoide humà. Hem descrit 98 proteïnes de funcions i vies metabòliques molt diversos (Martínez-Heredia *et al.*, 2006). En aquest treball hem comparat el patró proteòmic de mostres de pacients astenozoospermics i normozoospermics per tal de trobar diferències a l'expressió proteica. L'anàlisi estadística dels gels tenyits amb plata ens ha permès identificar set proteïnes amb diferències significatives entre els dos grups. Aquestes proteïnes s'han trobat també en un gel tenyit amb DIGE, fet que confirma aquests resultats. La combinació d'aquestes dades ens ha permès fer un arbre de relacions, que ens ha agrupat els pacients segons la mobilitat dels seus espermatozoides, i que ens ha separat els pacients normozoospermics en dos grups corresponents al «problema masculí» i al «problema femení». En definitiva, aquestes dades ens han proporcionat una sèrie de pistes importants sobre l'origen del problema dels pacients astenozoospermics.

**Paraules clau** 2D-PAGE, humà, proteoma, espermatozoide.

### *Abstract*

Our lab has partially described the proteome of human spermatozoon. We described 98 proteins, belonging to a variety of functions and metabolic pathways (Martínez-Heredia *et al.*, 2006). In this work, we have compared the proteómic content of asthenozoospermics and normozoospermics samples, in order to search for differences in protein expression. The statistical analyses of silver stained gels allow us to identify 7 proteins with statistically significant differences. These proteins have also been found in a DIGE assay, confirming these results. The combination of this data has led us to cluster a tree which groups the different patients according to its motility and separate from the normozoospermic patients into male-problem and female-problem groups. This data already provides an important clue to the identification of the origin of the problem of asthenozoospermic patients.

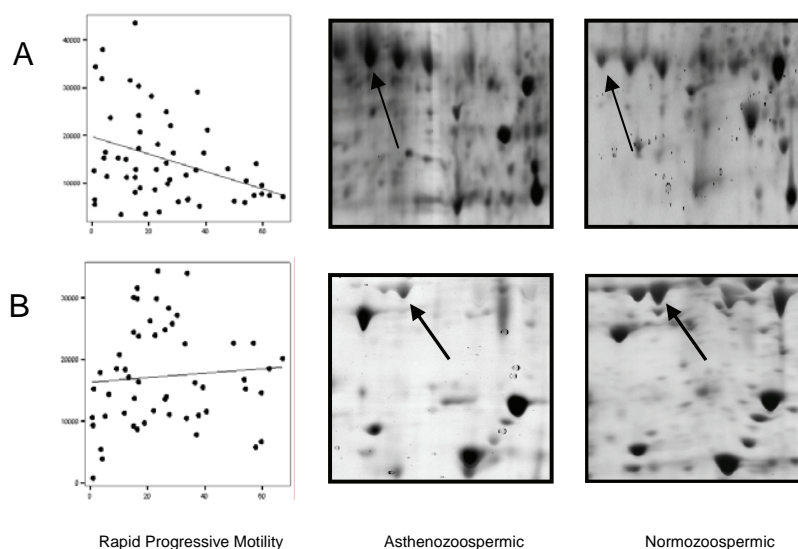
---

## **INTRODUCCIÓ I METODOLOGIA**

La infertilitat és un problema que afecta aproximadament un 10-15 % de les parelles en edat reproductiva i, aproximadament, la meitat dels casos és deguda a problemes d'origen masculí (Oliva i Ballecà, 1999). L'OMS ha establert una sèrie de paràmetres seminals per a diferenciar entre mostres normals i patològiques (OMS, 1999), però són paràmetres fonamentalment de tipus morfològic i no expliquen els casos d'infertilitat idiopàtica. Per exemple, la causa d'infertilitat en els pacients normozoospermics continua sent desconeguda. És molt probable que una

proporció important sigui deguda a mutacions recessives (Lilford *et al.*, 1994) que poden provocar alteracions en les proteïnes, alteracions que avui dia podem trobar. Per exemple, en treballs previs del nostre laboratori hem demostrat la presència d'una baixada o absència de protamina P2 en espermatozoides de pacients infèrtils (de Yebra *et al.*, 1993, 1998), a part de demostrar la importància del precursor de la P2 en temes relacionats amb la infertilitat (Torregrosa *et al.*, 2006). Però la P2 (i el seu precursor) són només una de les milers de proteïnes que es poden trobar a l'espermatozoide humà.

Després de descriure part del proteoma de l'esper-



**Figura 1** Dos exemples de proteïnes amb expressió alterada. En A tenim una proteïna que augmenta en els astenozoospermics. En B, tenim una proteïna que disminueix.

matzoide humà (Martínez-Heredia *et al.*, 2006), el següent objectiu al nostre laboratori ha estat la comparació del proteoma entre tres grups diferents: dos grups d'homes amb problemes d'infertilitat a la parella (astenozoospermics i normozoospermics) i un grup control. Es van analitzar un total de 57 homes, repartits de la següent manera: 27 pacients normozoospermics, 20 pacients astenozoospermics i 10 controls. Les ejaculacions es van tractar 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), i el *pellet* es resuspèn en el medi de lisi descrit per Pixton *et al.* (2004), format bàsicament per agents caotròpics i detergents. Es resuspèn en la quantitat suficient perquè quedi a una concentració de  $230 \times 10^6$  espermatozoides/ml (concentració òptima determinada al nostre laboratori) i es deixa lisar durant 1 h a temperatura ambient en agitació.

Una vegada lisades les mostres, es procedeix a la separació electroforètica, utilitzant el protocol de la casa comercial BioRad (2004). Es va utilitzar un aparell IPGphor, amb tires de 17 cm i un rang de pH de 5 a 8. La segona dimensió es va córrer a 300 V, durant aproximadament 3 h amb gels de poliacrilamida al 12 %. Posteriorment, es va procedir a la tinció argèntica d'aquests, seguint un protocol basat en Blum *et al.* (1987).

Els gels tenyits s'escanegen a elevada resolució amb l'escàner GS-800 (BioRad), i es guarden amb el format requerit pel programa d'anàlisi PDQuest (BioRad). Un cop analitzats tots els gels, els valors nor-

malitzats d'intensitat s'analitzen amb el programa estadístic SPSS, utilitzant el test de Mann-Whitney per a buscar diferències estadístiques entre els diferents grups en relació a la seva mobilitat linear progressiva.

A més, s'ha utilitzat el programa Cluster&TreeView amb les proteïnes diferencials per tal d'agrupar els pacients segons la seva mobilitat.

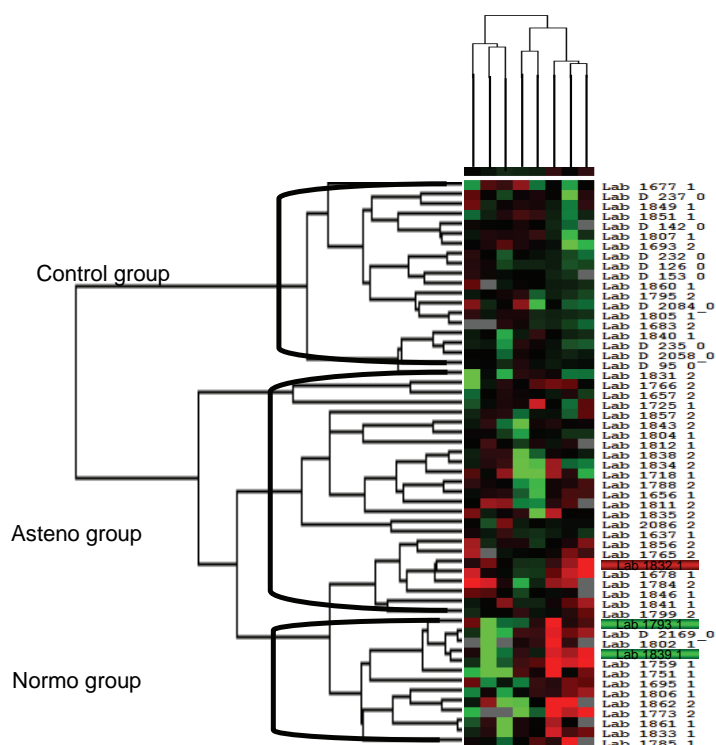
## RESULTATS I DISCUSSIÓ

El test Mann-Whitney, que compara els valors de mobilitat +++ (mobilitat ràpida progressiva) entre els quartils superior i inferior, ens dona com a resultat l'obtenció de set proteïnes amb una expressió diferencial. D'aquestes set proteïnes, cinc es troben augmentades en pacients astenozoospermics i les altres dues, reprimides. Trobem dos exemples d'aquestes proteïnes en la figura 1.

Les funcions d'aquestes proteïnes són diverses, i es troben entre aquestes tres formes precursors. L'augment dels precursors en els pacients astenozoospermics podria indicar una fallida del processament, a més d'afectar les vies on aquestes proteïnes es troben implicades.

A més, trobem entre aquestes proteïnes algunes de relacionades amb la producció d'energia. La troballa d'aquestes proteïnes es pot explicar ràpidament si tenim en compte l'elevada despesa energètica que necessita l'espermatozoide per a moure's. Qualsevol fallida en el subministrament energètic podria conduir a una reducció de la mobilitat, fet que caracteritza els astenozoospermics.





**Figura 2** Arbre que agrupa els pacients segons l'expressió de les proteïnes diferencials.

La resta de proteïnes tenen una funció «morfològica». Una alteració en la funció d'aquestes proteïnes pot conduir a canvis en la forma hidrodinàmica de l'espermatozoide, i afecta també el seu moviment.

En conjunt, aquestes proteïnes poden explicar (almenys, en part) la disminució de moviment en els pacients astenozoospermics.

Quan es mira com agrupen els patrons d'expressió d'aquestes proteïnes els pacients, ens trobem que el patró agrupa força bé els tres diferents grups. Si, a més, mirem els resultats de reproducció assistida per als pacients normozoospermics (només disponible per a tres), veiem que el pacient agrupat amb els astenozoospermics és un pacient en què s'ha determinat que el problema és d'origen masculí. Així, tot i que s'ha de confirmar amb més dades, sembla que aquestes proteïnes agrupen també els pacients normozoospermics segons si el problema a la parella és d'origen masculí o femení.

## 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.; BALLESCÀ, J. L.; VANRELL, J. A.; BASSAS, L.; OLIVA, R. (1993). «Complete selective absence of protamine P2 in humans». *J. Biol. Chem.*, 268: 10553-10557.
- DE YEBRA, 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.
- 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.
- MARTINEZ-HEREDIA, J.; ESTANYOL, J. M.; BALLESCA, J. L.; OLIVA, R. (2006). «Proteomic identification of human sperm proteins». *Proteomics*, 6(15): 4356-4369.
- 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.
- 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. [et al.] (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: 1438-1447.

- TORREGROSA, N., DOMINGUEZ-FANDOS, D.; CAMEJO, M, I.; SHIRLEY, C. R.; MEISTRICH, M. L.; BALLESCA, J. L.; OLIVA, R. (2006). «Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients». *Hum Reprod.*, 21(8): 2084-2089.

## CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DEL CROMOSOMA Y EN 2.173 PACIENTS INFÈRTILS ESTUDIATS EN ELS ÚLTIMS DEU ANYS

Cristina Gázquez,<sup>1</sup> Lucas Fares Taie,<sup>1</sup> Marta Aldea,<sup>1</sup> Josep Oriola,<sup>1</sup>  
José Luis Balleascà,<sup>2</sup> Rafael Oliva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Human Genetics Laboratory, Grup de Genètica Humana, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, IDIBAPS Casanova, 143. 08036 Barcelona. [roliva@ub.edu](mailto:roliva@ub.edu).

<sup>2</sup> Assisted Reproduction Units, ICGON, Hospital Clínic, IDIBAPS

---

### Resum

El cromosoma Y conté tres regions importants per a la fertilitat: AZFa, AZFb i AZFc. Aquestes tres regions són susceptibles de delectonar-se, cosa que produeix una alteració de l'espermatogènesi. Des del seu descobriment fins al 1996, aquestes tres regions són estudiades des del punt de vista molecular en els laboratoris de genètica pel seu interès diagnòstic per a poder establir la causa de la infertilitat i, a més a més, això permet donar un consell genètic adequat abans de realitzar un tractament de reproducció assistida, ja que aquestes microdeleccions poden ser transmeses mitjançant ICSI (*intracytoplasmatic sperm injection*, injecció intracitoplasmàtica d'esperma). En aquest estudi s'han analitzat les microdeleccions completes de les regions AZFa, AZFb i AZFc en 2.173 pacients amb problemes d'infertilitat, que eren candidats a ICSI. Els resultats de les anàlisis indiquen que 24 pacients presentaven una microdelecció de la regió AZFc, 7 pacients presentaven una microdelecció de la regió AZFb, 8 pacients no tenien ni la regió AZFb, ni la AZFc i només un pacient presentava una microdelecció de la regió AZFa. També, s'han analitzat les microdeleccions parcials de la regió AZFc en un subgrup de 688 pacients. En concret, s'han buscat tres tipus de microdeleccions de la regió AZFc: la microdelecció gr/gr, la microdelecció b1/b3 i la microdelecció b2/b3. A falta de tipar 6 pacients, de moment, s'han trobat 19 pacients amb la microdelecció gr/gr, 2 amb la b2/b3 i cap amb la microdelecció b1/b3. S'ha trobat un cas amb una nova microdelecció amb els marcadors genòmics sY1191 i sY1291 delectonats.

**Paraules clau** microdeleccions completes, microdeleccions parcials, regions AZFa, AZFb i AZFc, cromosoma Y.

### Abstract

The male chromosome Y have three important regions for fertility: AZFa, AZFb and AZFc. These regions could be deleted resulting in spermatogenesis failure. From 1996, these three molecular regions are habitual screening tests due to their diagnostic interest for infertility. Also the genetic analysis of the deletion from these regions is part of the procedures for genetic counselling prior to assisted reproduction treatments by ICSI (IntroCytoplasmatic Sperm Injection). In this study the complete microdeletions for the AZFa, AZFb and AZFc regions have been analysed in 2173 patients featuring infertility problems and potentially candidates to ICSI treatment. The genetic results indicates that 24 patients have a deletion of the AZFc region, 7 have a deletion of the AZFb region, 8 patients have deletions of the AZFb+c regions, and an unique individual have a deletion of the AZFa region. Also, in a subgroup of 688 patients, the following partial microdeletion for the AZFc region have been analysed: the gr/gr, the b1/b3 and the b2/b3 microdeletions. Pending the genotyping of 6 individuals, until present 19 patients have a gr/gr microdeletion, 2 have b2/b3 microdeletion, and any individuals with the b1/b3 microdeletion have been found. There is a case featuring a new microdeletion with the sY1191 and sY1291 genetic markers deleted.

**Key words** complete microdeletion, partial microdeletion, AZFa, AZFb i AZFc regions, Y chromosome.

---

## INTRODUCCIÓ I METODOLOGIA

Les microdeleccions del braç llarg del cromosoma Y (Yq) representen la causa molecular més freqüent de la infertilitat masculina, com és el cas de les oligozo-

ospèrmies severes i de les azoospèrmies no obstructives (Oliva *et al.*, 1998; Moro *et al.*, 2000; Foresta *et al.*, 2001; Yen, 2001; Tyler-Smith *et al.*, 2003). El cromosoma Y conté molts amplicons, que fan que puguin aparèixer delections. El 1976 es va observar

citogenèticament l'existència de la regió AZF en el braç llarg del cromosoma Y. Aquesta regió contenia la presència d'un factor d'azoospermia; d'aquí el seu nom (*azoospermia factor*). Vint anys després, es va veure que aquesta regió contenia en realitat tres regions AZF, les quals es van designar com a AZFa, AZFb i AZFc, des de l'extrem proximal al distal del Yq. Des d'aleshores aquestes tres regions han estat incloses en les anàlisis de rutina dels centres diagnòstics. D'una banda, l'interès diagnòstic d'aquestes microdelecions del cromosoma Y és poder establir la causa d'un fenotip determinat i, d'altra banda, donar un consell genètic adequat abans de realitzar un tractament de reproducció assistida, ja que aquestes microdelecions poden ser transmeses mitjançant la tècnica ICSI. Més recentment, s'han caracteritzat tres tipus de microdelecions parcials de la regió AZFc: la microdeleció gr/gr, la qual seria un factor de risc d'infertilitat, la microdeleció b2/b3, que seria un polimorfisme sense efecte en la fertilitat, i la microdeleció b1/b3, de la qual no es coneix quin efecte té en fertilitat (Repping *et al.*, 2004; De Llanos *et al.*, 2004). L'anàlisi molecular d'aquestes microdelecions parcials no està inclosa en les anàlisis de rutina. En aquest estudi fem un resum de tots els casos de pacients infèrtils dels últims 10 anys que han passat pel nostre centre.

## SUBJECTES D'ESTUDI

Els pacients provenen de la Unitat de Reproducció Assistida de l'Hospital Clínic de Barcelona i són candidats per a ICSI entre els anys 1996 i 2006, ambdós inclosos. Les mostres utilitzades en aquest estudi són mostres de DNA aïllat a partir de la sang dels pacients en la Unitat de Genètica, de l'Hospital Clínic de Barcelona, mitjançant mètodes estàndard.

El total de pacients analitzats pel que fa a les mi-

crodelecions completes del cromosoma Y durant aquests deu anys ha estat de 2.173. Un subgrup de 688 pacients ha estat estudiat per a analitzar-ne les microdelecions parcials.

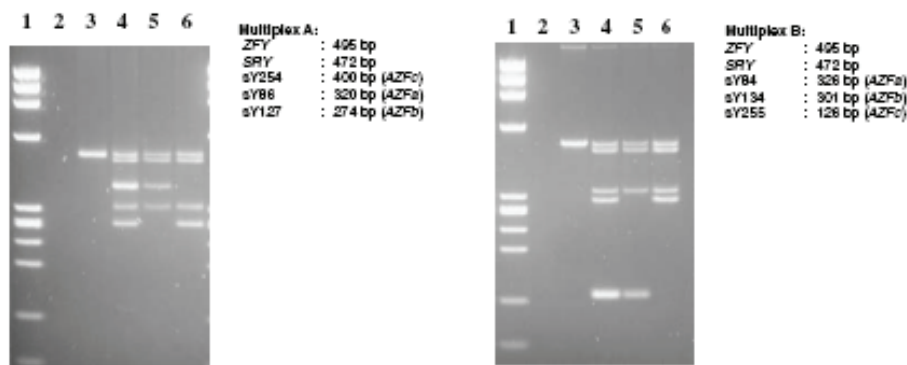
## ANÀLISI MOLECULAR DE LES MICRODELECIONS COMPLETES DE LES REGIONS AZFa, AZFb i AZFc

Des de 1999, l'European Academy of Andrology (EAA) i l'European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) encapçalen la qualitat diagnòstica dels assaigs, gràcies a la publicació de guies de referència per al diagnòstic molecular de les microdelecions del cromosoma Y (Simoni *et al.*, 2004). Seguint la seva línia des de 2004, l'anàlisi de les microdelecions es fa com es descriu a continuació.

Per a analitzar la presència de microdelecions completes en les regions AZFa, AZFb i AZFc es fa un *screening* amb dos parells de marcadors genòmics (STS) per a cadascuna de les regions, els quals cobreixen la detecció del 95 % de les delecions en els pacients azoospermics o oligospermics severos. Els primers utilitzats són:

- Per a la regió AZFa: sY84 i sY86.
- Per a la regió AZFb: sY127 i sY134.
- Per a la regió AZFc: sY254 i sY255.

Per a estudiar les microdelecions totals es fan dues PCR *multiplex* paral·leles anomenades *multiplex A* i *B* (figura 1). En la *multiplex A* es combinen els marcadors sY254, sY86, sY127, ZFY i SRY. En la *multiplex B* es combinen els marcadors sY84, sY134, sY255, ZFY i SRY. Els marcadors ZFY i SRY serveixen com a controls interns de la PCR.



**Figura 1** *Multiplex A* i *B* per a determinar microdelecions completes de les regions AZFa, AZFb i AZFc. Carril 1: marcador de pes molecular; carril 2: aigua; carril 3: DNA de dona; carril 5: DNA de pacient amb microdeleció de la regió AZFb; carril 6: DNA de pacient amb microdeleció de la regió AZFc.

**Taula 1** Descripció de la mida de cada microdelecció parcial de la regió AZFc, amb els STS que no han amplificat (-).

Tipus delecció	STS													
	142	1258	1161	1197	1161	1191	254	254	1291	1206	254	254	1206	1201
gr/ gr	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
b1/ b3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
b2/ b3	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Nova delecció	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+

### ANÀLISI MOLECULAR DE LES MICRODELECCIONS PARCIAIS DE LA REGIÓ AZFc

Les mostres analitzades en aquest estudi són un subgrup de l'estudi anterior en què es va avaluar si el pacient estava afectat d'una microdelecció completa d'una de les tres regions AZF (AZFa, b i c) del cromosoma Y. Si el resultat va donar una absència de microdelecció, la mostra s'ha inclòs en el present estudi. D'aquesta manera s'han estudiat 688 pacients i 35 controls. S'ha analitzat la presència de microdeleccions en la regió AZFc.

Per a analitzar la presència de microdeleccions parcials en la regió AZFc, s'han estudiat vuit marcadors STSs localitzats en aquesta regió del Yq: sY142, sY1258, sY1161, sY1197, sY1191, sY1291, sY1206 i sY1201. En una primera etapa s'han coamplificat els STS sY1191 i sY1291 mitjançant PCR. El cas que algun d'aquests marcadors hagi estat negatiu ens indica una possible microdelecció en la regió estudiada. Per tal de determinar la mida i el tipus d'aquesta microdelecció, la mostra s'analitza amb els sis marcadors STS addicionals: sY142, sY1258, sY1161, sY1197, sY1206 i sY1201. Així podem caracteritzar les microdeleccions parcials en funció de la combinació de marcadors que amplifiquen (taula 1).

### RESULTATS I DISCUSSIÓ

La taula 2 recull el resum dels resultats de les microdeleccions completes estudiades en les anàlisi de rutina. Dels 2.173 pacients estudiats, 24 pacients presentaven una microdelecció completa de la regió AZFc, 7 pacients presentaven una microdelecció completa de la regió AZFb, 8 pacients no tenien ni la regió AZFb, ni la AZFc i només 1 pacient presentava una microdelecció completa de la regió AZFa.

En referència a les microdeleccions parcials de la regió AZFc, s'han estudiat 688 pacients. Queden pendent de tipar sis microdeleccions, però de moment s'han trobat 19 pacients amb la microdelecció gr/gr, 2

amb la b2/b3, cap amb la microdelecció b1/b3 i un amb una nova microdelecció (sY1191 i sY1291 delecionats). Totes aquestes microdeleccions s'han trobat en el grup de pacients i no s'ha trobat cap microdelecció en el grup control. En total, 28 homes dels 688 pacients amb un defecte espermatogènic (4,06 %) tenen microdeleccions en la regió AZFc.

La regió AZF presenta tres loci (AZFa, AZFb i AZFc) que contenen els principals gens responsables de la producció d'espermatozoides. L'origen de les microdeleccions d'aquestes regions està lligat directament a l'existència de seqüències repetides. En realitat, les microdeleccions responsables d'infertilitat (AZFa, AZFb, AZFc i AZFb+c) són la conseqüència de la recombinació entre blocs de seqüències repetides que flanquegen els intervals delecionats. Aquestes seqüències repetides poden ser de diversos tipus: elements retrovirals, seqüències llargues palindròmiques de repeticions en tàndem, o bé diversos gens en múltiples còpies. És el cas de les famílies de gens com DAZ, RBMY i TSPY, que presenten un nombre variable de còpies segons els individus i són susceptibles d'estar implicades en la fertilitat masculina (Chai *et al.*, 1998).

Les microdeleccions de la regió AZFc són les més freqüents (24 pacients de 2.173). Tenen lloc després d'una recombinació homòloga de dos elements repetits de 229 kb. Les microdeleccions d'aquesta regió representen un 60 % (24/40) de les microdeleccions diagnosticades.

Per contra, les microdeleccions de la regió AZFa, localitzades en la regió pericentromèrica del braç llarg del cromosoma Y, són molt més rares: només s'ha diagnosticat un pacient en aquests deu anys. Aquestes microdeleccions són la conseqüència d'una recombinació homòloga entre elements repetits de 10 kb de llarg. La diferència en la mida de la microdelecció (229 kb envers 10 kb) podria explicar per què les microdeleccions AZFa són molt més rares que les microdeleccions AZFc.

Les microdeleccions de la regió AZFb, que inicialment van considerar-se com una regió diferent de la regió AZFc, cobreixen 6,23 Mb i eliminen 1,5 Mb

**Taula 2** Resum de les microdelecions completes de les regions AZFa, AZFb, AZFc, classificades per any.

	AZFa	AZFb	AZFc	AZFb+c	Sense delecions	TOTAL	%
1996	0	0	0	0	17	17	0
1997	0	0	7	1	173	181	4,6
1998	0	0	1	0	162	163	0,6
1999	0	1	2	1	197	201	2,1
2000	0	0	2	1	189	192	1,6
2001	0	2	3	0	334	339	1,5
2002	0	0	5	1	330	336	1,8
2003	0	4	0	1	259	264	1,9
2004	0	0	3	0	167	170	1,8
2005	0	0	2	2	142	146	2,8
2006	1	0	4	1	163	169	3,5
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>24</b>	<b>8</b>	<b>2133</b>	<b>2173</b>	

de la porció proximal d'AZFc. Les microdelecions completes d'AZFb estan lligades a recombinacions entre seqüències palindròmiques.

Les microdelecions AZFb+c són també la conseqüència de la recombinació entre palíndroms. Aquestes dues últimes microdelecions (AZFb i AZFb+c) representen, respectivament, el 17,5 % i el 20 % de les microdelecions diagnosticades en els nostres pacients.

La identificació de la microdeleció pot ajudar en la decisió de practicar una eventual biòpsia testicular en un pacient amb una azoospermia secretora per a obtenir espermatozoides testiculars utilitzables en ICSI. D'aquesta manera, el descobriment d'una microdeleció AZFa o AZFb fa que la realització d'una biòpsia testicular no sigui adequada, ja que la probabilitat de trobar espermatozoides és gairebé nulla. Per contra, en pacients amb la regió AZFc delecionada, la biòpsia té oportunitats de ser positiva.

En referència a les microdelecions parcials, la microdeleció gr/gr és la més abundant en els pacients que presenten un defecte espermatogènic (De Llanos *et al.*, 2004). Aquesta microdeleció elimina més de la meitat de la regió AZFc: concretament, elimina dues còpies de les quatre còpies existents del gen DAZ.

La microdeleció b2/b3 s'originaria a partir d'una inversió gr/rg i després tindria lloc una deleció entre els amplicons b2 i b3 (Repping *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2004). S'elimina una regió de 1,8 Mb i, per tant, la deleció és més gran que la deleció gr/gr. Aquesta microdeleció s'ha postulat que seria un polimorfisme sense efecte en la fertilitat.

La deleció 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 microdeleció

i l'efecte a l'espermatogènesi, tot i que alguns autors defensen que el seu paper seria irrellevant en aquest procés (Hucklenbroich *et al.*, 2005). No es pot, però, assegurar aquesta afirmació, ja que, com és tan poc freqüent, n'hi ha poc casos i resulta difícil establir una relació concloent.

## AGRAÏMENTS

Subvencionat amb projecte de recerca de la Generalitat de Catalunya (2001SGR00382), Ministeri de Ciència i Tecnologia (Plan Nacional de I+D, MC2003-03937) y Fondo de Investigaciones Sanitarias (V-2003-RED CO7A-0) a R. O.

## BIBLIOGRAFIA

- CHAI, N. N.; ZHOU, H.; HERNANDEZ, J.; NAJMABADI, H.; BHASIN, S.; YEN, P. H. (1998). «Structure and organization of the RBMY genes on the human Y chromosome: transposition and amplification of an ancestral autosomal hnRNPG gene». *Genomics*, 49: 283-289.
- DE LLANOS, M.; BALLESCÀ, J. L.; GÁZQUEZ, C.; MARGARIT, E.; OLIVA, R. (2005). «High frequency of gr/gr chromosome Y deletions in consecutive oligospermic ICSI candidates». *Hum. Reprod.*, 20: 216-220.
- 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.

- HUCKLENBROICH, K.; GROMOLL, J.; HEINRICH, M.; HOHOFF, C.; NIESCHLAG, E.; SIMONI, M. (2005). «Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis». *Hum. Reprod.*, 20: 191-197.
- 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-VIJANDE, J. R.; BALLESTA, F. (1998). «Prevalence of Y chromosome microdeletions in oligospermic and azoospermic candidates for intracytoplasmic sperm injection». *Fertil. Steril.*, 70: 506-510.
- REPPING, S.; DAALLEN, S. K. VAN; KORVER, C. M.; BROWN, L.; MARSZALEK, J. D.; GIANOTTEN, J.; OATES, R. D.; SILBER, S.; VEEN, F. VAN DER; 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 azoospermia factor c region». *Genomics*, 83: 1046-1052.
- SIMONI, M.; BAKKER, E. [et al.] (2004). «EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004». *International Journal of Andrology*, 27: 240-249.
- 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.





## ESTUDI PRELIMINAR D'ANOMALIES EPIGENÈTIQUES EN ESPERMATOZOIDES D'INDIVIDUS QUE CONSULTEN PER PROBLEMES DE FERTILITAT

Marta Pladevall,<sup>1</sup> Joan Blanco,<sup>1</sup> Mark Grossmann,<sup>2</sup> M. Carme Pons,<sup>2</sup> Cristina Camprubi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona  
08193 Bellaterra. Tel. 935 811 112. Fax 935 812 295. [cristina.camprubi@uab.cat](mailto:cristina.camprubi@uab.cat).

<sup>2</sup> Unitat de Reproducció Assistida, Centro Médico Teknon  
Vilana, 12. 08022 Barcelona. Tel. 932 906 296. Fax. 932 906 297. [ura@cmteknon.com](mailto:ura@cmteknon.com).

---

### Resum

Recentment han estat publicades dades epidemiològiques que suggereixen una relació entre la manipulació *in vitro* de gàmetes i embrions i un increment d'anomalies epigenètiques en la descendència. Per tal de determinar la incidència d'errors de metilació en espermatozoides d'individus que consulten per problemes de fertilitat, s'han analitzat dos gens regulats per impressió genètica, *H19* i *SNRPN*. El patró de metilació d'aquests loci s'ha analitzat a partir de l'amplificació del DNA espermàtic tractat amb bisulfit sòdic i la seqüenciació posterior. Cap de les 27 mostres analitzades ha presentat errors de metilació. D'acord amb aquestes dades, els pacients analitzats no presentarien un risc incrementat de transmetre errors epigenètics d'aquests loci a la descendència.

**Paraules clau** impressió genètica, espermatozoides, errors de metilació, tècniques de reproducció assistida.

### Abstract

Recently, it has been published epidemiologic data suggesting a link between *in vitro* manipulation of gametes and embryos and an increase risk of epigenetic errors in the offspring. To evaluate the account of epigenetic errors in gametes from infertile patients we have assessed the methylation pattern of two imprinted regulated genes, *H19* and *SNRPN*. Methylation profiles of the selected loci were determined by amplification of treated DNA with sodium bisulphite, PCR and automatic DNA sequencing. None of the 27 samples showed an abnormal methylation profile. In accordance with our data, there are no risk of transmitting epigenetic errors of these loci in our population.

---

## INTRODUCCIÓ

La impressió genètica és una marca epigenètica heretable i reversible que implica la desactivació específica de determinats gens en funció del seu origen parental. S'estableix mitjançant metilació de dinucleòtids 5'-CG-3' (illes CpG) i canvis conformacionals de la cromatina que bloquegen l'expressió de l'allel matern o patern (expressió monoal·lèlica). El caràcter heretable i reversible es manifesta en la línia germinal, en què la impressió s'esborra i es torna a establir durant la gametogènesi en funció del sexe de l'individu. Durant l'espermatogènesi l'adquisició de la metilació es completa en espermatogonis abans d'entrar en meiosi (Kerjean *et al.*, 2000). Pel que fa a l'oogènesi, alguns estudis proposen que la metila-

ció esta establerta al voltant de la fecundació (El-Maari *et al.*, 2001), mentre que d'altres assenyalen que la impressió ja és completa en oòcits madurs (Geuns *et al.*, 2003). Després de la fecundació la impressió genètica es manté en les cèl·lules somàtiques de l'embrió i de l'individu adult i s'esborra de nou en cèl·lules germinals primordials (figura 1).

Els gens regulats per impressió genètica són importants per al correcte desenvolupament de l'embrió i de la placenta (McGrath i Solter, 1984). Recentment s'han descrit gens relacionats amb el desenvolupament neurològic, el comportament i la regulació de la fisiologia i metabolisme, tant en l'etapa embrionària com adulta (Isles i Wilkinson, 2000; Polychronakos i Kukuvtitis, 2002; Davis *et al.*, 2005; Kishino, 2006). Errors en l'establiment o man-

teniment de la impressió genètica impliquen la no expressió o sobreexpressió d'aquests gens. L'efecte dels errors epigenètics en l'individu portador dependrà dels gens afectats. A mode d'exemple, anomalies epigenètiques de gens continguts en la regió 11p15.5 comporten el desenvolupament de la síndrome de Beckwith-Wiedeman (SBW), i anomalies epigenètiques de gens continguts en la regió 15q11q13 comporten el desenvolupament de la síndrome de Prader-Willi (SPW) i d'Angelman (SA). També s'han relacionat errors de impressió amb diversos tipus de càncer (Feinberg, 2004) i desordres del neurocomportament, com l'autisme (Schanen, 2006).

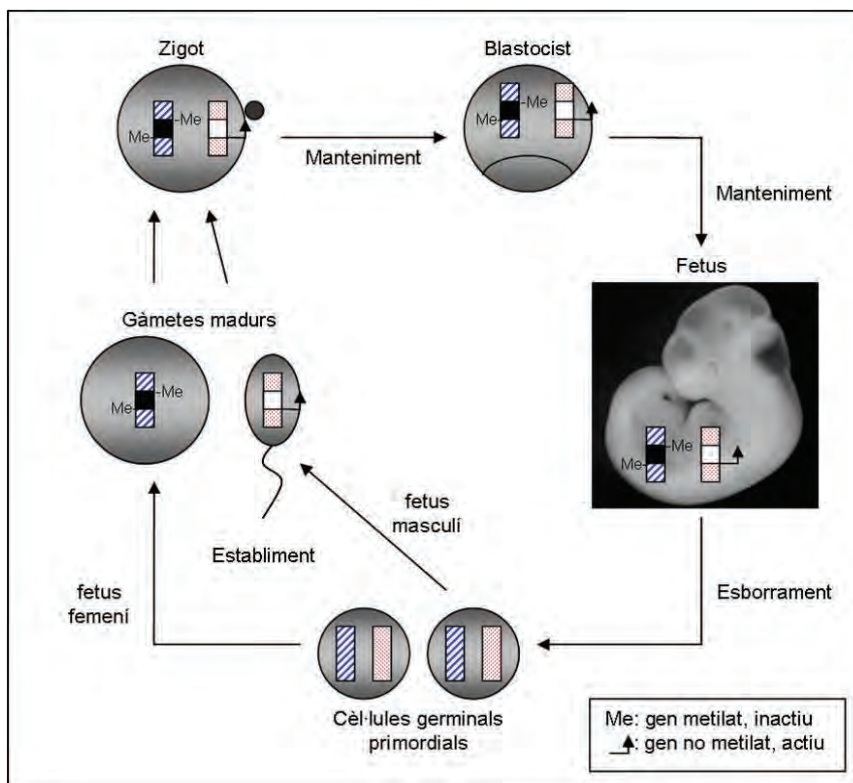
Recentment han estat publicades dades epidemiològiques que suggereixen una relació entre la manipulació *in vitro* de gàmetes i embrions i un increment del risc d'errors epigenètics en la descendència (Cox *et al.*, 2002; DeBaun *et al.*, 2002; Orstavik *et al.*, 2003; Niemitz *et al.*, 2004; Halliday *et al.*, 2004). En aquest sentit és important remarcar que la impressió genètica s'estableix en el període de formació dels gàmetes i ha de mantenir-se durant les primeres etapes del desenvolupament embrionari,

període en el qual aquestes cèl·lules es manipulen en els laboratoris de reproducció assistida. Diferents hipòtesis no excloents entre si i basades en el coneixement dels mecanismes responsables de l'establiment i manteniment de la impressió genètica han estat formulades per diferents investigadors que intenten explicar aquestes dades epidemiològiques:

— Els problemes d'infertilitat poden estar relacionats amb errors epigenètics en els gàmetes. Marques *et al.* (2004) van presentar dades experimentals que avalaven una relació entre recomptes espermàtics baixos i deficiències en el patró de metilació del gen regulat per impressió genètica *H19* implicat en el desenvolupament de la SBW.

— Els protocols d'estimulació ovàrica i maduració *in vitro* dels oòcits poden afectar l'establiment i el manteniment de la impressió genètica. Recentment han aparegut treballs en els quals es relacionen anomalies epigenètiques amb la superovulació o la maduració *in vitro* d'oòcits (Ludwig *et al.*, 2005; Borghol *et al.*, 2006).

— La tècnica d'ICSI per si mateixa també podria alterar els mecanismes d'establiment com a conse-



**Figura 1** Cicle de la impressió genètica. Per simplificar l'esquema es representa una parella de cromosomes homòlegs que contenen un gen amb impressió materna. Els cromosomes ratllat i puntejat representen els cromosomes d'origen matern i patern, respectivament. En cèl·lules primordials germinals la impressió genètica s'esborra i, segons el sexe del fetus, s'estableix la impressió paterna en tots els espermatòzoids, o bé la materna en tots els oòcits. Després de la fecundació la metilació diferencial es manté durant el desenvolupament i l'etapa adulta per a tornar-se a esborrar en cèl·lules germinals primordials (Reik i Walter, 2001).

qüència d'alteracions en les oscil·lacions de  $Ca^{2+}$  després de la fecundació, per interrupció de la producció de factors materns necessaris per a l'establiment de la impressió a causa de l'estrès mecànic que pateix l'òocit, entre altres (Cox *et al.*, 2002).

— Finalment s'ha assenyalat el cultiu *in vitro* dels embrions com a possible causa d'interferència en el manteniment de la impressió genètica (Khosla *et al.*, 2001).

Els estudis epidemiològics han estat i seran de gran importància; ara bé, atès que les incidències de les síndromes originades per anomalies epigenètiques són baixes i els increments són discrets, la informació disponible encara és escassa. Una aproximació experimental prometedora que permetrà analitzar grans poblacions (cellulars i individuals) consisteix en l'anàlisi d'errors epigenètics en espermatozoides i òocits.

## OBJECTIU

Determinar la incidència d'errors de metilació en illes CpG contingudes en el gens regulats per impressió genètica *H19* (regió 11p15.5) i *SNRPN* (regió 15q11q13) en espermatozoides humans provinents de mostres de semen d'individus que consulten per problemes de fertilitat.

## MATERIAL I MÈTODES

### Mostres biològiques

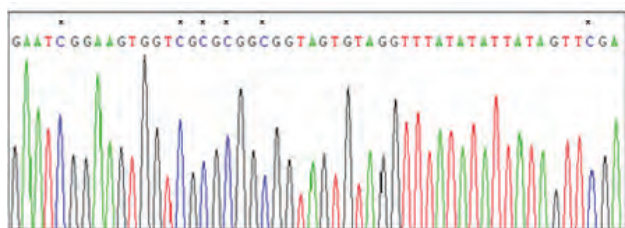
**Individus amb problemes de fertilitat:** En col·laboració amb la Unitat de Reproducció Assistida del Centre Mèdic Teknon s'han analitzat 27 mostres de semen. De la població masculina que consulta en centres de reproducció es desconeix sota quines indicacions poden aparèixer errors epigenètics. Per aquest motiu no s'ha utilitzat cap criteri de selecció dels candidats. Per tal de garantir l'objectivitat de l'anàlisi, l'estudi s'està realitzant a cegues: l'equip responsable de l'anàlisi epigenètica desconeix l'etiologia de la infertilitat i les característiques del semiograma.

**Extracció del DNA espermàtic:** L'extracció de DNA genòmic s'ha realitzat amb el *kit* d'extracció comercial PUREGEN® (Gentra Systems). Atès que les mostres recollides presenten, en general, un nombre d'espermatozoides inferior al rang d'actuació descrit per la casa comercial (mínim de 3 milions d'espermatozoides), s'ha adaptat el protocol a concentracions cel·lulars més baixes (fins a un mínim de 3.000 espermatozoides).

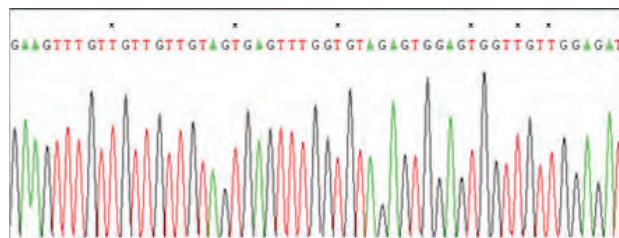
**Tractament amb bisulfit sòdic (test de metilació):** Sota determinades condicions de pH i temperatura, el bisulfit sòdic converteix les citosines no metilades en uracils. Quan el DNA modificat és amplificat per PCR, els residus de citosina que es troben metilats s'amplifiquen com a citosines i presenten guanines com a base complementària. Les citosines no metilades convertides a uracils, s'amplifiquen com a timines i presenten com a base complementària adenines. En l'anàlisi de la seqüència del producte d'amplificació es poden distingir les citosines metilades de les no metilades en funció de si a la seqüència hi ha presents citosines i guanines, o bé adenines i timines. Prèviament a l'amplificació per PCR les mostres de DNA espermàtic han estat tractades amb aquest compost segons el protocol descrit per Clark *et al.* (1994).

**Amplificació per PCR dels loci *H19* i *SNRPN*:** Els encebadors utilitzats per a la PCR han estat dissenyats per a ser complementaris al DNA desaminat i lliures de dinucleòtids CG.

Per a generar el producte del locus *H19*, després d'una primera ronda d'amplificació amb els encebadors H19F i H19R descrits per Kerjean *et al.* (2000), s'ha realitzat una PCR *hemi-nested* amb l'encebador BH19F. La seqüència corresponent als tres encebadors utilitzats és la següent: H19F: 5'-AGGTGTTT-TAGTTTTATGGATGATGG-3' (nucleòtids 5'-6006-6032-3', número d'accés al GenBank: AF087017), *H19 R*: 5'-TCCTATAAATATCC-TATCCCAAATAACC-3' (nucleòtids 3'-6299-6328-5', número d'accés al GenBank: AF087017),



**Figura 2** Fragment del cromatograma del loci *H19* obtingut amb l'encebador BH19F. L'asterisc indica les citosines metilades de la illa CpG.



**Figura 3** Fragment del cromatograma del loci *SNRPN* obtingut amb l'encebador M13F). L'asterisc indica les citosines no metilades de l'illa CpG que han estat modificades a timines.

BH19F: 5'-TTGTAGGGTTTTGGTAGGTATA-GAG-3' (nucleòtids 5'-6060-6085-3', número d'accés al GenBank: AF087017). El fragment que s'obté després de les dues rondes d'amplificació correspon a 269 pb i conté 18 illes CpG diferencialment metilades.

Les dues rondes d'amplificació del locus *H19* s'han realitzat amb 10 mM de *PCR buffer II*, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,5 µM de cada un dels encebadors i 1,25 U d'*AmpliTaq Gold DNA Polymerase*. Les condicions d'amplificació utilitzades corresponen a: *Hot start* de 94° C durant 10 minuts seguits de 40 cicles de desnaturalització a 94° C durant 45 segons, *annealing* de 61° C durant 45 segons, extensió a 72° C durant 1 minut i 10 minuts d'extensió final a 72° C.

Per a generar el producte del locus *SNRPN*, després d'una primera ronda d'amplificació amb els encebadors SNRPNF-SNRPNR, s'ha realitzat una PCR *hemi-nested* amb un encebador amb cua de M13 (SN-M13F). La seqüència corresponent als tres encebadors utilitzats és la següent: SNRPNF: 5'-ATATAGGAAGATTTGAGGGTGAGTGTAAT-3' (nucleòtids 5'-130983-131013-3', número d'accés al GenBank: NC000015), SNRPNR: 5'-CCCAAAA CAAAAACTTTAAAACCCAAATTCC-3' (nucleòtids 3'-131518-131551-5', número d'accés al GenBank: NC000015), SN-M13F: 5'-GTGAGGGGAGG-GAGTT-3' (nucleòtids 5'-131213-131228-3', núm. d'accés al GenBank: NC000015). El fragment que s'obté després de les dues rondes d'amplificació correspon a 338 pb i conté 22 illes CpG diferencialment metilades.

Les dues rondes d'amplificació del locus *SNRPN* s'ha realitzat amb 10 mM de *PCR buffer II*, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM dNTPs, 0,5 µM de cada un dels encebadors i 1,25 U d'*AmpliTaq Gold DNA Polymera-*

*se*. Les condicions d'amplificació utilitzades corresponen a: *Hot start* de 95° C durant 12 minuts seguits de 45 cicles de desnaturalització a 94° C durant 45 segons, *annealing* de 60° C durant 45 segons, extensió a 72° C durant 1 minut i 10 minuts d'extensió final a 72° C.

Les reaccions d'amplificació tant per a *H19* com per a *SNRPN* s'han realitzat en un volum final de 25 µl en un termociclador *Eppendorf Mastercycler gradient* (Eppendorf). Els productes d'amplificació han estat visualitzats en un gel d'agarosa preparat al 2 % tenyit amb bromur d'etidi.

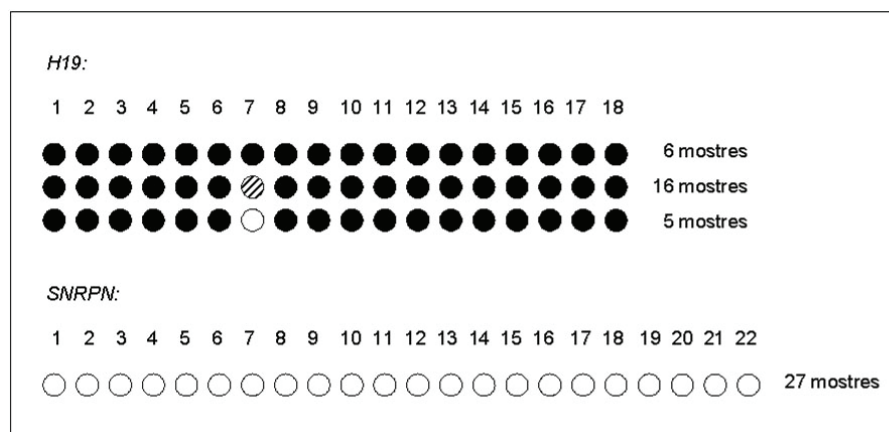
### Seqüenciació

La PCR de seqüenciació s'ha realitzat amb el *kit BigDye® Terminator v3.1* (Applied Biosystems) segons les recomanacions de la casa comercial. La seqüència del locus *H19* s'ha obtingut amb els encebadors BH19F i H19R, i la del locus *SNRPN* amb l'encebador universal M13 i amb l'encebador SNRPNR. La lectura dels resultats es realitza en un seqüenciador automàtic ABI 3100 en el Servei de Seqüenciació i Síntesi d'Àcids Nucleics de la Universitat Autònoma de Barcelona.

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

El gen *H19* presenta metilació en l'allel patern. Les citosines metilades d'aquest locus no han estat modificades en el tractament amb bisulfit sòdic i es considera que la impressió correcta es correspon amb l'observació de citosines a la seva seqüència (figura 2).

Per contra, el gen *SNRPN* presenta metilació en l'allel matern. Així doncs, les citosines en aquest lo-



**Figura 4** Estat de metilació de les 18 i 22 illes CpG analitzades en els loci *H19* i *SNRPN*, respectivament. Cada cercle indica una illa CpG i els xifres la seva posició. Els cercles negres indiquen citosines metilades i els blancs no metilades. El cercle ratllat indica citosines metilades i timines en heterozigosi corresponents al polimorfisme.

cus han estat modificades en el tractament amb bisulfit sòdic i es considera que la impressió correcta es correspon amb l'observació de timines a la seva seqüència (figura 3).

Els resultats de l'anàlisi de les 27 mostres no indiquen errors de metilació en cap de les 18 illes CpG estudiades en el locus *H19*, ni tampoc en cap de les 22 illes CpG estudiades en el locus *SNRPN* (figura 4). En el locus *H19* la citosina de la illa CpG en posició 7 correspon al polimorfisme C/T, el qual presenta una heterozigositat en la població del 50 % (rs10732516), similar a l'observada en les nostres mostres (16/27).

L'absència d'errors epigenètics en les mostres analitzades no dona suport a treballs previs publicats en què se suggeria una associació entre recomptes espermàtics baixos i un increments d'errors de metilació en el locus *H19* (Marques *et al.*, 2004). Caldrà veure com evolucionen els nostres resultats a mesura que s'incrementi la població analitzada ( $n = 107$ ) i es relacionin els resultats obtinguts amb les característiques del seminograma.

L'aplicació del protocol utilitzat permet realitzar amb èxit l'estudi del patró de metilació de regions regulades per impressió genètica a un elevat nombre de mostres i a diferents tipus cel·lulars. L'optimització d'aquest protocol al nostre laboratori permetrà ampliar l'estudi a altres loci amb impressió genètica, i també analitzar l'estat de metilació del mateixos loci en oòcits immadurs o madurats *in vitro* descartats de programes de donació o de cicles de FIV/ICSI. L'estudi d'un elevat nombre de mostres i de diferents tipus cel·lulars és imprescindible per a determinar si existeix relació entre errors epigenètics i tècniques de reproducció assistida.

## AGRAÏMENTS

Aquest treball s'ha realitzat amb el finançament d'un projecte de recerca per a grups emergents de la Universitat Autònoma de Barcelona (EME2005-38). Marta Pladevall gaudeix d'una beca de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB2006-00213).

## BIBLIOGRAFIA

- BORGHOL, N.; LORNAGE, J.; BLACHERE, T.; SOPHIE GARRET, A.; LEFEVRE, A. (2006). «Epigenetic status of the H19 locus in human oocytes following in vitro maturation». *Genomics*, 87: 417-426.
- COX, G. F.; BÜRGER, J.; LIP, V.; ULRIKE, A. M.; SEPRLING, D.; WU, B.; HORSTHEMKE, B. (2002). «Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects». *Am. J. Hum. Genet.*, 71: 162-164.
- CLARK, S. J.; HARRISON, J.; PAUL, C. L.; FROMMER, M. (1994). «High sensitivity mapping of methylated cytosines». *Nuc. Ac. Res.*, 22: 2990-2997.
- DAVIS, W.; ISLES, A. R.; WILKINSON, L. S. (2005). «Imprinted gene expression in the brain». *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29: 421-430.
- DEBAUN, M. R.; NIEMITZ, E. L.; FEINBERG, A. P. (2002). «Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19». *Am. J. Hum. Genet.*, 72:156-160.
- EL-MAARRI, O.; BUITING, K.; PEERY, E. G.; KROISEL, P. M.; BALABAN, B.; WAGNER, K.; URMAN, B.; HEYD, J.; LICH, C.; BRANNAN, C. I.; WALTER, J.; HORSTHEMKE, B. (2001). «Maternal methylation imprints of human chromosome 15 are established during or after fertilization». *Nat. Genet.*, 27: 341-344.
- FEINBERG, A. P. (2004). «The epigenetics of cancer etiology». *Semin Cancer Biol.*, 14: 427-432.
- GEUNS, E.; DE RYCKE, M.; VAN STEIRTEGHEM, A.; LIEBAERS, I. (2003). «Methylation imprints of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos». *Hum. Mol. Genet.*, 12: 2873-2879.
- HALLIDAY, J.; OKE, K.; BREHENY, S.; ALGAR, E. J.; AMOR, D. (2004). «Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study». *Am. J. Hum. Genet.*, 75:526-528.
- ISLES, A. R.; WILKINSON, L. S. (2000). «Imprinted genes, cognition and behavior». *Trends Cogn. Sci.*, 4: 309-318.
- KERJEAN, A.; DUPONT, J. M.; VASSEUR, C.; LE TESSIER, D.; CUISSET, L.; PÁLDI, A.; JOUANNET, P.; JEANPIERRE, M. (2000). «Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis». *Hum. Molec. Genet.*, 9: 2183-2187.
- KISHINO, T. (2006). «Imprinting in neurons». *Cytogenet. Genome Res.*, 113: 209-214.
- KHOSLA, S.; DEAN, W.; BROWN, D.; REIK, W.; FEIL, R. (2001). «Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes». *Biol. Reprod.*, 64: 918-926.
- LUDWIG, M.; KATALINIC, A.; GROSS, S.; SUTCLIFFE, A.; VARON, R.; HORSTHEMKE, B. (2005). «Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples». *J. Med. Genet.*, 42: 289-291.
- MARQUES, C. J.; CARVALHO, F.; SOUSA, M.; BARROS, A. (2004). «Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis». *The Lancet*, 363: 1700-1702.
- MCGRATH, J.; SOLTER, D. (1984). «Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and parental genomes». *Cell*, 37: 179-183.
- NIEMITZ, E. L.; FEINBERG, A. P. (2004). «Epigenetics

- and assisted reproductive technology: a call for investigation». *Am. J. Hum. Genet.*, 74: 599-609.
- ORSTAVIK, K. H.; EIKLID, K.; VAN DER HAGEN, C. B.; SPETALEN, S.; KIERULF, K.; SKJELDAL, O.; BUITING, K. (2003). «Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection». *Am. J. Hum. Genet.*, 72: 218-219.
- POLYCHRONAKOS, C.; KUKUVITIS, A. (2002). «Parental genomic imprinting in endocrinopathies». *Eur. J. Endocrinol.*, 147: 561-569.
- REIK, W.; WALTER, J. (2001). «Genomic imprinting: parental influence on the genome». *Nat. Genet.*, 2: 21-32.
- SCHANEN, N. C. (2006). «Epigenetics of autism spectrum disorders». *Hum. Mol. Genet.*, 15: 138-150.



## VALIDESA DE LA TÈCNICA D'ICSI A DIA +1 PER FALLADA COMPLETA DE LA FECUNDACIÓ PER INSEMINACIÓ

Ivette Vanrell, Mark Grossmann, M. Carme Pons, Ivan Solvas, Josep Miquel Viladoms, Elena Castellanos, Javier Unzueta, Javier Nadal

Unitat de Reproducció Assistida, Centro Médico Teknon  
Vilana, 12. 08022 Barcelona. [ura@cmteknon.com](mailto:ura@cmteknon.com).

### Resum

Presentem l'estudi retrospectiu de tots els casos de fallada completa de la fecundació per inseminació que es continuaren amb la tècnica d'ICSI en dia +1. Amb aquesta estratègia hem aconseguit dos embarassos evolutius (un de ja nascut) que, encara que representen un percentatge baix d'èxit, eviten cancel·lar el cicle de fecundació *in vitro*.

**Paraules clau** Inseminació, FIV, fallada completa de la fecundació, ICSI dia+1.

### Abstract

Retrospective study of all those cases of complete fertilization failure after conventional IVF followed by performing ICSI on the second day as a rescue technique. We report 2 pregnancies (one healthy baby born and one ongoing pregnancy). Although results are quite low, they avoid to cancel IVF attempts.

**Key words** Insemination, IVF, insemination failure, second day ICSI.

## INTRODUCCIÓ

La inseminació convencional és el mètode d'elecció quan no hi ha causa masculina aparent en l'esterilitat de la parella. En aquesta estratègia les fallades completes de fecundació són imprevisibles, representen aproximadament un 5-15 % dels casos (Tournaye, 2006) i aboquen al fracàs del cicle de fecundació *in vitro*.

Davant d'un cas de fallada completa de la fecundació per inseminació (cap dels oòcits inseminats mostra senyals de fecundació) hi ha tres possibles actuacions: cancel·lar el cicle, reinseminar amb altes concentracions d'espermatozoides, o realitzar microinjecció espermàtica. D'aquestes tres opcions, l'única alternativa que ha generat alguns embarassos és la microinjecció intracitoplasmàtica (ICSI), que habitualment es coneix com a *ICSI en dia +1*.

De fet, se sap que la fecundació per ICSI en dia +1 rendeix taxes de fecundació acceptables (Nagy *et al.*, 1997; Kuzcynski *et al.*, 2002) i àdhuc de divisió embrionària (Kuzcynski *et al.*, 2002), però hi ha poques gestacions a termini descrites a la literatura científica (Lundin *et al.*, 1996; Bussen *et al.*, 1997; Morton *et al.* 1997; Kastrop *et al.*, 1999; Camacho

*et al.*, 2005). Malgrat que es tracta d'una actuació descrita ja fa força temps, no s'ha consolidat en la rutina dels centres de reproducció assistida, potser per l'increment de feina que representa o potser per l'escàs rendiment que sembla tenir.

A la Unitat de Reproducció Assistida (URA) del Centro Médico Teknon, des dels seus començaments, l'any 2000, optem per fer ICSI en tots els casos amb fallada completa de la fecundació per inseminació en els quals els oòcits encara ho permetin.

Presentem, doncs, l'anàlisi retrospectiva dels resultats d'aquesta tècnica de rescat amb l'objectiu de valorar el seu rendiment.

## MATERIAL I MÈTODES

En aquest estudi s'inclouen tots els casos en els quals s'ha fet ICSI en dia +1 per fallada completa de la fecundació per inseminació realitzats en el període comprès entre febrer 2000 i desembre de 2006, amb-dós inclosos.

Definim fallada completa de la fecundació per inseminació com aquella situació en la qual cap dels oòcits inseminats mostra dos pronuclis (PN), malgrat

**Taula 1** Percentatge de casos amb fallada completa de fecundació per inseminació.

any	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Núm. cicles FIV convencional	67	105	135	176	184	156	125
Núm. cicle amb fallada total	2	3	2	1	3	1	5
% fallada total	3,0	2,9	1,5	0,6	1,6	0,6	4,0

**Taula 2** Estadística descriptiva.

	n	mitjana i rang	%	Taxa per cicle
Cicles inclosos en aquest estudi	15			
Oòcits inseminats i no fecundats	156	10,4 [3-22]		
Òòcits processats en ICSI dia +1	121	8,1 [2-18]	77,6	
2PN després d'ICSI dia +1	75	5 [0-13]	62,0	
Cicles amb embrions transferits	14			93,3
Embrions transferits	32	2,1 [1-3]	42,7	
Cicles amb $\beta$ hCG+	6			40,0
Cicles amb gestació clínica (BC+)	3			20,0
Embrions implantats	3		9,4	
Cicles amb gestació evolutiva	2			13,3

la bona qualitat dels espermatozoides el dia de la punció i de la bona qualitat dels oòcits el dia després. Per tant, exclouem de l'estudi tots els casos que presenten algun oòcit amb fecundació anòmala (1PN, 3PN o >3PN) l'endemà de la punció.

La inseminació convencional es realitza en gotes de 100  $\mu$ l de medi FERT (Vitrolife) que contenen un o dos complexos cúmulo-oòcit, i a les quals s'afegeixen 200.000-250.000 espermatozoides/ml per a cultiu *in vitro overnight* en condicions estàndard.

La detecció de pronuclis es realitza entre les 17 i les 20 h postinseminació, en observació a través de microscopi invertit. Prèviament es realitza la denucliació dels oòcits de les cèl·lules de la corona mitjançant un pipeteig suau.

En detectar fallada completa de la fecundació es programa ICSI de rescat. Els espermatozoides utilitzats corresponen a la mostra preparada el dia anterior i s'injecten els oòcits en metafase II sense signes de fecundació. Els primers dos anys d'aquesta sèrie (anys 2000 i 2001) la microinjecció espermàtica es realitzava tan aviat com era possible (p. ex., 20 h postinseminació), mentre que, posteriorment ja la realitzàvem en horari habitual del nostre laboratori amb la resta de processos d'ICSI del dia, i que representen unes 24 h postinseminació.

Els embrions amb 2PN resultants es cultiven 24 h més en medi G1 (Vitrolife) i condicions *in vitro* estàndard, fins al moment de la transferència ecoguiada, dos dies post-ICSI. Just abans de la transferència es realitza eclosió assistida mitjançant solució àcida

de Tyrode (MediCult) en els embrions seleccionats per a transferir.

## RESULTATS

Els casos amb fallada completa de la fecundació per inseminació foren un 1,8 %, és a dir, 17 sobre un total de 948 cicles de FIV convencional.

D'aquests 17 cicles vam poder fer ICSI en dia +1 en 15 casos. En els dos casos restants, la baixa qualitat dels oòcits després de la inseminació no ho permeté.

La taula 1 mostra la distribució d'aquests 17 casos al llarg dels anys.

La taxa de fecundació després d'ICSI en aquests oòcits «envellits» fou del 62 %. Hi ha un cicle sense fecundació també després de la ICSI i, per tant, es pogué fer transferència embrionària en 14 dels 15 casos.

S'obtingueren 6 determinacions positives de  $\beta$ hCG, de les quals dues van ser gestacions bioquímiques, una va ser un ectòpic, i en les altres 3 es va veure un sac embrionari amb batec cardíac positiu, però una va avortar en el primer trimestre. Tal com es mostra a la taula 2, la taxa de gestació evolutiva va ser del 13,3 % per cicle iniciat, i la taxa d'implantació, del 9,4 %.

La mitjana de blastòmers per embrió transferit fou del 3,9 i, pel que fa a la morfologia dels embrions transferits, el 69 % dels embrions presentaven de 4 a

**Taula 3** Resultat de les transferències embrionàries en els casos de fallada completa de fecundació per inseminació.

any	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Núm. cicles ICSI dia +1	2	3	2	0	3	1	4
Núm. cicles amb $\beta$ hcG+	2	1	0	0	0	1	2
Núm. gestacions evolutives	0	0	0	0	0	1	1

6 cèl·lules. Curiosament, en el 95 % dels embrions no s'observà fragmentació.

Finalment a la taula 3 es mostra la distribució de les gestacions al llarg dels anys. La gestació iniciada l'any 2005 fou part per cesària a les 39 setmanes sense complicacions d'un nadó sa i l'evolutiva l'any 2006 està en la setmana 14 de gestació pendent d'amniocentesi.

## DISCUSSIÓ

A la URA el percentatge global de cicles amb fallada completa de la fecundació per inseminació és del 1,8 %, xifra inferior a la publicada en la literatura científica i alhora constant al llarg dels anys. També és cert que en alguns casos plantejables com d'inseminació es fa ICSI per requeriment mèdic.

La taxa de fecundació obtinguda després de la ICSI en dia +1 (62,0 %) és equiparable al 68 %, que és la taxa mitjana de fecundació mitjançant ICSI a la nostra unitat (dades no presentades).

Pel que fa al moment de realització de la ICSI (hores postinseminació), sembla que fer la ICSI el més aviat possible no sigui estrictament necessari. Rectificant allò que nosaltres mateixos i altres havien publicat (Pons *et al.*, 2000; Yuzpe *et al.*, 2000), endarrerir fins a les 24 hores postinseminació el moment de la ICSI no ha comportat una disminució ni en les taxes de fecundació ni en les d'embrions transferits i, en canvi, no distorsiona tant les rutines del laboratori. De fet, els dos embarassos evolutius presentats en aquest treball se situen, sense que se'n puguin extreure conclusions, en els darrers dos anys de la nostra sèrie.

Malgrat que a la literatura científica hi ha preocupació pel risc d'anomalies cromosòmiques (Lundin *et al.*, 1996; Bussen *et al.*, 1997), els naixement comunicats fins ara són cromosòmicament normals i les taxes d'avortaments assumibles (Morton *et al.*, 1997; Kastrop *et al.* 1999).

Hi ha controvèrsia en la utilitat de la tècnica d'ICSI en dia +1 en funció dels diversos autors i llurs resultats. Així, hi ha grups que publiquen taxes de gestació evolutives per cicle del 14,8 % o, fins i tot, del 26 % (Morton *et al.*, 1997; Kastrop *et al.*, 1999, respectivament), però també hi ha grups amb

taxes del 7 % o del 0 % (Lundin *et al.*, 1996; Kuczynski *et al.*, 2000, respectivament). La nostra sèrie se situa en un terme mitjà amb un 13,3 % d'embaràs evolutiu per cicle iniciat.

L'ús de la tècnica d'ICSI en dia +1 es considera una excel·lent eina diagnòstica. Però per aconseguir l'èxit en la vessant terapèutica és important seleccionar estrictament els oòcits susceptibles de ser microinjectats i descartar els que semblin de mala qualitat o que presentin algun signe de fecundació (2CP).

## CONCLUSIONS

L'ús de la ICSI a dia +1 és una bona opció, no solament de tipus diagnòstic, sinó també de rescat de casos abocats a la cancel·lació.

L'endarreriment del moment de realitzar la ICSI, de 20 a 24 hores postinseminació no comporta ni disminució en la taxa de fecundació ni en la taxa de gestació.

En la nostra opinió, l'èxit d'aquesta tècnica depèn de la rigorosa avaluació dels oòcits no fecundats i de l'aplicació acurada de cadascun dels protocols del laboratori d'embriologia.

## BIBLIOGRAFIA

- BUSSEN, S.; MULFINGER, L.; SÜTTERLIN, M. [*et al.*] (1997). «Dizygotic twin pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of 1 day old unfertilized oocytes». *Hum. Reprod.*, 12: 2560-2562.
- CAMACHO, S.; GALÁN, I.; GRAGERA, J. A. [*et al.*] (2005). «Niña nacida de reinseminación con ICSI tras fallo de FIV convencional». *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 22(6): 433-435.
- KASTROP, P. M.; WEIMA, S. M.; VAN KOOIJ, R. J. [*et al.*] (1999). «Comparison between intracytoplasmic and in-vitro fertilization (IVF) with high insemination concentration after total fertilization failure in a previous IVF attempt». *Hum. Reprod.*, 14: 65-69.
- KUCZYNSKI, W.; DHONT, M.; GRYGORUK, C. [*et al.*] (2002). «Rescue ICSI of unfertilized oocytes after ICSI». *Hum. Reprod.*, 17: 2423-2427.
- LUNDIN, K.; SJOGREN, A.; HAMBERGER, L. [*et al.*] (1996). «Reinsemination of one-day-old oocytes by

- use intracytoplasmic sperm injection». *Fertil&Steril*, 66: 118-121.
- MORTON P. C.; YOLDER, C. S.; TUCKER, M. J. [*et al.*] (1997). «Reinsemination by intracytoplasmic sperm injection of 1-day-old oocytes after complete conventional fertilization failure». *Fertil&Steril*, 68: 488-491.
- NAGY, Z. P.; JORIS, H.; LIU, J. [*et al.*] (1993). «Fertilization and early embryology: intracytoplasmic single sperm injection of 1-day-old unfertilized human oocytes». *Hum. Reprod.*, 8: 2180-2184.
- PONS, M. C.; GROSSMANN, M.; MASRAMON [*et al.*] (2000). «ICSI a dia+1 per fallada completa de la inseminació». *Llibre de ponències del XVIè congrés de metges i biòlegs en llengua catalana*, p. 517-518.
- TOURNAYE, H. (2006). «How to define the limits between IVF and ICSI?» *ESHRE pre-congress course on embryology*.
- YUZPE, A. A.; LIU, Z.; FLUKER, M. R. (2000). «Rescue intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-salvaging in vitro fertilization (IVF) cycles after total or near-total fertilization failure». *Fertil&Steril.*, 73: 1115-1119.

## **CONSECUENCIAS DE LA ROTURA SIN SALTO (SS) DE LA MEMBRANA DE LOS OVOCITOS TRAS EL ICSI**

M. Martín, M. Florensa, M. Esbert, M. Riqueros, A. Ballesteros, G. Calderón

IVI-Barcelona

Ronda General Mitre ,14. 08017 Barcelona. [mmartin@ivi.es](mailto:mmartin@ivi.es).

---

### *Resumen*

El objetivo de este estudio es evaluar de manera retrospectiva las consecuencias de la rotura, de tipo Sin Salto (SS), de la membrana citoplasmática del ovocito durante la microinyección citoplasmática de espermatozoide (ICSI). Se han incluido 226 ciclos de ICSI realizados desde octubre de 2004 hasta diciembre de 2006 en el IVI-Barcelona. Se han dividido en dos grupos: grupo A ( $n = 111$  ciclos, 1291 ovocitos, 225 ovocitos con rotura SS), en el que hay al menos un ovocito dentro de la cohorte con rotura SS, y grupo B ( $n = 155$  ciclos, 1348 ovocitos), en el que no ha habido ningún ovocito con rotura SS en la cohorte. De los dos grupos se han calculado y comparado la tasa de degeneración ovocitaria y la tasa de fecundación. Una vez comprobada la fecundación se ha evaluado la evolución de los embriones en día 2 y día 3, siendo en este día cuando se realiza la transferencia embrionaria. En caso de tener embriones sobrantes de suficiente calidad, se ha procedido a su congelación. Se ha observado un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en la degeneración de ovocitos del grupo A. Un 10 % de los ovocitos con rotura tipo SS degeneran vs. un 4 % de los ovocitos que degeneran sin haber sufrido este tipo de rotura. Del mismo modo, se observa una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en la tasa de fecundación. Se encuentra una fecundación del 69 % en los ovocitos que han tenido rotura SS vs. un 75 % de fecundación en los ovocitos del grupo B. Los resultados muestran que, una vez conseguida la fecundación, la probabilidad de que un embrión sea transferido es independiente del tipo de rotura de la membrana ovocitaria, (28,2 % en grupo A vs. 33,6 % en grupo B). En conclusión, según este estudio, la rotura del oolema de tipo SS no compromete al desarrollo ni a la calidad embrionaria, una vez superada la fecundación.

### *Abstract*

The aim of this study was to assess the consequences of a sudden breakage (SS) of oocyte membrane while performing an intracytoplasmic sperm injection (ICSI). A retrospective analysis was performed on 226 cycles of ICSI in a 2 year period in our clinic. We categorized them in 2 groups: group A in which at least one oocyte presents SS breakage ( $n = 111$  cycles, 1291 oocytes, 225 SS membrane breakage oocytes) and group B in which no oocytes present SS breakage ( $n = 1555$  cycles, 1348 oocytes). We evaluate degeneration and fertility rate of each group. Once fertilization was assessed, embryo quality was evaluated in Day2 and D3. In this day, we performed the embryo transfer and in case of having a surplus of good quality embryos we proceed to freeze them. Degeneration rate was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in group A compared with group B (10% vs. 4% respectively). Fertility rate followed an exactly inverse pattern, being significantly lower ( $p < 0.05$ ) in group A compared with group B (69% vs. 75% respectively). Our data showed that, once fertilization was achieved, the probability of one specific embryo to reach the transfer do not depend of the kind of oocyte membrane breakage (28.2% Group A vs. 33.6% in Group B). Thus, these data indicate that SS type of breakage do not jeopardize neither embryo development nor quality once fertilization is reached.

---

## **INTRODUCCIÓN**

En técnicas de reproducción asistida, la microinyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) es una técnica de fecundación asistida muy utilizada desde que se probó como la más eficaz en casos de esterilidad masculina (Palermo *et al.*, 1992).

Para una adecuada realización de la técnica, primero se deben elegir y preparar correctamente los gametos. El ovocito a microinyectar debe ser un ovocito maduro (MII), es decir, que haya extruido el primer corpúsculo polar. Para poder observarlo, se le deben retirar las células del cúmulo que rodean la zona pelúcida. Este procedimiento recibe el nombre

de *decumulación*. Por otra parte, el espermatozoide debe ser activado mecánicamente, rompiendo el flagelo con ayuda de la micropipeta. Así se estimulará la reacción entre los diferentes componentes citoplasmáticos de ambos gametos.

Con el ICSI se consigue microinyectar un único espermatozoide con buena morfología y movilidad en la mejor zona del citoplasma. De esta manera se superan los pasos preliminares de la fecundación *in vivo*, como la reacción acrosómica y la fusión de membranas de los gametos.

La microinyección espermática está indicada en aquellos casos donde hay un factor masculino relacionado con baja concentración espermática, movilidad y/o morfología alterada, que impide una buena fecundación mediante la inseminación convencional (FIV). Del mismo modo el ICSI se utiliza en casos de fallo de fecundación por FIV, de no gestación en diferentes intentos de inseminación artificial homóloga o heteróloga (IAH) y en casos de diagnóstico genético pre-implantacional por PCR. En estos casos, ni las células del cúmulo, ni los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida deben interferir en el resultado.

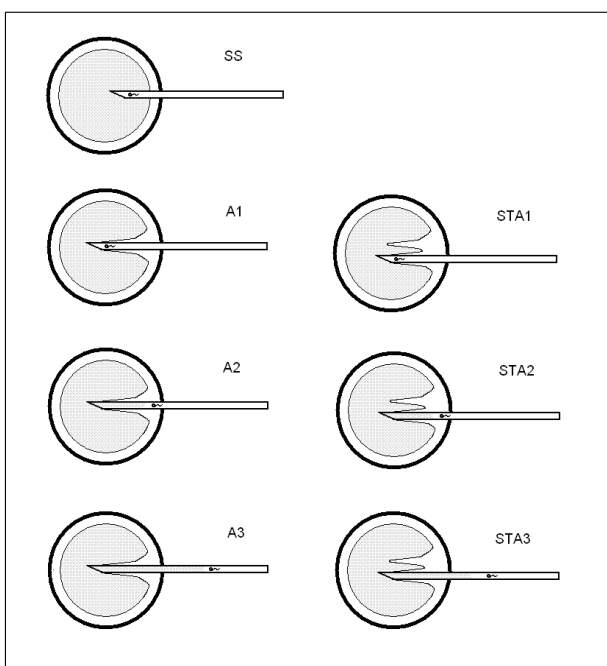
Esta técnica se lleva a cabo con la ayuda de un micromanipulador que dirige el movimiento de las dos micropipetas responsables del ICSI. Una de ellas (conocida como *holding*), mediante succión, sujeta el ovocito en la posición deseada para realizar el ICSI. Así, el ovocito se posiciona de manera que la zona del citoplasma adyacente al primer corpúsculo polar, donde teóricamente se encuentra el huso meiótico, queda alejada de la zona de microinyec-

ción, evitando la desestructuración de la placa metafásica. La segunda micropipeta (la de inyección) perfora sin problemas la zona pelúcida y la membrana citoplasmática u oolema, para depositar el espermatozoide en el ooplasma.

El oolema suele presentar una elasticidad y resistencia determinada frente a la pipeta de inyección, y aunque se deben reducir al máximo los daños ocasionados al ovocito durante la rotura, éste no siempre es posible. Dependiendo de la calidad ovocitaria y del grado de maduración de la membrana citoplasmática, la rotura de ésta se realizará de manera más o menos agresiva. En general, una cierta elasticidad en la membrana citoplasmática está relacionada con una buena calidad ovocitaria.

La categorización de los diferentes tipos de rotura de la membrana difiere entre los diferentes laboratorios de FIV. En 1995 Nagy *et al.* describieron cinco tipos de rotura diferentes: tipo A: el oolema se rompe durante el proceso de introducción de la pipeta sin aplicar ningún tipo de aspiración del citoplasma; tipo B: el oolema se rompe como consecuencia de una leve aspiración; tipo C: el oolema se rompe aspirando muy fuerte, sobrepasando la zona pelúcida; tipo D: el oolema se rompe después de la reintroducción de la pipeta en otra área, aspirando poco citoplasma; tipo E: el oolema se rompe debido a una fuerte aspiración después de la reintroducción de la pipeta en otra área. Palermo *et al.* en 1996 describieron tres tipos de rotura diferentes: normal, rápida y difícil. La rotura normal se define como aquella en la que el oolema presenta cierta resistencia y se rompe al aplicar un poco de presión; una rotura rápida es aquella en la que el oolema se rompe durante el proceso de introducción de la pipeta sin presentar resistencia alguna y, finalmente, una rotura difícil, aquella en la que se debe reintroducir la pipeta en otra área y en ocasiones aspirar citoplasma.

En la actualidad, en el laboratorio de FIV de IVI Barcelona para describir los diferentes tipos de rotura no se excluye ninguna de las anteriores, y de esta manera se identifican siete tipos de rotura diferentes: SS, A1, A2, A3, STA1, STA2, STA3. Rotura SS o Sin Salto: el oolema se rompe durante la introducción de la pipeta sin ningún tipo de resistencia; rotura A1: el oolema se rompe al introducir la pipeta observándose previamente una invaginación en la membrana siendo esto síntoma de una cierta elasticidad; rotura A2: aquella en la que no es posible una rotura A1, y el oolema se rompe como consecuencia de una leve aspiración del citoplasma; rotura A3: el oolema se rompe después de una aspiración citoplasmática importante al presentar una mayor resistencia a la rotura; rotura STA1 o Stirring: el oolema se rompe al reintroducir la pipeta en otra área aplicando



**Figura 1** Caracterización de las roturas. IVI-Barcelona.

**Taula 1** Características de los dos grupos incluidos.

	EDAD	Ovocitos	MII	SS
GRUPO A	34,04 ± 3,74	1291	1078	225 (20.87 %)
GRUPO B	34,83 ± 3,66	1368	1058	0 (0 %)

**Taula 2** Efecto de la rotura SS, comparándolo con la rotura no SS.

	T. degenerados (%)	T. fecundación (%)	T. fecundación anómala (%)	T. transferencia (%)	T. Congelados (%)
GRUPO A	10 <sup>a</sup>	69 <sup>b</sup>	9.8 <sup>c</sup>	28.2 <sup>d</sup>	25.0 <sup>f</sup>
GRUPO B	4	75	4	33,6	14,1

<sup>a</sup>  $\chi^2$  de Pearson:  $p = 0,001$ . Diferencia de degeneración entre Grupo A y Grupo B.

<sup>b</sup>  $\chi^2$  de Pearson:  $p = 0,01$ . Diferencia de fecundación entre Grupo A y Grupo B.

<sup>c</sup>  $\chi^2$  de Pearson:  $p = 0,002$ . Diferencia de fecundación anómala entre Grupo A y Grupo B.

<sup>d</sup>  $\chi^2$  de Pearson:  $p > 0,5$ . Diferencia de transferencia entre Grupo A y Grupo B.

<sup>f</sup>  $\chi^2$  de Pearson:  $p = 0,02$ . Diferencia de fecundación anómala entre Grupo A y Grupo B.

una cierta presión; rotura STA2: el oolema se rompe después de la reintroducción de la pipeta y una leve aspiración; rotura STA3: el oolema se rompe después de la reintroducción de la pipeta y una importante aspiración.

Cada tipo de rotura tiene una repercusión sobre el ovocito y su posterior desarrollo. En los estudios realizados por Nagy *et al.* en 1995 y Palermo *et al.* en 1996, se encuentra una mayor tasa de degenerados y una menor tasa de fecundación cuando la rotura es de tipo A o rápida (según la categorización del IVI Barcelona, una rotura de tipo SS) debido a una inmadurez del ooplasma y del oolema.

A las 17-20 horas posteriores a la microinyección, se comprueba la fecundación de los cigotos. Un cigoto correctamente fecundado debe tener 2 pronúcleos (el masculino y el femenino) y dos corpúsculos polares extruidos (el primario y el secundario). Se considera que la fecundación es anómala cuando en lugar de 2 pronúcleos, el cigoto presenta 1, 3 o más pronúcleos.

El desarrollo y la calidad de los embriones es valorado en día 2 y en día 3. El día de la transferencia se seleccionará los embriones (1 o 2) de mejor morfología entre todos los de la cohorte embrionaria.

## OBJETIVO

El objetivo de este estudio es averiguar si, diez años más tarde, con el perfeccionamiento de la técnica y con la experiencia de los biólogos, una rotura sin salto (SS) sigue teniendo las mismas repercusiones.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado un estudio retrospectivo en el que se han incluido 266 ciclos de fecundación *in vitro* realizados en nuestro centro desde octubre de 2004 hasta diciembre de 2006. Se trata de ciclos realizados con ovocitos propios en los cuales la técnica indicada para la inseminación es el ICSI. Se han dividido los ciclos en dos grupos: grupo A ( $n = 111$  ciclos, 1291 ovocitos), en el que hay al menos un ovocito dentro de la cohorte con rotura SS, y grupo B ( $n = 155$  ciclos, 1348 ovocitos), en los que no ha habido ningún ovocito con rotura SS en la cohorte. De cada grupo se ha valorado las tasas de degeneración, correcta fecundación y fecundación anómala. Por otro lado, se ha comparado el porcentaje de embriones transferidos o congelados según el tipo de rotura que se ha dado en el momento de la microinyección espermática.

## RESULTADOS

Este estudio consta de dos grupos de pacientes: A y B, correspondientes a pacientes que han tenido algún ovocito con rotura SS durante la microinyección en su cohorte, y a pacientes que no han tenido ningún ovocito con rotura SS en su cohorte ovocitaria respectivamente.

Ambos grupos son comparables en tratamiento, edad media, número de ovocitos totales y número de ovocitos maduros.



## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio retrospectivo revelan que el tipo de rotura SS aumenta la probabilidad de degeneración y disminuye la tasa de fecundación de manera significativa, del mismo modo que reflejaban los estudios de Nagy *et al.* y de Palermo *et al.* una década atrás.

El aumento significativo de la tasa de fecundación anómala, como afirman Palermo *et al.* (1996), es debido a la fragilidad o inmadurez de la membrana plasmática, que dificulta la extrusión del segundo corpúsculo polar (CP), el cual descondensa en el citoplasma, formándose un tercer pronúcleo

La comparación del número medio de embriones transferidos y el porcentaje de embriones congelados en los grupos A y B, no muestra ninguna diferencia significativa. Se puede concluir que una rotura SS no compromete el desarrollo ni la calidad embrionaria de los ovocitos correctamente fecundados.

Una rotura SS provoca la disminución del número de embriones que forman la cohorte embrionaria de una paciente. Por lo tanto, para que existan más posibilidades de selección en el momento de escoger el mejor o los mejores embriones para la transferencia embrionaria, se debe intentar evitar al máximo una rotura SS.

## BIBLIOGRAFÍA

- NAGY, Z. P.; LIU, J.; JORIS, G.; BOCKEN, G.; DESMET, B.; VAN RANST, A.; VANKELECOM, A.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A. C. (1995) «The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development rates». *Human reproduction*, 10(12): 3171-3177.
- PALERMO, G.; ALIKANI, M.; BERTOLI, M.; COLOMERO, L. T.; MOY, F.; COHEN, J.; ROSENWAKS, Z. (1996). «Oolemma characteristics in relation to survival and fertilization patterns of oocytes treated by intracytoplasmic sperm injection». *Human Reproduction*, 11(1): 172-176.
- REMOHÍ, J.; ROMERO, J. L.; PELLICER, A.; SIMÓN, C.; NAVARRO, J. (2000) *Manual práctico de la esterilidad y reproducción humana*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- REMOHÍ, J.; PELLICER, A.; SIMÓN, C.; NAVARRO, J. (2002). *Reproducción Humana*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- TROUNSON, A. O.; GARDNER, D. K. (2000). *In vitro fertilization*. Boca Raton, Florida: CRC.
- VEECK, L. L. (1999). *An atlas of human gametes and conceptuses*. Londres: Parthenon Publishing.

## ESTUDI DEL DESENVOLUPAMENT D'EMBRIONS PROCEDENTS D'OÒCITS METAFASE I MADURATS *IN VITRO*: RESULTATS PRELIMINARS

Íngrid Sebastia,<sup>1\*</sup> Mònica Parriego,<sup>1</sup> Ana Busquets,<sup>1</sup> Montserrat Boada,<sup>1</sup> Bonaventura Coroleu,<sup>1</sup> Anna Veiga<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus

Pg. Bonanova, 67. 08071 Barcelona. [ingseb@dexeus.com](mailto:ingseb@dexeus.com).

<sup>2</sup> Banc de Línies Cellulars, Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona

Dr. Aiguader, 88. 08003 Barcelona.

---

### Resum

**Objectius.** Analitzar el desenvolupament d'embrions procedents d'oòcits en metafase I (MI) madurats de manera espontània *in vitro*, per tal d'avaluar el possible benefici al cicle global de les pacients. **Material i mètodes.** Durant el període d'estudi en 23 cicles de fecundació *in vitro* (FIV) almenys un oòcit va ser classificat com a MI en el moment de l'alliberament. Tots aquells que en les quatre hores posteriors havien madurat van ser inseminats mitjançant microinjecció intracitoplasmàtica (ICSI) quatre hores més tard. Va realitzar-se'n el seguiment fins al moment de la possible transferència o congelació. **Resultats.** 38 dels 59 oòcits MI inclosos en l'estudi van madurar (64,4 %) i van ser microinjectats. La taxa de fecundació d'aquests oòcits va ser del 60,5 % i el percentatge d'embrions evolutius del 60,9 %. Van ser transferits sis embrions i vuit van ser congelats. **Conclusions.** S'observa una taxa de fecundació, un percentatge d'embrions evolutius i una qualitat embrionària inferior en el grup d'embrions procedents d'oòcits MI madurats *in vitro* quan es compara amb el grup control. Tot i així, cap d'aquestes comparacions assoleix potència estadística, a causa de, bàsicament, el baix nombre d'oòcits immadurs que s'han pogut incloure. És necessari ampliar el nombre de casos per tal d'obtenir dades concloents que permetin conèixer en quins casos podria existir un benefici real.

**Paraules clau** oòcit MI, taxa de maduració, taxa de fecundació, qualitat embrionària.

### Abstract

**Objectives.** To analyze the development of embryos derived from oocytes collected at metaphase I (MI) stage that had matured spontaneously *in vitro*, in order to evaluate their contribution to a patient's cycle. **Materials and methods.** During the study, 23 cycles of *In vitro* fertilization (IVF) showed at least one oocyte classified as MI after denudation. All oocytes that had matured in 4 hours were inseminated by intracytoplasmic microinjection (ICSI) 4 hours later. We followed up their evolution until the possible transfer or freezing. **Results.** Thirty-eight of 59 studied MI oocytes matured (64,4 %) and were microinjected. The fertilization rate of these oocytes was 60,5 % and the percentage of cleaving embryos was 60,9 %. Six embryos were transferred and 8 were frozen. **Conclusion.** Our results show that the fertilization rate, the percentage of cleaving embryos and the embryo quality were lower in embryos derived from MI matured oocytes than in the control group. However, none of these comparisons reach statistical significance possibly due to the low number of immature oocytes included. It would be necessary to add more data to the study in order to obtain conclusive results that allow knowing in which cases this procedure can result in a real benefit for the patient.

**Key words** MI oocyte, maturation rate, fertilization rate, embryo quality.

---

## INTRODUCCIÓ

Es calcula que entre un 15 i un 20 % del total d'oòcits recuperats en una punció fol·licular durant un tractament de fecundació *in vitro* (FIV) són immadurs, i es troben en estat de metafase I (MI) o de ve-

sícula germinal (VG) (Chen *et al.*, 2000; Vanhoutte *et al.*, 2005). Aquest percentatge pot variar en funció de diferents paràmetres, com ara les característiques de la pacient o el protocol d'estimulació utilitzat.

Davant l'elevada proporció de cicles en els quals es recuperen oòcits immadurs s'obre la possibilitat

del seu ús per a augmentar el nombre d'embrions evolutius amb la intenció de millorar el pronòstic per cycle.

En estudis publicats fins al moment es descriuen taxes de maduració espontània dels oòcits MI en les quatre hores següents a la punció que van del 27 % al 45 % (De Vos *et al.*, 1999; Strassburger *et al.*, 2004; Vanhoutte *et al.*, 2005). Aquestes variacions podrien explicar-se per diferències en les condicions de cultiu (Vanhoutte *et al.*, 2005).

Segons diversos autors les taxes de fecundació assolides quan aquests oòcits eren microinjectats resultaven inferiors a les obtingudes en els oòcits MII procedents de les mateixes cohorts (42-67 % vs. 68-88 %) i els embrions generats eren de pitjor qualitat (Balakier *et al.*, 2004; Desciscio *et al.*, 2000; Strassburger *et al.*, 2004; Vanhoutte *et al.*, 2005). No obstant això, altres grups no observaven aquestes diferències (Chen *et al.*, 2000). Aquest fet podria relacionar-se amb el *timing* decidit per a dur a terme la inseminació dels oòcits MI madurats.

En el present estudi s'ha fet un seguiment del desenvolupament dels embrions obtinguts a partir d'oòcits MI madurats abans de les 4 h postpunció i inseminats 4 h més tard. S'han avaluat les taxes de maduració i de fecundació, i també el percentatge d'embrions evolutius i la seva qualitat amb la intenció de conèixer el benefici que el seu ús aporta al cycle global de les pacients.

## MATERIAL I MÈTODES

Des de juny fins a novembre del 2006 va realitzar-se el seguiment de 59 oòcits MI, procedents de 23 pacients que es van sotmetre a un cycle de FIV a l'Institut Universitari Dexeus. Els criteris d'inclusió van ser disposar d'algun oòcit MI en el moment de la l'alliberament que hagués madurat en les quatre hores següents a la punció. La mitjana d'edat de les pacients va ser de  $34,9 \pm 3,63$  anys (28-41 anys).

Els protocols d'estimulació ovàrica i la metodologia de cultiu de gàmetes i embrions van ser els utilitzats habitualment al nostre centre (Barri *et al.*, 1988; Calderón *et al.*, 1995). No van emprar-se medis de maduració d'oòcits específics en cap cas.

Els oòcits madurs (MII) recuperats es van inseminar per microinjecció espermàtica (ICSI) a les quatre hores postpunció. En aquell mateix moment es procedia a l'observació dels immadurs (MI). Aquells oòcits MI que havien assolit l'estat de MII en aquell moment van ser inseminats quatre hores més tard ( $\pm 81,4$  minuts) mitjançant ICSI. No va microinjectar-se cap oòcit procedent de VG encara que hagués madurat.

L'observació de la fecundació es va realitzar a les 18-20 hores post-ICSI. La valoració de la qualitat embrionària es va fer a les  $40 \pm 2$  hores post-ICSI, moment en què es van seleccionar els embrions amb millor pronòstic per a la transferència. Al tercer dia de cultiu ( $68 \pm 2$  hores post-ICSI) es va dur a terme la congelació dels embrions amb desenvolupament correcte. Van ser considerats embrions evolutius la suma dels embrions transferits i congelats.

## RESULTATS

Dels 23 cycles de FIV-ICSI inclosos en el nostre estudi es van recuperar un total de 277 oòcits, dels quals 195 es trobaven en estat de MII (70,4 %), 59 en MI (21,3 %), 21 en VG (7,6 %) i 2 van resultar ser zones pellúcides trencades (0,7 %).

Dels 59 oòcits MI, 38 van madurar a MII (64,4 %) en les quatre hores postpunció.

La valoració de la fecundació dels oòcits madurats va mostrar que 22/38 presentaven 2PN (57,9 %), 1/38 presentava només 1PN (2,6 %), 9/38 no es van fecundar (23,7 %) i 6/38 oòcits es van lissar (15,8 %).

Els percentatges obtinguts després de l'ICSI dels 195 MII de les mateixes cohorts (grup control) van ser: 126/195 amb 2PN (64,6 %), 5/195 amb 1 PN (2,6 %), 6/195 amb 3PN (3,07 %), 39/195 no fecundats (20 %) i 19/195 lisats (9,7 %).

La taxa de fecundació dels oòcits MI madurats va ser del 60,5 % respecte al 67,2 % dels MII, i no es van observar diferències estadísticament significatives.

Catorze dels 23 embrions fecundats procedents d'oòcits MI madurats (60,9 %) van resultar evolutius. El percentatge d'embrions evolutius procedents de MII va resultar 10 punts superior (71 %), tot i que tampoc va ser estadísticament diferent a causa, probablement, de la baixa potència de l'estudi.

La mitjana de la qualitat embrionària dels embrions evolutius procedents d'oòcits MI madurats va ser de 6,1, i va ser de 6 la dels embrions que es van transferir i de 6,25 la dels embrions que es van congelar. Comparativament, la qualitat embrionària dels embrions evolutius procedents d'oòcits MII va resultar gairebé un punt superior (6,9), i presentava una qualitat mitjana de 6,97 els embrions transferits i de 6,85 els congelats. Malgrat això, les diferències entre ambdós grups d'embrions no són estadísticament significatives. Totes aquestes dades es troben resumides a la taula 1.

Van ser transferits sis embrions procedents d'oòcits madurats *in vitro* en cinc transferències. Dues de les transferències van ser exclusivament d'embrions procedents de MI madurats, mentre que tres van ser

**Taula 1** Detall dels resultats obtinguts en els grups estudi i control.

	Taxa de maduració oocitària	Taxa de fecundació	Taxa d'embrions evolutius	X Qualitat embrionària
Oòcits MI madurats <i>in vitro</i>	38/59 (64,4 %)	23/38 (60,5 %)	14/23 (60,9 %)	6,1
Oòcits MII	–	131/195 (67,2 %)	93/131 (71 %)	6,9

mixtes, amb embrions procedents d'oòcits MI madurats i de MII. Cap de les dues transferències homogènies d'oòcits madurats va donar lloc a embaràs. Només va aconseguir-se un embaràs a partir de les tres transferències mixtes. La transferència que va donar lloc a la gestació va ser de tres embrions, amb un de sol procedent del grup d'estudi. El fet que la gestació fos única no permet inferir de quin oòcit procedia. Aquesta transferència va ser l'única en què va triar-se l'embrió procedent d'oòcit madurat de manera preferent. En la resta de casos els embrions transferits van ser els únics disponibles.

En el grup control, van realitzar-se 16 transferències amb un total de 29 embrions transferits procedents d'oòcits recuperats en estadi MII, que van donar lloc a set embarassos (43,7 %).

La taxa d'embaràs obtinguda dels cicles en què s'havia transferit algun embrió procedent de MI madurat va ser del 20 % (1/5) vs. el 43,7 % quan tots els embrions transferits procedien d'MII (7/16). La mitjana d'edat i d'embrions transferits en els dos grups de pacients eren comparables.

Van congelar-se 8/23 embrions procedents d'oòcits madurats de sis pacients, amb una puntuació mitjana de qualitat embrionària de 6,25. No s'ha realitzat fins al moment cap descongelació d'aquests vuit embrions.

## DISCUSSIÓ

En el present article es descriuen els resultats preliminars d'un estudi que pretén avaluar el desenvolupament dels embrions derivats d'oòcits MI madurats i conèixer el benefici que aporten al cicle de les pacients. El nombre d'embrions inclosos fins al moment, en tractar-se d'un estudi en curs, ha estat baix i, per tant, podria ser que diferències entre certs paràmetres estudiats, que ara no es mostren significatives, puguin esdevenir-ho quan les dades a estudiar s'ampliïn.

El resultat obtingut, pel que fa a la taxa de maduració dels oòcits MI a les quatre hores postpunció, ha esdevingut significativament més elevat que els descrits fins al moment en altres estudis (64,4 % vs.

45 %) (Strassburger *et al.*, 2004; Vanhoutte *et al.*, 2005). La explicació a aquesta diferència que creiem més plausible podria ser deguda als tipus de medis de cultiu utilitzats.

Els nostres resultats mostren una taxa de fecundació acceptable quan aquests oòcits són microinjectats, superior a la majoria d'estudis publicats (Balakier *et al.*, 2004; Strassburger *et al.*, 2004; Vanhoutte *et al.*, 2005). Probablement el *timing* d'inseminació d'aquests oòcits, quatre hores després de l'extrusió del primer CP, permet una millor maduració citoplasmàtica, i s'aconsegueixen millors resultats. Els estudis que descriuen pitjors taxes de fecundació són aquells en què l'ICSI es realitza de manera immediata a l'extrusió del CP o bé en les 2,5 hores següents. Tot i que la majoria de grups observen que la taxa de fecundació resulta significativament inferior en el grup d'oòcits MI madurats i respecte als MII de les mateixes pacients (Descisciolo *et al.*, 2000; Balakier *et al.*, 2004; Strassburger *et al.*, 2004; Vanhoutte *et al.*, 2005), els nostres resultats no permeten concloure aquesta afirmació, ja que les diferències que s'observen no són estadísticament significatives (60,5 % vs. 67,2 %). L'elevada taxa de fecundació obtinguda dels MI madurats en el nostre estudi fa que probablement aquestes diferències siguin més difícils de detectar.

El percentatge d'embrions evolutius tampoc no ha presentat diferències estadísticament significatives entre els dos grups comparats, tot i que resulta lleugerament inferior en el grup d'embrions procedents d'oòcits madurats (60,9 % vs. 71 %). El mateix succeeix en relació a la qualitat embrionària dels embrions evolutius: resulta pitjor en els embrions del grup d'estudi, tot i que les diferències no assoleixen potència estadística (6,1 en embrions procedents d'oòcits madurats vs. 6,9 d'oòcits control). En la majoria de treballs publicats aquestes dues variables mostren diferències importants entre els dos grups analitzats (Huang *et al.*, 1999; Descisciolo *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000; Vanhoutte *et al.*, 2005). Resulta necessària la inclusió de més embrions en el nostre estudi per veure si, en les nostres mans, aquestes diferències també s'evidencien.

S'ha de tenir en compte que la selecció dels em-

brions a transferir es fa sempre en base a la qualitat embrionària. En els cicles en que es disposa d'un nombre insuficient d'embrions de bona qualitat procedents de MII, és quan s'utilitzen els embrions procedents de MI madurats, tractant-se òbviament de cicles amb un pitjor pronòstic.

Amb les dades obtingudes fins al moment no podem concloure que l'ús dels oòcits MI madurats aportin beneficis clars a les pacients. Malgrat això, el subgrup de pacients que presenten pocs o cap embrió derivat d'oòcits MII podria augmentar les taxes d'embaràs gràcies a la utilització del oòcits en MI madurats. És necessari ampliar l'estudi per a obtenir dades més concloents.

## BIBLIOGRAFIA

- BALAKIER, H.; SOJECKI, A.; MOTAMEDI, G.; LIBRACH, C. (2004). «Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear formation during metaphase II arrest». *Human Reproduction*, 19(4): 982-987.
- BARRI, P. N.; MARTÍNEZ, F. (1988). «Experiencia clínica de la utilización de un agonista GnRH en un programa de FIV». *Drugs of Today*, 2(Suppl. 24): 51-60.
- CALDERÓN, G.; BELIL, I.; ARAN, B.; VEIGA, A.; GIL, Y.; BOADA, M.; MARTÍNEZ, F.; PARERA, N.; COROLEU, B.; PENELLA, J.; BARRI, P. N. (1995). «Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in-vitro fertilization: first results». *Hum. Reprod.*, 10: 2835-2839.
- CHEN, S.; CHEN, H.; LIEN, Y.; HO, H.; CHANG, H.; YANG, Y. (2000). «Schedule to inject in vitro matured oocytes may increase pregnancy after intracytoplasmic sperm injection». *Archives of andrology*, 44: 197-205.
- DESCISCILO, C.; WRIGHT, D.; MAYER, J.; GIBBONS, W.; MUASHER, S.; LANZENDORF, S. (2000). «Human embryos derived from in vitro and in vivo matured oocytes: analysis for chromosomal abnormalities and nuclear morphology». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 17(5): 284-292.
- 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». *Human Reproduction*, 14(7): 1859-1863.
- HUANG, F.; CHANG, S.; TSAI, M.; LIN, Y.; KUNG, F.; WU, J.; LU, Y. (1999). «Relationship of human cumulus-free oocyte maturational profile with in vitro outcome parameters after intracytoplasmic sperm injection». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 16(9): 483-487.
- 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». *Human Reproduction*, 19(7): 1587-1590.
- VANHOUTTE, L.; DE SUTTER, P.; VAN DER ELST, J.; DHONT, M. (2005). «Clinical benefit of metaphase I oocytes». *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3: 71.

## VALORACIÓ DE LA QUALITAT EMBRIONÀRIA FINS A L'ESTADI DE BLASTOCIST EN EMBRIONS QUE PRESENTEN DIVISIÓ PRECOÇ

Sandra Pérez,<sup>1\*</sup> Gemma Arroyo,<sup>1</sup> Josep Santaló,<sup>2</sup> Montse Boada,<sup>1</sup>  
Buenaventura Coroleu,<sup>1</sup> Anna Veiga<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Servei de Medicina de la Reproducció, Dept. De Ginecologia i Obstetrícia, Institut Universitari Dexeus  
Pg. Bonanova, 89-91. 08017 Barcelona.

<sup>2</sup> Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona

<sup>3</sup> Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona

---

### Resum

**Objectius:** És important seleccionar el millor embrió per a la transferència, per tal de reduir les taxes d'embaràs múltiple sense disminuir les taxes de naixement globals. Aquest estudi analitza el valor predictiu de la divisió precoç (EC) com un paràmetre addicional de qualitat embrionària. **Mètodes:** Estudi retrospectiu de 96 cicles de DGP sobre 1.279 oòcits inseminats (FIV/ICSI). La divisió a l'estadi de 2 cèl·lules va ser determinada a les 26 h ( $\pm 2$ ) postinseminació. Els embrions diagnosticats per DGP van ser cultivats fins al dia 5, 6 o 7. La morfologia i el desenvolupament van ser observats i avaluats en el dia 2, 3 i fins a l'estadi de blastocist. **Resultats:** Dels 897 embrions fecundats, el 37,2 % presentaven EC. Els embrions de bona qualitat embrionària de dia 2 i 3 presentaven taxes més elevades d'EC que els de baixa qualitat. Els embrions que presentaven EC assolien l'estadi de blastocist en un percentatge superior als que no la presentaven (NEC). **Conclusions:** Els embrions EC mostren una competència de desenvolupament significativament més elevada que els embrions NEC. Per tal de millorar la selecció de l'embrió amb un major potencial d'implantació, la selecció per a la transferència no s'ha de basar únicament en la qualitat embrionària el dia de la transferència, sinó també en la valoració de l'EC.

**Paraules clau** divisió precoç, qualitat embrionària, cultiu de blastocists.

### Abstract

**BACKGROUND:** It is important to increase the ability for selecting the best embryos for transfer in order to reduce multiple pregnancy rates without decreasing birth rates overall. This study investigates the predictive value of early cleavage (EC) as an additional parameter for embryo quality. **METHODS:** Data from 96 cycles of preimplantational genetic diagnosis (PGD) were retrospectively evaluated. Cleavage to the 2-cell stage was determined 26h ( $\pm 2$ ) after insemination (IVF/ICSI). Embryos diagnosed by PGD were cultured to day 5, 6 or 7. Morphology and development were observed and evaluated at day 2, day 3 and to the blastocyst stage. **RESULTS:** Of the 897 fertilized embryos 37.2 % presented EC. Good quality embryos on day 2 and 3 showed more EC than poor quality ones. Embryos that presented EC achieved the blastocyst stage at a higher rate than the NEC embryos. **CONCLUSION:** EC embryos show significantly higher developmental competence than NEC embryos. In order to improve the selection of the embryo with the highest implantational potential, selection for transfer should not be based on embryo quality on the day of transfer alone, but also on the EC assessment.

**Key words** early cleavage, embryo quality, blastocyst culture.

---

## INTRODUCCIÓ

En els cicles de fecundació *in vitro* (FIV) és important transferir l'embrió amb millor pronòstic i major potencial d'implantació. Cal limitar el nombre d'embrions a transferir i minimitzar el risc d'embaràs múltiple, ja que genera problemes tant a la mare com als infants (Bergh *et al.*, 1999). A causa d'aquest

risc, molts països europeus han restringit legalment el nombre d'embrions a transferir, la qual cosa disminueix la taxa d'embaràs i els pacients han de ser sotmeses a més cicles.

Una bona valoració de l'embrió permet transferir el mínim nombre d'aquests sense que la taxa d'embaràs disminueixi. El criteri més utilitzat és avaluar l'embrió a les 44-47 hores i 67-71 hores postinsemi-

nació (d+2 i d+3), segons la morfologia i l'estadi de desenvolupament. Alguns autors (Scott i Smith, 1998; Tesarik i Greco, 1999) suggereixen, per altra banda, que la qualitat embrionària pot ser valorada avaluant els pronuclis segons el nombre de nuclèols, mida i distribució. Un altre indicador de qualitat embrionària és la valoració de la divisió precoç (EC) o temps de la primera divisió mitòtica 26 h després de la inseminació (Edwards *et al.*, 1984). En comparació amb els altres sistemes de puntuació en dia 1, aquest sistema és més simple, ràpid i reproducible en qualsevol laboratori dins la seva rutina.

La valoració d'EC ha demostrat tenir valor predictiu en les taxes d'embaràs després de fer FIV convencional (Edwards *et al.*, 1984; Shoukir *et al.*, 1997) o ICSI (Sakkas *et al.*, 1998; Bos-Mikich *et al.*, 2001; Lundin *et al.*, 2001; Fenwick *et al.*, 2002). Recents estudis sobre la transferència d'un sol embrió (SET) suggereixen que per a seleccionar un embrió amb un elevat potencial d'implantació cal tenir en compte l'EC a més de la puntuació en el dia de la transferència embrionària (Salumets *et al.*, 2003; Van Montfoort *et al.*, 2004). Giorgetti *et al.* (2007) proposen usar el valor predictiu d'EC per a seleccionar embrions amb puntuacions subòptimes, per ampliar la indicació de fer cicles SET sense disminuir les taxes d'embaràs.

L'objectiu d'aquest estudi és examinar si el fet que un embrió presenti EC es correlaciona amb una qualitat embrionària, tant en estadis primerencs (dia 2, 3) com en l'estadi de blastocist. La inclusió d'aquest paràmetre en la rutina del laboratori per a seleccionar embrions per a la transferència pot augmentar la taxa d'implantació/embaràs.

## MATERIAL I MÈTODES

### *Pacients*

L'estudi retrospectiu inclou 96 cicles corresponents a 86 parelles que es van sotmetre a un cicle de fecundació *in vitro* i diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) en el Servei de Medicina de la Reproducció de l'Institut Universitari Dexeus entre juliol de 2001 i juliol de 2006.

### *Estimulació de l'ovulació*

L'estimulació de l'ovulació va ser realitzada seguint un protocol amb agonista de la GnRH en associació amb gonadotropines. La resposta ovàrica va ser monitoritzada després del dia 6 amb una avaluació diària de la concentració d'estradiol i amb ecografia transvaginal. L'HCG (10.000 IU) va ser administra-

da 36 h abans de la recuperació dels oòcits, que es va fer per punció ecogràfica transvaginal.

### *Valoració de la qualitat embrionària*

Es van recuperar i inseminar per inseminació convencional (FIV) o microinjecció espermàtica (ICSI) un total de 1.279 oòcits. L'observació dels embrions es va realitzar en un microscopi invertit amb òptica de Nomarski, minimitzant el temps d'observació per tal de preservar la temperatura i el pH del medi de cultiu, que afecten el desenvolupament embrionari.

A les 18h ( $\pm 2$ ) postinseminació es va avaluar la fecundació, i es va considerar un zigot normal el que presentava un o dos pronuclis (PN) i dos corpuscles polars (CP).

La valoració de l'EC es va realitzar a les 26 h ( $\pm 2$ ) després de la inseminació i es va avaluar si hi havia divisió en dos blastòmers, simetria entre si, fragmentació citoplasmàtica i multinucleació en algun dels blastòmers.

Després de 44-48 h (dia 2) i de 66-70 h (dia 3) es va avaluar la qualitat embrionària. La valoració es va fer seguint els següents paràmetres: nombre de blastòmers i simetria entre si, grau de fragmentació i presència de blastòmers multinucleats. Els embrions considerats de qualitat òptima tenien quatre o sis blastòmers (dia 2 i dia 3, respectivament) de mida similar i sense multinucleació ni fragments. Els embrions de bona qualitat tenien 2-4 (dia 2) i 4-6 (dia 3) blastòmers sense multinucleació, de diferents mides o 15-25 % de fragments.

Per altra banda, els embrions de mala qualitat tenien menys de dos blastòmers (dia 2) o quatre (dia 3), o bé presentaven multinucleació, o bé  $\geq 30$  % de fragments o embrions aturats. Els embrions dels dos primers grups formen part del grup de bon pronòstic, mentre que els del 3r grup són considerats de mal pronòstic.

Els embrions biopsiats es van cultivar fins al dia 7 del seu desenvolupament. La valoració dels blastocists es va realitzar els dies 5, 6 i 7 postinseminació avaluant la morfologia (blastocist incipient, expandit, *hatching* o *hatched*), massa celular interna i trofoectoderm segons el dia de cultiu. La puntuació del blastocist utilitzada és una modificació de la proposta feta per Gardner *et al.* (1999).

### *Tractament estadístic de les dades*

Per a l'anàlisi estadística de les dades qualitatives es va aplicar el test de la  $\chi^2$  o el test de Fisher quan les mides mostrals ho han permès, mentre que per a l'anàlisi de les variables quantitatives es va utilitzar el test de T-Student o ANOVA, considerant que les da-

**Taula 1** Relació de la divisió precoç (EC/NEC) amb la qualitat embrionària.

		EC	% EC	NEC	% NEC	Total
D+2	Embrions fecundats	334	37,2	563	62,8	897
	Embrions bona qualitat	218	48,9	228	51,1	446
	Embrions baixa qualitat	116	25,7	335	74,3	451
	Total					897
D+3	Embrions bona qualitat	201	48,2	216	51,8	417
	Embrions baixa qualitat	133	27,7	347	72,3	480
	Total					897
D+5/+7	Blastocists	118	49,4	121	50,6	239
	No blastocists	176	36	313	64	489
	Total					728

des presenten diferències estadísticament significatives quan  $p < 0,05$ .

## RESULTATS

Els 96 cicles analitzats no presentaven diferències significatives pel que fa a l'edat de les pacients, nivell d'estradiol i nombre de fol·licles el dia de l'administració d'HCG, oòcits recuperats i oòcits que es trobaven en metafase II. La taxa de implantació va ser de 13,6 %, la d'embaràs de 22,2 % i la de nen viu a casa de 17,3 % per cicle.

El 83,3 % dels casos presentaven EC en algun dels embrions del cicle. Dels 897 embrions fecundats un 37,2 % presentaven EC.

En dia 2, el 48,9 % dels embrions d'òptima i bona qualitat presentaven EC, mentre que dels de baixa qualitat només un 25,7 % en presentava ( $p < 0,005$ ) (taula 1). Hi havia 176 embrions d'òptima qualitat (19,6 %), dels quals el 61,9 % presentaven EC ( $p < 0,005$ ).

En canvi, dels 62 embrions (6,9 %) que estaven poc dividits només n'hi havia el 9,7 % d'EC ( $p < 0,005$ ).

Els embrions multinucleats eren 63 (7 %) i un 23,8 % tenien EC ( $p < 0,005$ ).

Analitzant en detall els embrions que presenten EC, el resultat mostren que el 65 % presentaven simetria en els blastòmers a les 26 h ( $\pm 2$ ). Aquests embrions donen lloc a embrions de bon pronòstic en el 72,4 % dels casos, dada significativament més elevada que els que no presenten simetria ( $p < 0,005$ ).

Un 4,5 % dels embrions EC tenien multinucleació a les 26 h ( $\pm 2$ ), però en dia 2 la qualitat embrionària no presentava diferències significatives respecte dels que no presentaven multinucleació.

S'han observat 237 (71 %) embrions que no te-

nien fragments a l'EC i un 73,4 % d'aquests eren embrions de bon pronòstic en dia 2 ( $p < 0,005$ ).

Analitzant en detall els embrions que no presentaven EC (NEC), 52,6 % tenien els PN visibles a les 26 h ( $\pm 2$ ). D'aquests, el 36,8 % eren embrions de bon pronòstic en dia 2 davant del 63,2 % de mal pronòstic; els resultats observats no presenten diferències estadísticament significatives en comparar-los amb els zigots en els quals no s'observaven els PN.

Un 76,8 % dels embrions NEC que estaven poc dividits en dia 2 tenien els PN visibles a les 26 h ( $\pm 2$ ) postinseminació ( $p < 0,005$ ).

En dia 3, un 48,2 % dels embrions de bon pronòstic presentaven EC, mentre que dels de mal pronòstic només un 27,7 % en presentava ( $p < 0,005$ ) (Taula 1).

Es van biopsiar 728 embrions (81,2 %), dels quals el 58,4 % eren embrions de bon pronòstic davant del 41,6 % de baix pronòstic ( $p < 0,005$ ).

La taxa global de blastocist va ser del 32,8 %. Dels embrions que van arribar a blastocist, el 49,4 % presentaven EC, mentre que dels embrions que no arribaven a blastocist un 36 % tenien EC ( $p < 0,005$ ) (taula 1).

## DISCUSSIÓ

En el present estudi, els grups (EC-NEC) analitzats són comparables, ja que no presentaven diferències significatives entre si.

El nombre d'embrions fecundats que presentaven EC (37,2 %) concorda amb altres estudis (Çiray *et al*, 2006; Giorgetti *et al*, 2007). La taxa d'implantació va ser del 13,6 %, i la d'embaràs del 22,2 %, comparables amb altres estudis de DGP.

Els embrions de bona qualitat en dia 2 i 3 presentaven una taxa elevada d'EC (48,9 % i 48,2 %, respectivament), mentre que els de baixa qualitat en



presentaven, però en menor grau (25,7 % i 27,7 %, respectivament).

En els embrions de bon pronòstic també es van observar diferències entre els òptims (61,9 % EC) i els poc dividits (9,7 % EC).

Els embrions que presentaven EC amb simetria i sense fragments també tenien bona qualitat embrionària en dia 2 (72,4 % i 73,4 %, respectivament), mentre que dels embrions NEC un 63,2 % eren de baixa qualitat. Aquestes dades concorden amb altres estudis que descriuen que els embrions que presenten EC tenen una millor qualitat embrionària comparats amb els embrions de divisió tardana (Sakkas *et al.*, 1998; Bos-Mikich *et al.*, 2001; Lundin *et al.*, 2001; Salumets *et al.*, 2003; Van Montfoort *et al.*, 2004).

La raó per la qual els embrions que es divideixen més ràpidament tenen millor qualitat embrionària és encara desconeguda. Se suggereix que els embrions amb EC provenen d'òcits amb una millor maduració nuclear i citoplasmàtica o millor metabolisme, com disponibilitat i competència d'ATP, mRNA i mitocondris. La primera divisió mitòtica distribueix els components preparats en l'òcit durant el desenvolupament a dos blastòmers, i una distribució incorrecta i desigual de certs productes gènics o components citoplasmàtics en les cèl·lules pot afectar el futur desenvolupament. Çiray *et al.* (2006) especulen que la divisió precoç i la simetria indiquen dos factors diferents, concentració i distribució dels components nuclears i citoplasmàtics. Per tant, un embrió amb una elevada concentració de components intracel·lulars s'esperarà que es divideixi abans, sense tenir en compte la simetria, però quan la distribució no és homogènia entre els blastòmers (asimetria), el futur desenvolupament de l'embrió i, per tant, la seva implantació, es veuran compromesos. Altres autors suggereixen que EC pot anar relacionat amb un factor patern a causa de la contribució dels centriols de l'espermatozoide (Palermo *et al.*, 1994) o a la sincronització dels genomes patern i matern (Boiso *et al.*, 2002).

En l'última dècada, els avenços en el coneixement dels requeriments nutritius de l'embrió han fet evolucionar el cultiu embrionari fins al dia 5-6 (estadi de blastocist).

Diversos estudis (Neuber *et al.*, 2003; Guerif *et al.*, 2006) confirmen que la valoració seqüencial fins a l'estadi de blastocist permet seleccionar el millor embrió per a la transferència, ja que allargant el període de cultiu es poden valorar els embrions en diferents estadis i detectar també els més avançats o no aturats. Alikani *et al.* (2000) descriuen que mentre que el 70 % dels òcits fecundats *in vitro* experimenten les tres primeres divisions durant tres dies de

cultiu, menys de la meitat caviten després de cinc dies, i al voltant d'una tercera part formen blastocists morfològicament òptims amb una massa cel·lular interna ben definida, un trofocoderm cohesiu i expansió completa. El seu estudi relaciona la morfologia en els primers estadis embrionaris i la formació del blastocist *in vitro*, i demostra que hi ha paràmetres que interfereixen negativament, com són el desenvolupament lent, la fragmentació i la multinucleació.

En aquest estudi els embrions biopsiats es van mantenir en cultiu fins al dia 7 i el 32,8 % van arribar a blastocist. El 49,4 % de blastocists presentaven EC, mentre que dels que no arribaven a blastocist un 36 % tenien EC. Aquests resultats es poden haver vist afectats perquè la biòpsia embrionària pot tenir efectes negatius en el desenvolupament de l'embrió.

En conclusió, els embrions que presenten EC tenen una millor qualitat embrionària el dia 2 i 3 i assoleixen l'estadi de blastocist en un percentatge adequat. S'ha de tenir en compte que el nostre estudi tracta d'embrions biopsiats el dia 3, i que això pot comprometre la seva capacitat de desenvolupament. Per a valorar l'arribada a blastocist s'haurien d'estudiar embrions que no hagin estat biopsiats o valorar si la biòpsia afecta el desenvolupament posterior.

## BIBLIOGRAFIA

- ALIKANI, M.; CALDERON, G.; TOMKIN, G. [*et al.*] (2000). «Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro». *Hum Reprod.*, 15(12): 2634-2643.
- BERGH, T.; ERICSON, A.; HILLENSSJO, T. [*et al.*] (1999). «Deliveries and children born after in-vitro fertilisation in Sweden 1982-95: a retrospective cohort study». *Lancet*, 354(9190): 1579-1585.
- BOISO, I.; VEIGA, A.; EDWARDS, R. G. (2002). «Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer». *Reprod. Biomed. Online*, 5(3): 328-350.
- BOS-MIKICH, A.; MATTOS, A. L. G.; FERRARI, A. N. (2001). «Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome». *Hum. Reprod.*, 16(12): 2658-2661.
- ÇIRAY, H. N.; KARAGENC. L.; ULUQ, U. [*et al.*] (2006). «Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos». *Fertil. Steril.*, 85(2): 358-365.
- EDWARDS, R. G.; FISHEL, S. B.; COHEN, J. [*et al.*] (1984). «Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility». *J. In Vitro Fert. Embryo Transf.*, 1(1): 3-23.
- FENWICK, J.; PLATTEAU, A. P.; HERBERT, M. [*et al.*] (2002). «Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplan-

- tation embryos in vitro». *Hum. Reprod.*, 17(2): 407-412.
- GARDNER, D. K.; SCHOOLCRAFT, W. B. (1999). «In vitro culture of human blastocyst». A: Jansen, R.; Mortiner, D. [ed.] *Towards reproductive certainty: fertility and genetics beyond 1999*. Carnforth, RU: Parthenon Publishing, p. 378-388.
- GIORGETTI, C.; HANS, E.; TERRIOU, P. [et al.] (2007). «Early cleavage: an additional predictor of high implantation rate following elective single embryo transfer». *Reprod. Biomed. Online.*, 14(1): 85-91.
- GUERIF, F.; POINDRON, J.; BIDAULT, R. [et al.] (2006). «Sequential assessment of individually cultured embryos in IVF». *Gynecol. Obstet. Fertil.*, 34(9): 801-807.
- LUNDIN, K.; BERGH, C.; HARDARSON, T. (2001). «Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF». *Hum. Reprod.*, 16(12): 2652-2657.
- NEUBER, E.; RINAUDO, P.; SAKKAS, D. [et al.] (2003). «Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development». *Hum. Reprod.*, 18(6): 1307-1312.
- PALERMO, G.; MUNNÉ, S.; COHEN, J. (1994). «The human zygote inherits its mitotic potential from the male gamete». *Hum. Reprod.*, 9(7): 1220-1225.
- SAKKAS, D.; SHOUKIR, Y.; CHARDONNENS, D. [et al.] (1998). «Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability». *Hum. Reprod.*, 13(1): 182-187.
- SALUMETS, A.; HYDÉN-GRANSKOG, C.; MÄKINEN, S. [et al.] (2003). «Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo procedures». *Hum. Reprod.*, 18(4): 821-825.
- SCOTT, L. A.; SMITH, S. (1998) «The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval». *Hum. Reprod.*, 13(4): 1003-1013.
- SHOUKIR, Y.; CAMPANA, A.; SAKKAS, D. [et al.] (1997). «Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability». *Hum. Reprod.*, 12(7): 1531-1536.
- TESARIK, J.; GRECO, E. (1999). «The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology». *Hum. Reprod.*, 14(5): 1318-1323.
- VAN MONTFOORT, A. P.; DUMOULIN, J. C.; KESTER, A. D. [et al.] (2004). «Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers». *Hum. Reprod.*, 19(9): 2103-2108.



## TRANSFERÈNCIA D'UN SOL EMBRIÓ CONGELAT: FACTORS EMBRIOLÒGICS PREDICTIUS

Marta Valiente,<sup>1</sup> Miquel Solé,<sup>1</sup> Josep Santaló,<sup>3</sup> Montse Boada,<sup>1</sup> Ventura Coroleu,<sup>1</sup> Anna Veiga<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus

<sup>2</sup> Banc de Línies Cellulars, Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona

<sup>3</sup> Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Ciències, Unitat de Biologia Cel·lular

---

### Resum

En aquest treball s'estudia quins són els factors embriològics que influeixen potencialment en el resultat de la transferència d'embrions criopreservats. Es realitza un estudi retrospectiu de 356 criotransferències (CT) d'un sol embrió relacionant paràmetres embriològics amb la taxa d'embaràs (TE). S'obté una TE general del 19,9 %. Es troba que els factors que es correlacionen amb una taxa d'embaràs elevada són: *timing* de divisió correcta i simetria dels blastòmers abans de congelar, la supervivència embrionària postdescongelació i la represa de la mitosi en el cultiu postdescongelació.

**Paraules clau** criopreservació, criotransferència, qualitat embrionària, supervivència, represa de la mitosi.

### Abstract

In this study we analyze which are the embryologic factors which could potentially influence the outcome of cryopreserved embryo transfers. A retrospective study of 356 single embryo transfers (sET) was performed relating embryologic parameters and the pregnancy rate (PR). A PR of 19.9 % was obtained. We observed that the factors correlated with an increase of the PR were: timing of cell division and the blastomer's symmetry before freezing; the survival rate and the resumption of mitosis after culture post-thawing.

---

## INTRODUCCIÓ

Fa poc més de 20 anys es va aconseguir el primer embaràs en humans procedent de la transferència d'embrions congelats (Trounson i Mohr, 1983). Actualment la criopreservació és un procediment rutinari i molt important en els programes de reproducció assistida (RA). La criopreservació d'embrions permet emmagatzemar-los per a transferències futures, d'aquesta manera es pot reduir el nombre d'embrions a transferir en el cicle en fresc, i així es disminueix el risc d'embaràs múltiple. Tot i que alguns estudis mostren taxes d'embaràs més baixes en transferències d'un embrió *vs.* dos, aquestes diferències desapareixen quan s'inclouen les taxes acumulades de les CT derivades del cicle en fresc (Thurin *et al.*, 2004).

La majoria d'estudis mostren pitjors resultats en la transferència d'embrions congelats respecte a la transferència d'embrions en fresc (Toner *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2001; Oehning *et al.*, 2000). El procés de congelació i descongelació té un impacte

negatiu sobre la seva viabilitat i la capacitat d'implantació. En els últims anys s'han descrit un seguit de factors clínics i embriològics que ens permeten realitzar una selecció més acurada de l'embrió a transferir després de la descongelació. Entre els factors embriològics predictius del potencial implantatori dels embrions s'han descrit: morfologia de l'embrió abans de criopreservar (Schalkoff *et al.*, 1993; Salumets *et al.*, 2003), supervivència embrionària en descongelar (Guerif *et al.*, 2002; El-Toukhy *et al.*, 2003; Pal *et al.*, 2004) i la represa de la mitosi en les 24 hores següents a la descongelació (Ziebe *et al.*, 1998; Guerif *et al.* 2002; Gabrielsen *et al.*, 2006).

L'objectiu d'aquest treball és avaluar l'efecte dels factors embriològics, estudiant la CT d'un sol embrió, en el potencial d'implantació.

## MATERIAL I MÈTODES

S'han avaluat retrospectivament totes les CT d'un sol embrió ( $n = 356$ ) procedents del programa de

**Taula 1** Taxa d'embaràs en relació a la morfologia embrionària abans de la congelació.

Morfologia embrionària	Total criotransferències	Implantació %
<b>Dia 2</b>		
4 cèl·lules	53	18,9 %
> 4 cèl·lules	19	21,1 %
<b>Dia 3</b>		
< 6 cèl·lules	72	9,7 %
≥ 6 cèl·lules	212	23,6 % *
<b>Simetria celular</b>		
Iguals	58	34,5 %
Similars	93	26,9 %
Diferents	205	12,7 % **
<b>Fragmentació (%)</b>		
Sense fragments	118	22,9 %
5-25	194	20,1 %
≥ 25	44	11,4 % <sup>ns</sup>

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; ns: no significatiu.

**Taula 2** Taxa d'embaràs en relació a l'*score* embrionari en fresc.

Total criotransferències	Implantació %
<b>Score en congelar</b>	
8/9/10	160 27,5% **
6/7	124 17,7% **
≤ 5	70 7,1% **

\*\*  $P < 0,01$

FIV realitzades des de l'any 2001 al 2005 a l'Institut Universitari Dexeus.

Es van excloure del estudi les CT d'embrions procedents dels programes de donació d'òocits. La mitjana d'edat de les pacients el dia de la punció fol·licular era de  $35 \pm 4,4$  anys ( $\pm$  SD).

L'avaluació dels embrions en fresc es va realitzar examinant el nombre de blastòmers, el percentatge de fragmentació, la simetria dels blastòmers i l'absència de multinucleació. Els embrions congelats van ser classificats seguint un criteri de *score* embrionari en dia 2 i dia 3 basant-nos en els paràmetres anteriors.

El criteri utilitzat per a congelar els embrions es basa en el *timing* de divisió ( $\geq 4$  blastòmers en dia +2 i  $\geq 4$  blastòmers en dia +3) i en un percentatge de fragmentació inferior al 35 %. No es van congelar els embrions que presentaven multinucleació. La majoria dels embrions van ser criopreservats en dia +3 (79,8 %).

Per a avaluar com afecta el grau de fragmentació es van analitzar tres grups: no fragmentats, 5-25 % i

$\geq 25$  %. Pel que fa a la simetria dels blastòmers, aquests poden ser *iguals*, *similars* i *diferents*.

Després de la descongelació es va avaluar el nombre de blastòmers supervivents (percentatge de supervivència) i es va deixar l'embrió en cultiu durant 18-24 hores. Respecte al percentatge de supervivència, es van definir quatre grups: 100 % de supervivència (embrió intacte), de 100-80 %, 80-50 % i  $\leq 50$  %.

Just abans de la transferència es va realitzar una segona observació per a valorar la represa de la mitosi. Es varen establir quatre grups: fusió de blastòmers, blastòmers no dividits, divisió d'un sol blastòmer i divisió de més d'un blastòmer, incloent-hi els que presentaven signes de compactació.

L'anàlisi comparativa entre les diferents variables categòriques es va realitzar utilitzant tests de  $\chi^2$  o taules de contingència.

## RESULTATS

La TE obtinguda del total de les 356 CT va ser del 19,9 %.

### *Anàlisi univariant de la morfologia de l'embrió en fresc*

Es va trobar una correlació entre el nombre de blastòmers de l'embrió en dia +3 i la TE (taula 1). Embrions amb  $< 6$  blastòmers en dia +3 presentaven una TE significativament inferior d'aquells que tenien  $\geq 6$  (9,7 % vs. Un 23,6 %, respectivament;  $p < 0,05$ ).

**Taula 3** Taxa d'embaràs en relació a la supervivència embrionària i divisió postdescongelació.

Total criotransferències	Implantació %	
Supervivència (%)		
100	170	25,9 % **
100-80	51	23,5 % **
80-50	80	16,3 %
≤ 50	55	3,6 %
Divisió embrionària		
Fusió cel·lular	7	0 %
No dividits	112	13,4 %
Divisió 1 cèl·lula	65	15,4 %
Divisió ≥ 2	172	26,7 % **

\*\*  $P < 0,01$

Pel que fa al percentatge de fragments, no es va trobar cap diferència estadísticament significativa en la TE entre el grup d'embrions que presentaven < 25 % de fragments (TE = 21,1 %), dels que en tenien ≥ 25 % (TE = 11,4 %), tal com s'exposa en la taula 1.

Pel que fa a la simetria dels blastòmers, es va veure que era un factor important a tenir en compte per a predir l'èxit de la CT. A mides de blastòmers iguals o similars no s'observaren diferències significatives, ja que les TE eren del 34,5 % i del 26,9 %, respectivament. No obstant això, hi ha una disminució clara, estadísticament significativa, de la TE (12,7 %;  $p < 0,01$ ) en el grup d'embrions que presentaven blastòmers asimètrics (taula 1).

Es va analitzar la TE per a tres grups de *scores* embrionaris en fresc descrits a la taula 2: els que presentaven un *score* de 8-9-10 (embrions òptims), els que tenien una puntuació de 6-7, i els de ≤ 5. Es va veure que la TE postdescongelació augmentava de manera significativa si els embrions presentaven un *score* en fresc més elevat.

#### **Anàlisi univariant de la supervivència embrionària**

Avaluant els resultats de la supervivència embrionària postdescongelació (taula 3), els embrions intactes i els que mostraven > 80 % dels blastòmers intactes tenien una TE similar (25,9 % i 23,5 %, respectivament). Aquestes TE, però, eren significativament més elevades ( $p < 0,01$ ) que la del grup d'embrions que presentaven una taxa de supervivència entre el 80-50 % o ≤ 50 % (16,3 % i 3,6 %, respectivament).

#### **Relació de l'*score* en fresc i la taxa de supervivència**

Tal com es mostra a la taula 4, no s'ha trobat correlació entre e l'*score* embrionari i la taxa de supervivència.

#### **Anàlisi univariant de la represa de la mitosi**

El grup d'embrions que no s'havien dividit mostren TE similars (taula 3) a la dels embrions que només presentaven un blastòmer dividit (13,4 % i 15,4 %, respectivament). No obstant això, els embrions amb ≥ 2 blastòmers dividits o amb indicis de compactació presentaven un augment estadísticament significatiu de la TE (26,7 %;  $p < 0,01$ ).

## **DISCUSSIÓ**

La TE obtinguda ha estat del 19,9 %, similar a la que mostren altres publicacions (Ziebe *et al.*, 1998; Salumets *et al.*, 2006).

En aquest treball vàrem trobar una correlació estadísticament significativa entre el nombre de blastòmers de l'embrió en dia +3 i la TE. D'acord amb altres estudis (Guerif *et al.*, 2002; Gabrielsen *et al.*, 2006) els embrions que presenten millors TE són els que presenten un ritme de divisió adequat, és a dir, en dia +3, ≥ 6 blastòmers.

El percentatge de fragments també és un paràmetre important a tenir en compte a l'hora d'avaluar la morfologia. Publicacions com la Salumets *et al.* (2006) mostren que, a menys nombre de fragments, millors TE. No obstant això, en la nostra anàlisi no hem trobat diferències estadísticament significatives, probablement a causa del baix nombre d'embrions amb ≥ 25 % de fragments que analitzem i al fet que el màxim percentatge es troba en el límit de 35 % de fragments.

Pel que fa a la simetria dels blastòmers, els nostres resultats mostren que embrions amb blastòmers asimètrics, amb patrons de divisió probablement alterats, són de pitjor pronòstic.

Analitzant la TE per als diferents *scores* embrionaris, podem concloure, com altres estudis previs (Salumets *et al.*, 2006), que a millor qualitat embrionària abans de congelar, millors TE. Al contrari del que s'ha descrit a la literatura (Karlström *et al.*, 1997), no trobem correlació entre els diferents grups d'*scores* embrionaris i la supervivència. El nostre *score* dona molt pes al nombre de blastòmers enfront dels altres paràmetres. És probable que la supervivència embrionària estigui més relacionada amb fac-

**Taula 4** Relació de l'*score* en fresc i la taxa de supervivència.

Score en congelar	Nombre d'embrions	Taxa de supervivència	Nombre de CT	Implantació
8/9/10	160	80-100 %	97 (62 %)	35,1
		50-80 %	35 (22 %)	22,9
		≤ 50 %	24 (8,3 %)	8,3
6/7	124	80-100%	70 (58 %)	24,3
		50-80 %	26 (21,5 %)	19,2
		≤ 50 %	25 (20,6 %)	0
≤ 5	70	80-100 %	50 (71 %)	10
		50-80 %	14 (20 %)	0
		≤ 50 %	6 (8 %)	0

tors com la fragmentació o factors propis de l'embrió, dades que no s'han analitzat.

La taxa de supervivència postdescongelació és un bon factor predictiu de l'èxit de la CT. Es considera que un embrió sobreviu a la descongelació si com a mínim es manté el 50 % dels seus blastòmers inicials intactes, citoplasma clar i refringent i sense trencament de la zona pellúcida (Freeman *et al.*, 1986; Van den Abbel *et al.*, 1997). D'acord amb els estudis més recents (Tang *et al.*, 2006; Salumets *et al.*, 2006), embrions amb millor supervivència aporten TE més elevades. Tot i això, alguns autors han publicat que no hi ha un efecte negatiu pel que fa a la TE si es transfereixen embrions amb baixes taxes de supervivència (Hartshorne *et al.*, 1990); fins i tot es coneixen resultats d'embaràs amb embrions que presentaven menys del 50 % de supervivència (Veiga *et al.*, 1987). A diferència dels treballs publicats l'any 2006, esmentats anteriorment, no observem una disminució significativa de la TE entre embrions que presenten una supervivència del 100 % i els que presenten una proporció baixa de blastòmers lisats (100-80 %). La disminució de la taxa de supervivència per sota del 80 % es correlaciona amb TE significativament més baixes.

Actualment el cultiu *in vitro* durant 24 hores abans de la transferència no està establert en tots els equips de treball. Molts grups transfereixen els embrions el mateix dia de la descongelació, però el fet d'avaluar la represa de la mitosi d'aquests embrions descongelats pot constituir una eina eficaç a l'hora de predir la seva capacitat d'implantació. Alguns estudis previs han demostrat que la transferència d'embrions que es continuen dividint *in vitro* en les 18-24 hores següents millora significativament la TE (Van der Elst *et al.*, 1997; Ziebe *et al.*, 1998; Guerif *et al.*, 2002; Salumets *et al.*, 2006). A diferència d'aquests estudis, nosaltres vàrem separar els embrions que reiniciaven la mitosi en dos grups, i s'observava que

només es produïa un augment de la TE si es dividien un mínim de dos blastòmers o l'embrió compactava.

Podem concloure que els paràmetres que tenen un poder predictiu sobre l'èxit d'una CT són: el *timing* de divisió i la simetria dels blastòmers abans de congelar, la supervivència embrionària i la represa de la mitosi postdescongelació. Obtindrem un màxim potencial d'implantació quan l'embrió presenti el *timing* correcte de divisió abans de la criopreservació, una supervivència ≥ 80 % i una divisió d'un mínim de dos blastòmers o amb indicis de compactació posterior al cultiu postdescongelació.

## BIBLIOGRAFIA

- EL-TOUKHY, T.; KHALAF, Y.; AL-DARAZI, K. [*et al.*] (2003). «Effect of blastomere loss on the outcome of frozen embryo replacement cycles». *Fertil. Steril.*, 79: 1106-1111.
- FREEMAN, L.; TROUNSON, A.; KIRBY, C. (1986). «Criopreservation of human embryos: progress on the clinical use of the technique in human in vitro fertilization». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 3: 53-61.
- GABRIELSEN, A.; FEDDER, J.; AGERHOLM, I. (2006). «Parameters predicting the implantation rate of thawed IVF/ICSI embryos: a retrospective study». *Reprod. Biomed. Online*, 12(1): 70-76.
- GUERIF, F.; BIDAULT, R. [*et al.*] (2002). «Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation: a reappraisal». *Hum. Reprod.* 17: 1321-1326.
- HARTSHORNE, G. M.; WICK, K.; ELDER, K.; DYSON, H. (1990). «Effect of cell number at freezing upon survival and viability of cleaving embryos generated from stimulated IVF cycles». *Hum. Reprod.*, 5: 857-861.
- KARLSTRÖM, P.-O.; BERGH, T. [*et al.*] (1997). «Prognostic factors for the success rate of embryo freezing». *Hum. Reprod.*, 12: 1263-1266.
- PAL, L.; KOVACS, P.; WITT, B. [*et al.*] (2004) «Posthaw blastomere survival is predictive the success of frozen-

- thawed embryo transfer cycles». *Fertil. Steril.*, 82: 821-826.
- OEHNING, S.; MAYER, J.; MUASHER, S. (2000). «Impact of different clinical variables on pregnancy outcome following embryo criopreservation». *Mol. Cell. Endocr.*, 169: 73-77.
- SALUMETS, A.; TUURI, T. [et al.] (2003). «Effect of developmental stage of embryos at freezing on the pregnancy outcome of frozen-thawed embryo transfers». *Hum. Reprod.*, 18: 1890-1895.
- SALUMETS, A.; SUIKKARI, A. M.; MÄKINEN, S. [et al.] (2006). «Frozen embryo transfers: implications of clinical and embryological factors on the pregnancy outcome». *Hum. Reprod.*, 21: 2368-2374.
- SCHALKOFF, M. E.; OSKOWITZ, S. P.; POWERS, R. D. (1993). «A multifactorial analysis of the pregnancy outcome in a successful embryo criopreservation program». *Fertil. Steril.*, 59: 1070-1074.
- TANG, R.; CATT, J.; HOWLETT, D. (2006). «Towards defining parameters for a successful single embryo transfer in frozen cycles». *Hum. Reprod.*, 21: 1179-1183.
- THURIN, A.; HAUSKEN, J. [et al.] (2004). «Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in vitro fertilization. *NEJM*, 351: 2392-2402.
- TONER, J. P.; PHILPUT, C. B.; JONES, G. S.; MUASHER, S. J. (1991). «Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age». *Fertil. Steril.*, 55: 784-791.
- TROUNSON, A.; MOHR, L. (1983). «Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo». *Nature*, 305: 707-709.
- VAN DEN ABBEEL, E.; CAMUS, M.; VAN WAESBERGHE, L. [et al.] (1997). «Viability of partially damaged human embryos after criopreservation». *Hum. Reprod.*, 12: 2006-2010.
- VAN DER ELST, J.; VAN DEN ABBEEL, E. [et al.] (1997). «Selective transfer of criopreserved human embryos with further cleavage after thawing increase delivery and implantation rates». *Hum. Reprod.*, 12: 1513-1521.
- VEIGA, A.; CALDERON, G.; BARRI, P. N.; COROLEU, B. (1987). «Pregnancy after the replacement of a frozen-thawed embryo with <50 % intact blastomeres». *Hum. Reprod.*, 2: 321-323.
- WANG, J. X.; YAP, Y. Y.; MATTHEWS, C. D. (2001). «Frozen-thawed embryo transfer: influence of clinical factors on implantation rate and risk of multiple conception». *Hum. Reprod.*, 16: 2316-2319.
- ZIEBE, S.; BECH, B.; PETERSEN, K. [et al.] (1998). «Resumption of mitosis during post-thaw culture: a key parameter in selecting the right embryos for transfer». *Hum. Reprod.*, 13: 178-181.





## **DONACIÓ D'EMBRIONS VIABLES PER A RECERCA AL NOSTRE PAÍS: RESPOSTA DE LES PACIENTS**

M. Luna,\*<sup>1</sup> M. Boada,<sup>1</sup> B. Aran,<sup>2</sup> V. Coroleu,<sup>1</sup> A. Veiga,<sup>1,2</sup> P. N. Barri<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servei de Medicina de la Reproducció, Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció,  
Institut Universitari Dexeus

*marlun@dexeus.com*

<sup>2</sup> Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona

---

### *Resum*

Des de l'aprovació de la Llei 45/2003, la recerca amb embrions humans viables va ser permesa al nostre país. A partir d'aquell moment, l'Institut Universitari Dexeus va procedir a posar-se en contacte amb les parelles que tenien embrions congelats des de feia més de dos anys, per informar-los de les noves opcions legals i recollir les seves opinions. Hem rebut resposta del 35,96 % de les pacients contactades. El 31,8 % de les parelles opten per la conservació dels embrions per a ús propi, el 30,6 % opten per donar els embrions per a recerca en cèl·lules mare embrionàries, el 20,9 % donen els embrions a tercers amb finalitats reproductives, i el 10,2 % desitgen finalitzar la conservació dels embrions sense cap altra utilització. La possibilitat de donació per a investigació ha estat ben acceptada pels pacients, ja això ha permès donar una solució a aquells casos que ja no desitgen embaràs i no accepten la donació amb finalitat reproductiva. La donació per a investigació es considera una alternativa preferible a la destrucció.

**Paraules clau** Donació d'embrions, recerca, cèl·lules mare embrionàries.

### *Abstract*

Since the approval of the Law 45/2003, research with viable human embryos has been permitted in Spain. Since then, Institut Universitary Dexeus has contacted patients who had frozen embryos for more than two years, to inform them of the new legal possibilities, and to record their options. We got answers from 35.6 % of the contacted patients. 31.8 % of the couples choose to keep their embryos for their own reproductive use, 30.6 % choose to give the embryos for research on embryonic stem cells, 20.9 % gave their embryos to other couples for reproductive purposes, and 10.2 % decided to destroy their embryos. The option of giving the embryos for research has been well accepted by couples, giving a solution in those patients who do not have a reproductive wish, and do not accept embryo donation to other couples for reproductive purposes. Donating embryos for research is found a better option than destruction.

---

## **INTRODUCCIÓ**

La possibilitat de realitzar investigació amb embrions humans viables a Espanya és una nova opció amb la qual encara no es té molta experiència si ens comparem amb altres països propers, com ara Anglaterra, on la HFEA va permetre l'any 1991 (Schenker, 1998) utilitzar embrions per a fer recerca en el camp de les cèl·lules mare.

Al nostre país aquesta possibilitat va ser possible per primer cop a finals del l'any 2003 amb la promulgació de la Llei 45/2003, que permetia destinar els embrions ja congelats per a aquest fi. Amb la promulgació de la nova llei de TRA (Llei 14/2006),

que deroga les anteriors, qualsevol parella amb embrions congelats, independentment de quan es vagi produir la criopreservació, pot decidir el futur dels seus embrions entre quatre opcions: la utilització per la pròpia dona o el seu cònjuge, la donació amb finalitats reproductives, la donació amb finalitat d'investigació o la finalització de la seva conservació sense cap altre fi. Aquesta norma no restringeix la recerca en embrions humans congelats sinó que possibilita la donació per investigació a qualsevol embrió «sobrant», congelat o no, sempre que compleixi els requisits legals establerts.

L'interès de fer recerca amb aquests embrions sobrants inclou tant els estudis aplicats a millorar les

Tècniques de Reproducció Assistida (millorar els tractaments d'esterilitat i tècniques de reproducció humana assistida, desenvolupar nous mètodes de detecció d'alteracions genètiques i cromosòmiques en estadi preimplantacional...) com la seva utilitat en el camp de les cèl·lules mare (Boada, 2006), tant en la seva vessant bàsica (descobriments de nous fàrmacs, estudi del desenvolupament i el control gènic...) com la possible aplicació terapèutica futura. La derivació de línies cel·lulars establertes i caracteritzades permetrà el tractament de moltes persones afectes de malalties degudes a pèrdua de funció cel·lular, com alteracions neurodegeneratives, accidents vasculars, lesions de medulla òssia, fallada cardíaca i diabetis mellitus entre altres, que afecten milions de persones a tot el món.

## MATERIAL I MÈTODES

Actualment es mantenen congelats a l'Institut Universitari Dexeus 15.857 embrions que pertanyen a 3.762 parelles, dels quals hi ha 6.263 de més de 5 anys, 3.896 que porten congelats entre 2 i 5 anys, i 5698 congelats en els últims 2 anys. Des del moment en què va ser possible la recerca en embrions al nostre país, el nostre centre va procedir a posar-se en contacte amb les parelles que tenien embrions congelats des de feia més de dos anys, per informar-los de les noves opcions legals.

Fins desembre de 2006, s'ha contactat per correu certificat amb 2.069 parelles amb 8.920 embrions congelats per a conèixer la seva elecció davant les noves opcions. La resta de parelles a les quals no s'ha enviat carta són les de menys de 2 anys i aquelles que havien manifestat recentment el seu interès de continuar el seu projecte reproductiu. La resposta de les parelles ha estat majoritàriament per via telefònica i, en funció de la decisió que havien pres, s'ha procedit a l'enviament del consentiment de donació

per recerca en aquells casos en què així ho han manifestat. D'acord a la normativa vigent, en el consentiment ha de constar la línia de recerca a la qual es destinaran els embrions. En el nostre cas, tots els embrions donats s'han destinat al Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona per a ser destinats al projecte «Derivació de línies de cèl·lules mare embrionàries humanes en condicions lliures de xenobiòtics i la caracterització *in vivo* de la seva pluripotencialitat».

Als dos mesos de l'enviament de les darreres cartes s'ha realitzat l'avaluació global de les respostes rebudes

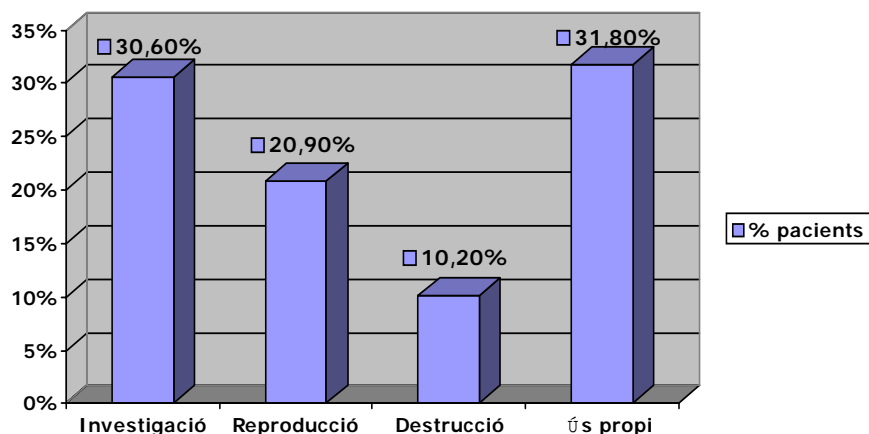
## RESULTATS

Fins al moment, han respost 744 pacients (35,96 % de les cartes enviades, 19,7 % del total de parelles), i han retornat 97 cartes per canvi de domicili (4,7 % de les cartes enviades). De les 744 pacients que han respost, 228 (30,6 %) han manifestat la voluntat de donació per a investigació. D'aquestes, solament 169 (22,7 % de les que han respost, 8,2 % de les parelles contactades) han materialitzat la donació seguint el consentiment corresponent.

A la figura 1 es presenta la freqüència de cada una de les respostes. El 31,8 % de les parelles opten per la conservació dels embrions per a ús propi, el 30,6 % opten per donar els embrions per a recerca, el 20,9 % donen els embrions a tercers amb finalitats reproductives, i el 10,2 % desitgen finalitzar la conservació dels embrions sense cap altra utilització.

Dels 747 embrions congelats donats amb finalitats d'investigació, 258 embrions ja han estat entregats al Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona per a ser destinats al projecte «Derivació de línies de cèl·lules mare embrionàries humanes per a utilització terapèutica».

Aquests embrions han estat descongelats al Centre



**Figura 1** Comparativa de la resposta dels pacients.

**Taula 1** Resposta de les pacients.

	Embrions congelats >10 anys	Embrions congelats entre 5 i 10 anys	Embrions congelats < 5 anys	Total
Donació amb finalitat d'investigació	40 (34,5 %)	105 (33,6 %)	83 (26,4 %)	228 (30,6 %)
Donació amb finalitat reproductiva	37 (31,9 %)	67 (21,5 %)	52 (16,4 %)	156 (20,9 %)
Finalització de la seva conservació	18 (15,6 %)	36 (11,5 %)	22 (6,9 %)	76 (10,2 %)
Mantenir-los congelats	9 (7,7 %)	77 (24,7 %)	151 (47,8 %)	237 (31,9 %)
Indecisos	12 (10,3 %)	27 (8,7 %)	8 (2,5 %)	47 (6,4 %)
Total	116	312	316	744

de Medicina Regenerativa de Barcelona, amb una taxa de supervivència del 61,8 %, i s'han aconseguit cinc línies de cèl·lules mare embrionàries ja caracteritzades i registrades.

## DISCUSSIÓ

Hem comparat les respostes de les nostres pacients a les noves opcions obertes per la llei amb diferents enquestes realitzades al nostre centre en anys anteriors i que recollien l'opinió dels pacients amb embrions congelats respecte a la possibilitat de donar els embrions per a investigació (una opció en aquells moments no permesa). Aquestes enquestes van ser realitzades per una banda a pacients amb embrions congelats des de feia més de cinc anys (Asensio *et al.*, 2001; Boada *et al.*, 2001), i per una altra banda, es va realitzar un segon estudi entre els anys 2002 i 2003 amb les parelles que en aquell moment s'estaven sotmetent a un tractament de fecundació *in vitro* al nostre centre (Rodrigo *et al.*, 2003; Boada *et al.*, 2001). Els nostres resultats actuals són similars als obtinguts a l'enquesta realitzada a les parelles amb embrions congelats de més de cinc anys, en la qual el 31,5 % dels pacients consideraven que la donació d'aquests embrions per a investigació era una opció amb la qual estaven d'acord. Respecte a l'estudi que analitzava l'opinió de parelles que en aquell moment s'estaven sotmetent a un tractament de fecundació *in vitro*, veiem que en aquesta situació el 75,5 % de les parelles estaria d'acord amb la donació dels seus embrions amb finalitat d'investigació.

Hem de tenir en compte que l'actitud de les parelles en els dos estudis referits es pot veure molt influenciada pel moment del procés en què es troben, i que la concepció que es té dels embrions a cada pas

d'un procés de FIV pot explicar les diferències obtingudes entre els dos estudis (Nachtigall *et al.*, 2005)

Podem comparar els nostres resultats amb els obtinguts en un estudi realitzat a Austràlia (McMahon *et al.*, 2003), en el qual un 10 % de les parelles consideren probable, i un 34 % possible, donar els seus embrions criopreservats sobrants amb finalitats d'investigació.

Aquestes dades varien respecte a estudis realitzats en altres països com el Canadà (Elford *et al.*, 2004), en el qual el percentatge de parelles que donaven els embrions per a investigació era del 5 %, les que els donaven per a altres parelles eren l'1 %, optaven per la destrucció el 8 %, i el 68 % restant mantenien els embrions congelats per al seu ús propi.

Si analitzem les respostes en funció del temps que estan congelats els embrions (taula 1), veiem que no trobem diferències pel que fa a la donació amb finalitats d'investigació en els grups en què els embrions fa més temps que estan congelats, però sí en la resta dels grups. El percentatge de parelles que opten per donar els seus embrions a tercers amb finalitats reproductives augmenta a mesura que s'incrementa el temps que porten els embrions criopreservats, i el mateix passa amb les parelles que opten per la finalització de la seva conservació sense cap altra utilització.

La donació per a investigació es considera una alternativa preferible a la destrucció, tal i com mostren altres estudis recents (Hammatberg *et al.*, 2006)

## CONCLUSIONS

La Llei 45/2003 va obrir la possibilitat de donar embrions congelats per a investigació i la seva modifi-

cació va permetre que es pogués aplicar a tots els casos i no solament quan els embrions havien estat congelats abans de la seva entrada en vigor. La possibilitat de donació per a investigació ha estat ben acceptada pels pacients, i ha permès donar una solució a aquells casos que ja no desitgen embaràs i no accepten la donació amb finalitat reproductiva.

La donació per a investigació es considera una alternativa preferible a la destrucció, que permetrà el desenvolupament de noves línies d'investigació que en un futur poden arribar a tenir aplicació en teràpia cel·lular. El coneixement de la població general dels camps de recerca i les possibilitats terapèutiques de les cèl·lules mare ha augmentat molt en els darrers anys, i ha implicat una major acceptació de l'opció de recerca.

## BIBLIOGRAFIA

- ASENSIO, M.; BOADA, M.; VEIGA, A.; BARRI, P. N. (2001) «Opini3n de las parejas sobre el futuro de sus embriones pasados 5 a3os de congelaci3n». *Progresos Obstetricia Ginecolog3a*, 44: 199-204.
- BOADA, M. (2006). «La nueva ley de Reproducci3n Asistida». *ASEBIR*, 11(2).
- BOADA, M.; ASENSIO, M.; VEIGA, A.; BARRI, P. N. (2001). «Cryopreserved human embryos exceeding the legal storage limit in Spain». *17th Annual Meeting ESHRE*. Lausanne, Su3ssa.
- BOADA, M.; RODRIGO, C.; VEIGA, A.; BARRI, P. N. «The future of frozen embryos: couples point of view». *Human Reproduction Abstracts Book for the 19th ESHRE Annual Meeting*. Vol. 18, Suppl. 1: XVIII-68
- ELFORD, K.; LAWRENCE, C.; LEADER, A. (2004). «Research implications of embryo cryopreservation choices made by patients undergoing in vitro fertilization». *Fertility and Sterility*, 81(4).
- HAMMARBERG, K.; TINNEY, L. (2006). «Deciding the fate of supernumerary frozen embryos: a survey of couples' decisions and the factors influencing their choice». *Fertility and Sterility*, 86(1).
- Ley 45/2003, de 21 de noviembre, por la que se modifica la Ley 35/1988, de 22 de Noviembre, sobre T3cnicas de Reproducci3n Asistida. BOE, 280.
- Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre t3cnicas de reproducci3n humana asistida. BOE, 126.
- MCMAHON, C.; GIBSON, F.; LESLIE, G.; SAUNDERS, D.; PORTER, K.; TENNANT, C. (2003). «Embryo donation for medical research: attitudes and concerns of potential donors». *Human Reproduction*, 18(4): 871-877.
- NACHTIGALL, R.; BECKER, G.; FRIESE, C.; BUTLER, A.; MACDOUGALL, K. (2005). «Parents' conceptualization of their frozen embryos complicates the disposition decision». *Fertility and Sterility*, 84(2).
- RODRIGO, C.; BOADA, M.; VEIGA, A.; BARRI, P. N. (2003). «Futur dels embrions congelats: Opini3n de les parelles». *VIII Jornades de la Secci3n de Biologia de la Reproducci3n*. Societat Catalana de Biologia, Biologia de la Reproducci3n 8: 97-100.
- SCHENKER, J. (1998). «International regulation of human embryo research. FIGO statements and world experience». *Hum. Reproduction*, 13: 2047-2049.

## RELACIÓ D'INSCRITS

Alcañiz Puig, Núria  
Aldea, Marta  
Anton Martorell, Ester  
Aran Corbella, Begoña  
Ayerdi Irizar, Fernando  
Bach Sanchez, Vanessa  
Baeta Alacia, Marc  
Belzunces Rama, Nuria  
Blanco Rodríguez, Joan  
Boix Illa, Elisenda  
Borràs Suárez, Miquel  
Bozzo Duran, M. Gràcia  
Brieño, Miguel Àngel  
Camprubí Sánchez, Cristina  
Casanovas Fontanillas, Aïda  
Casas Roqueta, Isabel  
Cerrato Quintana, Sonia  
Chiva Royo, Manuel  
Cisneros Sala, Adela  
Collado Fernández, Esther  
Coloma Ibarz, Alce  
Colomar Torres, Ana  
Company Regàs, Dolors  
Costa Borges, Nuno Luis  
Costa Ledesma, Marta  
Cuatrecasas, Esther  
Cuberes Juanes, Judit  
Déu Cots, Laura  
de Lapuente Pérez, Joaquín  
de las Heras Martínez, Maria  
de Mateo López, Sara  
Durfort i Coll, Mercè  
Fàbrega Coll, Anna  
Fares Taie, Lucas  
Fernández Fernández, Silvia  
Fernández, Maria  
Fonfría Subirós, Elsa  
Fosas Sáenz, Núria  
Galimany Sanromà, Eva  
García Cruz, Raquel  
García Caldés, Montserrat  
García Quevedo, Lydia  
Gazquez Baylo, Cristina  
Gimbernat Maymi, Núria  
González Garrido, Sheyla  
González Linares, Javier  
Grossman Camps, Mark  
Hugas, Mariona  
Ibañez de Sans, Elena

Kurtz, Kathryn  
Luna Garcia, Marta  
Marquès Soler, Laura  
Martín Talavera, Pilar  
Martínez Heredia, Juan  
Martinez- Soler, Fina  
Massó Hernàez, Joan  
Mechaly, Alejandro  
Melo Herraiz, Esther  
Molina Campoy, Oscar  
Moragas, Marta  
Mugica, Amaia  
Noblom Artigues, Raul  
Oliva Virgili, Rafael  
Pérez Bisay, Sandra  
Parriego, Mònica  
Piferrer Circuns, Francesc  
Pladevall Sierra, Marta  
Planella Guarro, Teresa  
Pons Gatell, Maria Carme  
Pruneda Sais, Anna  
Pujol calvet, Roser  
Raya, Angel  
Ribes Mora, Enric  
Rodríguez Manzano, Jesús  
Rodríguez Pizà, Ignasi  
Romaguera, Roser  
Rotllant Estelrich, Guiomar  
Sanahuja, Georgina  
Santaló Pedro, Josep  
Saperas Plana, Núria  
Sarquella, Joan  
Sarrate Navas, Zaida  
Saumell i Puig, Imma  
Sebastia Sarroca, Ingrid  
Simeó, Carles G.  
Solé Inarejos, Miquel  
Solans Pomares, Montserrat  
Solvás Martínez, Ivan  
Templado Meseguer, Cristina  
Terradas Ill, Mariona  
Uroz Brosa, Laia  
Valiente, Marta  
Vanrell Barbat, Ivette  
Velilla Garcia, Esther  
Viñas de Puig, Jordi  
Vidal-Taboada, José Manuel  
Vidal Domínguez, Francesca  
Yeste i Oliveras, Marc







## Amb la col·laboració de:



Xarxa Temàtica de  
Biologia de la  
Reproducció



## Amb el patrocini de:

