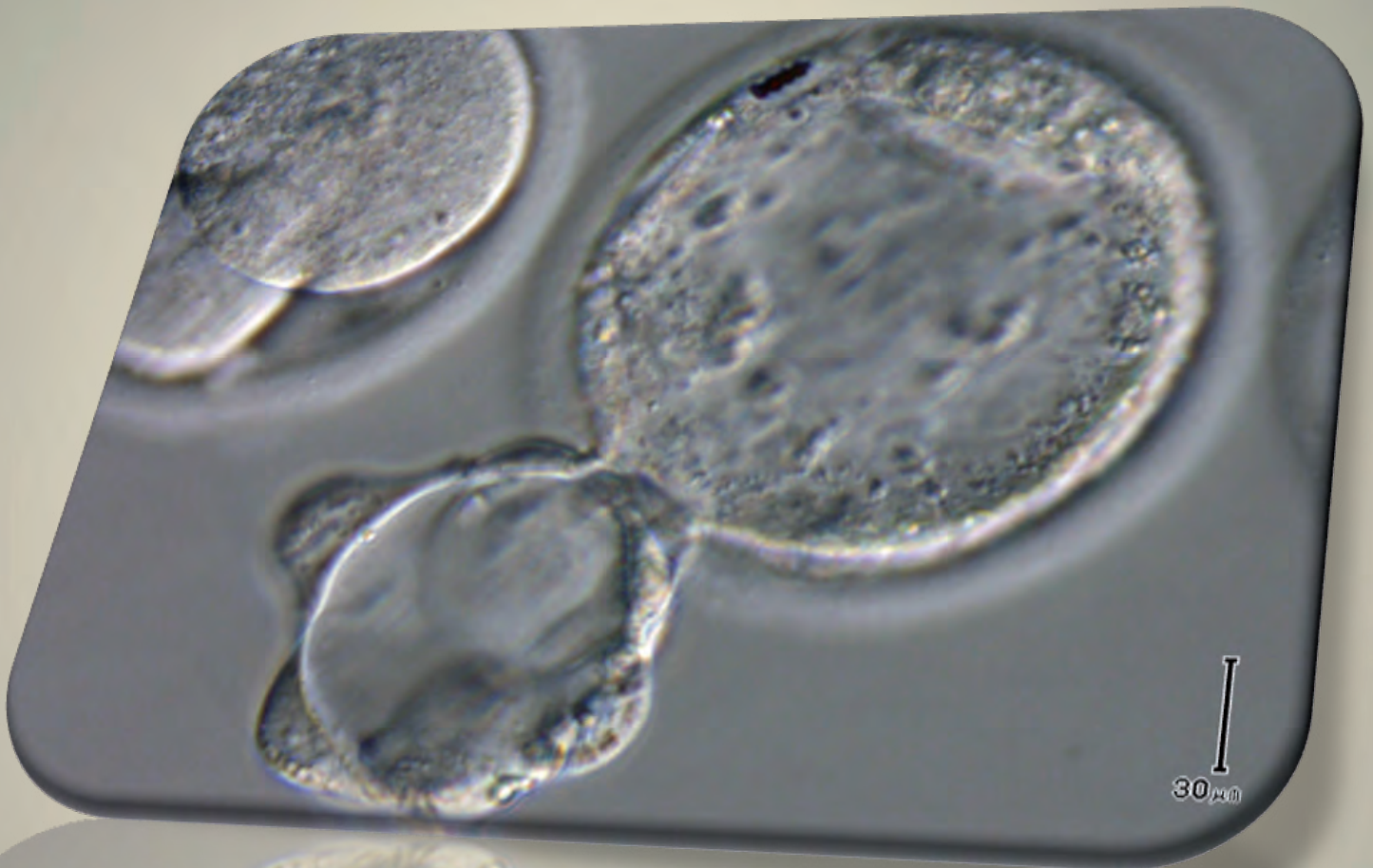


BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ

VOLUM 11

2009



XI Jornades de Biologia de la Reproducció



Societat Catalana de Biologia
Girona, 30 d'abril de 2009

BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ

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

BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ

XI JORNADES DE LA SECCIÓ DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ

Editors

Joan Sarquella i Francesca Vidal

Amb la col·laboració de:

Caixa Girona
GIROFIV, Clínica Girona
Institut d'Estudis Catalans
Unitat de Biologia Cel·lular, Universitat Autònoma de Barcelona

BARCELONA
2009

Il·lustració de la coberta: Imatge d'un blastocist de ratolí eclusionant, amb un microdispositiu de polisilici a l'espai perivitel·lí. Fotografia cedida per Sergi Novo Bruña.

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

Primera edició: abril de 2009
Tiratge: 120 exemplars

Text revisat lingüísticament i compost per Ricard Roca

Imprès a Signes disseny i comunicació, SL
Ramon y Cajal, 39. 08012 Barcelona

Dipòsit legal: B. 20037-2009
ISBN: 978-84-92583-47-8

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

TAULA

Presentació.....	7
Maduració i canvis en la morfologia espermàtica de porcí mitjançant la coïncubació amb fragments d'epidídim.....	9
E. GARCIA-BONAVILA, M. YESTE, S. BONET, S. SANCHO, E. PINART, E. BUSSALLEU, I. CASAS, A. FÀBREGA I M. D. BRIZ	
Efectes de la filtració amb granadura sobre la qualitat espermàtica de dosis seminals de porcí de baixa qualitat espermàtica.....	13
E. BUSSALLEU, E. PINART, M. BRIZ, S. SANCHO, M. YESTE, I. CASAS, A. FÀBREGA, E. GARCIA, M. PUIGMULÉ I S. BONET	
Congelabilitat de les ejaculacions de porcí: estudi comparatiu de la qualitat espermàtica i la taxa de fertilitat <i>in vivo</i>	17
I. CASAS, S. SANCHO, M. D. BRIZ, E. PINART, E. BUSSALLEU, M. YESTE, A. FÀBREGA, E. GARCIA, M. PUIGMULÉ, J. REIXACH, M. DIAZ, X. BARRERA I S. BONET	
Sobreexpressió del gens <i>HSP90AA1</i> i <i>HSPA8</i> en cèl·lules epitelials de l'oviducte (OEC) produïda per espermatozoides en l'espècie porcina.....	23
M. YESTE, W. V. HOLT, M. D. BRIZ, S. BONET I R. E. LLOYD	
Avaluació dels efectes crònics de la MDMA (èxtasi) en la fertilitat i la reproducció en rata mascle.....	27
M. BARENYS, N. MACIÀ, L. CAMPS, J. DE LAPUENTE, J. GÓMEZ-CATALÁN, J. GONZÁLEZ-LINARES, M. BORRÀS, M. RODAMILANS I J. M. LLOBET	
Gens i isoformes del receptor de kisspeptina (KISS1R) en vertebrats.....	33
A. S. MECHALY, J. VIÑAS I F. PIFERRER	
Aïllament del nucli d'espermatozoides humans i anàlisi del seu proteoma.....	37
S. DE MATEO, J. M. ESTANYOL, J. L. BALLESCÀ I R. OLIVA	
Estudi mutacional del gen <i>hspa2</i> en pacients infèrtils i en controls.....	41
R. AZPIAZU, M. JODAR, J. CÁMARA, J. ORIOLA, J. L. BALLESCÀ I R. OLIVA	
Estudi mutacional dels gens de la protamina 1 i 2 en pacients infèrtils i controls.....	45
M. JODAR, G. MESTRE, J. ORIOLA, M. GENÉ, J. L. BALLESCÀ I R. OLIVA	
Correlació entre la relació de protamines i la presència de polimorfismes a la regió promotora del gen de la protamina 1.....	49
J. CASTILLO, S. DE MATEO, M. JODAR, J. ORIOLA, J. L. BALLESCÀ I R. OLIVA	
Selecció de ovocitos bovins mediante tinció con Brilliant Cresyl Blue (BCB) para desarrollo hasta blastocisto tras activación partenogénica.....	55
C. MILOVANOV, A. VEIGA, B. ARAN, R. VASSENA I J. C. IZPISÚA	
Codificació d'embrions de ratolí amb microdispositius de polisilici.....	59
S. NOVO, R. GÓMEZ, L. BARRIOS, M. DUCH, J. ESTEVE, J. A. PLAZA, J. SANTALÓ, C. NOGUÉS I E. IBÁÑEZ	

Un nou sistema de cultiu en dues fases és capaç d'incrementar la població putativa de cèl·lules mare de les espermatogònies, seleccionar-les i mantenir-les en un estat indiferenciat.....	65
A. VILA, R. VASSENA, A. VEIGA I J. C. IZPISUA	
Generación de células pluripotentes específicas de paciente.....	69
I. RODRÍGUEZ-PIZÀ, Á. RAYA, A. GIORGETTI, R. VASSENA, A. VEIGA Y J. C. IZPISUA	
Resultats citogenètics en donants d'oòcits.....	71
R. BATALLÉ, M. SOLÀ, R. ROMERO I M. R. MARTORELL	
La fertilitat provada de les donants d'oòcits és un factor predictiu d'embaràs en les receptores?.....	75
L. ECHEVERRIA, E. CLUA, M. BOADA, L. MATEO, A. VEIGA I B. COROLEU	
Fragmentació del DNA espermàtic en portadors de reorganitzacions cromosòmiques.....	79
A. GARCÍA-PEIRÓ, M. OLIVER-BONET, J. NAVARRO, C. ABAD, M. GUITART, M. J. AMENGUAL I J. BENET	
Incidència de delecions i duplicacions de la regió 15q11q13 en espermatozoides de pares amb descendència afectada per la síndrome de Prader-Willi.....	83
Ò. MOLINA, J. BLANCO I F. VIDAL	
Estudi d'oòcits en metafase II amb microscòpia de llum polaritzada.....	89
O. OLIANA, G. ARROYO, M. BOADA, M. J. GÓMEZ, B. COROLEU I A. VEIGA	
Anomalies cromosòmiques en embrions procedents de cicles de maduració <i>in vitro</i>	93
D. TUÑÓN, M. PARRIEGO, G. ARROYO, M. BOADA, R. TUR, P. N. BARRI I A. VEIGA	
Paràmetres de bon pronòstic en cicles de diagnòstic genètic preimplantacional.....	97
S. MATEO, M. PARRIEGO, M. BOADA, V. COROLEU, P. N. BARRI I A. VEIGA	
Cribratge genètic preimplantacional per a factor masculí d'origen genètic.....	101
A. BUJARRABAL, N. RIVES, M. PARRIEGO, J. M. VENDRELL, M. BOADA, F. VIDAL I A. VEIGA	
Transferència d'embrions en dia 2 <i>versus</i> dia 3 en cicles de FIV.....	105
X. ORRIOLS, G. ARROYO, M. BOADA, M. J. GÓMEZ, P. N. BARRI I A. VEIGA	
Flux de pacients d'altres països per a TRA: motivacions i característiques.....	111
O. OLIANA, L. ECHEVERRIA, M. BOADA, B. COROLEU, A. VEIGA I P. N. BARRI	
Destí dels embrions donats: la nostra experiència.....	117
M. HUGAS, M. FERNANDEZ, L. JULIÀ, B. ARAN, A. VEIGA I J. SARQUELLA	

PRESENTACIÓ

Un cop més, com cada dos anys, tenim l'oportunitat de reunir-nos tots els que estem interessats en el camp apassionant de la biologia de la reproducció. Atractiu sens dubte, per compartir experiències, conèixer les diferents línies de treball i una oportunitat per als més joves per divulgar el fruit del seus esforços.

Comunicació i intercanvi és el vehicle necessari per avançar en la formació, recerca i coneixement.

Girona agafa el relleu d'aquestes XI Jornades de Biologia de la Reproducció esperant assolir aquests objectius.

Benvinguts a Girona, ciutat que sempre us acull encantada, esperant i desitjant que obtingueu molt de profit de la vostra visita.

ELS ORGANITZADORS

MADURACIÓ I CANVIS EN LA MORFOLOGIA ESPERMÀTICA DE PORCÍ MITJANÇANT LA COINCUBACIÓ AMB FRAGMENTES D'EPIDÍDIM

Estela Garcia-Bonavila, Marc Yeste, Sergi Bonet, Sílvia Sancho, Elisabeth Pinart, Eva Bussalleu, Isabel Casas, Anna Fàbrega i M. Dolors Briz

Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana, Departament de Biologia, INTEA, Facultat de Ciències, Universitat de Girona.

Campus Montilivi, s/n. 17071 Girona. estela.garcia@udg.edu.

Resum

Estudis previs han demostrat que els espermatozoides poden madurar després d'un cocultiu amb cèl·lules epitelials epididimàries i amb cocultiu amb fragments d'epidídim. L'objectiu d'aquest estudi va ser determinar els efectes de la coïncubació amb espermatozoides ejaculats amb un alt percentatge d'imaduresa amb fragments d'epidídim de les diferents regions. Es va observar que el percentatge d'espermatozoides madurs augmentava significativament en caput i corpus després de 24 h d'incubació respecte als controls. Així es pot concloure que la coïncubació d'espermatozoides ejaculats amb fragments d'epidídim de les regions de caput i corpus indueix la migració de la gota citoplasmàtica.

Paraules clau: espermatozoides, epidídim, coïncubació, morfologia espermàtica, porcí.

Abstract

Previous reports have demonstrated that epididymal spermatozoa can be *in vitro* matured after both co-culturing with epididymal cell monolayers and co-incubating with epididymal explants. The aim of the present study was to determine the effects of co-incubating of ejaculated spermatozoa from low sperm quality ejaculates with epididymal explants on sperm quality for a 24 h period. Since it was observed that the percentage of mature spermatozoa significantly increases in caput and corpus after 24 h of co-incubation, we can conclude that epididymal explants from caput and corpus are able to promote the migration of cytoplasmic droplet in the boar ejaculated spermatozoa.

Key words: spermatozoa, epididymis, co-incubation, sperm morphology, porcine.

INTRODUCCIÓ

La morfologia dels espermatozoides és un paràmetre molt important en la valoració de la qualitat espermàtica d'una ejaculació tant en humans (Kruger *et al.*, 1986), com en altres espècies de mamífers com el porc (Alm *et al.*, 2006). Per això, en els espermogrames convencionals, s'examinen els percentatges d'espermatozoides madurs, immadurs i aberrants mitjançant l'anàlisi microscòpica del semen. En l'espècie porcina, quan el percentatge d'espermatozoides immadurs és superior al 25 %, es creu que hi pot haver una disfunció epididimària deguda a múltiples factors (Pruneda *et al.*, 2005).

La presència d'una gota citoplasmàtica a la peça intermèdia és un tret característic dels espermatozoides immadurs. Estudis previs han demostrat que el cocultiu homòleg *in vitro* d'espermatozoides epididi-

maris amb cèl·lules epitelials de l'epidídim indueix la migració de la gota citoplasmàtica després de 24 h (Bassols *et al.*, 2005). D'altra banda, en alguns estudis s'han trobat indicis que la coïncubació d'espermatozoides epididimaris amb fragments d'epidídim també promou la migració de la gota citoplasmàtica (Bassols *et al.*, 2006).

Així doncs, l'objectiu d'aquest estudi era determinar els efectes de la coïncubació d'espermatozoides ejaculats amb fragments de les diferents regions de l'epidídim (caput, corpus i cauda) durant un període de 24 h sobre la morfologia espermàtica.

MATERIAL I MÈTODES

Obtenció i preparació dels fragments d'epidídim

Els epidídims es van obtenir de mascles reproductors porcins postpuberals de la raça Piétrain i un cop al laboratori es van separar en tres regions diferents: caput, corpus i cauda. De cada regió se'n van fer 200 fragments de 5 mm de longitud i es van centrifugar dues vegades a 500 g durant 2 min. Posteriorment, es van col·locar en flascons amb medi de cultiu ECM (medi 199 suplementat amb 10 % FCS, 0,5 % fungicida, 1 % estreptomicina/penicil·lina i 0,1 % transferina) i es van incubar a 37,5 °C i atmosfera de CO₂ al 5 % durant 24 h.

Obtenció i preparació de les mostres seminals

Les mostres seminals es van obtenir de mascles Piétrain i es van enviar diluïdes (1:5, v/v) amb un diluent de llarga durada. Es van centrifugar durant 3 min a 640 g i el precipitat obtingut es va resuspendre amb medi TYR+EGTA (NaCl 116 mM, KCl 3,1 mM, MgSO₄ 0,4 mM, NaH₂PO₄ 0,3 mM, HEPES 20 mM, kanamicina 100 µg/ml, glucosa 5 mM, lactat sòdic 21,7 mM, piruvat sòdic 1 mM, BSA 3 mg/ml, EGTA 1 mM).

Disseny experimental

Passades les 24 hores d'incubació, es va substituir el medi ECM dels flascons per 60 ml de la mostra d'espermatozoides, prèviament diluïts en medi TYR+EGTA fins a una concentració de 1·10⁸ cèllu-

les/ml. Com a control negatiu es va utilitzar el medi de coïncubació sense fragments, i com a control positiu un cocultiu obtingut a partir d'espermatozoides i un cultiu confluent de cèl·lules epitelials de ronyó (LLC-PK1). Es van incubar tots els flascons a 37,5 °C i atmosfera de CO₂ al 5 % durant 2, 4, 6 i 24 h. En tots aquests temps es van extreure al·lotes per fer l'anàlisi de la morfologia i la viabilitat espermàtiques.

Anàlisi de la morfologia espermàtica

La morfologia espermàtica es va avaluar mitjançant un sistema d'anàlisi computada del semen; concretament, es va utilitzar el programa Sperm Class Analyser SCA®2002 Production Module, Microptic, Barcelona. Les mostres es van observar a 200 augments i es van fer tres recomptes de 100 espermatozoides cadascun. Els espermatozoides es van classificar com a madurs, immadurs i aberrants.

Anàlisi de la viabilitat espermàtica

La viabilitat espermàtica es va valorar mitjançant un marcatge múltiple amb fluorocroms (Bussalleu *et al.*, 2005). Per a cada mostra, es van fer tres recomptes de 200 espermatozoides cadascun al microscopi d'epifluorescència (Zeiss AxioImager Z1) a 400 augments. Els espermatozoides considerats com a viables eren els que presentaven el nucli, l'acrosoma, la beina mitocondrial i la membrana plasmàtica intactes.

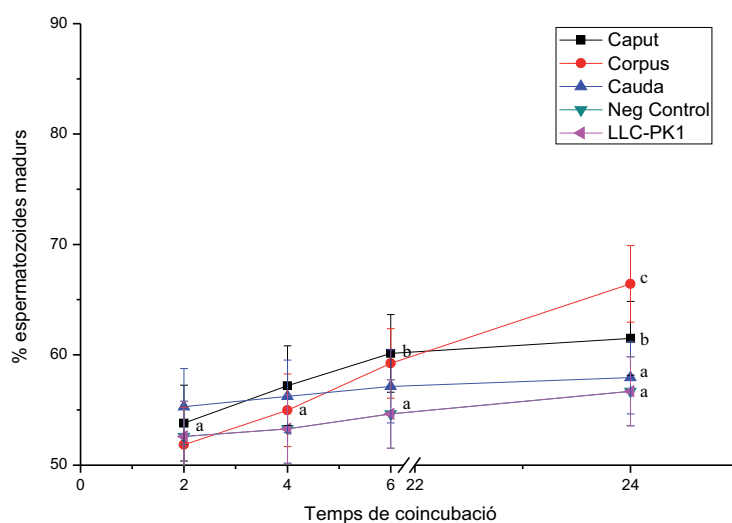


Figura 1. Percentatge d'espermatozoides madurs durant el període de coïncubació. Els superíndexs (a, b i c) indiquen diferències significatives ($P < 0,05$) entre tractaments

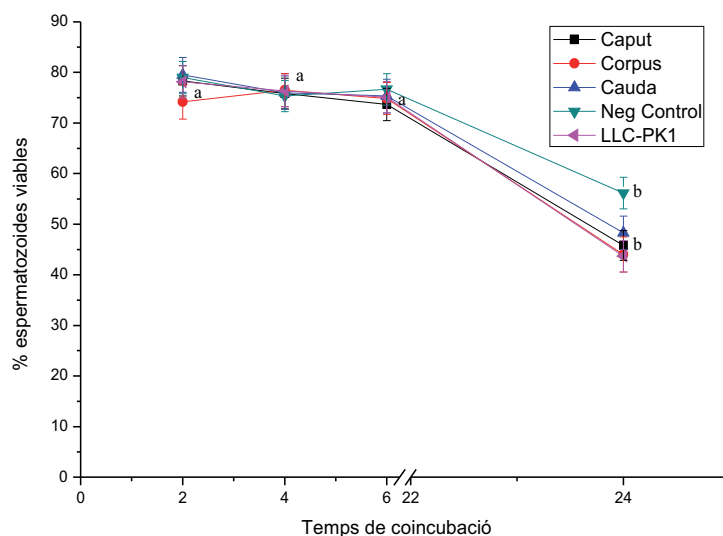


Figura 2. Percentatge d'espermatozoides viables amb la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes durant el període de coincubació. Els superíndexs (a i b) indiquen diferències significatives ($P < 0,05$) entre tractaments

Anàlisi estadística dels resultats

Cadascun dels experiments de coincubació (rèplica) es va considerar com a cas estadístic ($n = 10$). Els resultats obtinguts com a percentatges (x) van ser prèviament estandarditzats mitjançant la transformació $\arcsin \sqrt{x}$. Per a l'anàlisi estadística dels resultats es va utilitzar el test ANOVA de mesures repetides d'un factor i el test post-hoc de Scheffé inclòs en el programa estadístic SigmaStat versió 3.5 per a Windows (Systat Software, Inc., San José, Richmond, Califòrnia, EUA). El nivell de significació (α) es va establir amb $P < 0,05$.

Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de la mitjana (SEM).

RESULTATS

La figura 1 mostra el percentatge d'espermatozoides madurs (mitjana \pm SEM) durant tot el temps de coincubació. Després de 24 h d'inici de l'experiment, es va observar un augment significatiu ($P < 0,05$) del percentatge d'espermatozoides madurs al corpus i al cauda ($61,48 \pm 3,35$ i $66,42 \pm 3,46$, respectivament) respecte al control ($53,28 \pm 2,74$). Al mateix temps es va reduir el percentatge d'espermatozoides immadurs amb gota distal en els mateixos tractaments.

La viabilitat espermàtica (vegeu la figura 2) va disminuir de manera significativa en tots els tractaments després de 24 h de coincubació, sense que

s'observessin diferències significatives entre els tractaments dins del mateix període de temps.

DISCUSSIÓ

El trànsit dels espermatozoides a través de l'epididim és un procés fisiològic molt important a fi que les cèl·lules espermàtiques adquireixin la capacitat fecundant (Cooper, 1999). En estudis previs s'ha vist que el cocultiu *in vitro* d'espermatozoides epididimaris amb cèl·lules epitelials cultivades de l'epiteli epididimari pot promoure la migració de la gota citoplasmàtica (Bassols *et al.*, 2005). El principal inconvenient d'aquest tipus de sistema de cocultiu és la desdiferenciació de les cèl·lules epitelials un cop el cultiu primari ha assolit un nombre de divisions determinat. Aquest inconvenient, que també s'observa en altres tipus cel·lulars però no en cèl·lules oviductals (Yeste *et al.*, 2008), explica la necessitat d'establir altres sistemes com la coincubació dels espermatozoides amb fragments del tub epididimari. Malgrat que aquest sistema tingui desavantatges, com ara la viabilitat reduïda de les cèl·lules epitelials que constitueixen el fragment, seria un mètode més idoni per a un estudi com el que es descriu en aquest text. Conseqüentment, i amb l'objectiu d'induir la maduració espermàtica dels espermatozoides ejaculats, es va dur a terme la coincubació d'espermatozoides amb fragments d'epididim de diferents regions. S'observà que les regions del caput i el corpus promouien la

migració de la gota, mentre que aquest efecte no es va veure ni en el cauda ni en els controls positiu i negatiu.

Respecte a la viabilitat espermàtica, es va produir una reducció del percentatge d'espermatozoides viables després de 24 h de coïncubació. Així doncs, es pot concloure que la coïncubació d'espermatozoides ejaculats amb fragments d'epidídim de les regions del caput i del corpus indueix la migració de la gota citoplasmàtica, però cal millorar el sistema per tal d'augmentar la viabilitat després del temps de coïncubació.

BIBLIOGRAFIA

- ALM, K.; PELTONIEMI, O. A. T.; KOSKINEN, E.; ANDERSSON, M. (2006). «Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology». *Reprod. Dom. Anim.*, 41: 210-213.
- BASSOLS, J.; KÁDÁR, E.; BRIZ, M.; PINART, E.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; PRUNEDA, A.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; CASAS, I.; DACHEUX, J. L.; BONET, S. (2005). «Evaluation of boar sperm maturation after co-incubation with caput, corpus and cauda epididymal cultures». *Theriogenology*, 64: 1995-2009.
- (2006). «Migration of the cytoplasmic droplet in epididymal cultures of *Sus Scrofa*». *Reprod. Dom. Anim.*, 41: 322.
- BUSSALLEU, E.; PINART, E.; YESTE, M.; BRIZ, M.; SANCHO, 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.
- COOPER, T. G. (1999). «Epididymis». A: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. [ed.]. *Encyclopedia of reproduction*. Vol. 2. San Diego: Academic Press, 1-17.
- KRUGER, T. F.; MENKVELD, R.; STANDER, F. S.; LOMBARD, C. J.; MERWE, J. P. VAN DER; ZYL, J. A. VAN; SMITH, K. (1986). «Sperm morphologic features as a prognostic factor in vitro fertilization». *Fertility and Sterility*, 46: 1118-1123.
- PRUNEDA, A.; PINART, E.; BRIZ, M. D.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; KÁDAR, E.; BASSOLS, J.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. (2005). «Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars». *Theriogenology*, 63: 2219-2232.
- YESTE, M.; LLOYD, R. E.; BRIZ, M.; BADIA, E.; BONET, S.; HOLT, W. V. (2008). «Direct contact between boar spermatozoa and porcine oviductal epithelial cell (OEC) cultures is needed for optimal sperm survival in vitro». *Anim. Reprod. Sci.*, DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.08.018.

EFFECTES DE LA FILTRACIÓ AMB GRANADURA SOBRE LA QUALITAT ESPERMÀTICA DE DOSIS SEMINALS DE PORCÍ DE BAIXA QUALITAT ESPERMÀTICA

Eva Bussalleu, Elisabeth Pinart, Mailo Briz, Sílvia Sancho, Marc Yeste, Isabel Casas, Anna Fàbrega, Estela Garcia, Marta Puigmulé i Sergi Bonet

Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana, Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Universitat de Girona.

17071 Girona. eva.bussalleu@udg.edu.

Resum

L'objectiu d'aquest treball és desenvolupar un mètode per millorar la qualitat espermàtica d'ejaculacions de mascles reproductors Piétrain afectats per astenospèrmia, astenoteratospèrmia i teratospèrmia. Les dosis seminals es van filtrar en columnes de granadura (10 + 0,5 cm) amb un flux de sortida d'1 ml / 40 s. Per cada mascle es van filtrar 10 ml de la fracció rica de l'ejaculació, diluïda 1:6. La qualitat espermàtica es va analitzar abans i després de la filtració. La morfologia, la concentració i la motilitat espermàtica es van avaluar utilitzant el programa informàtic SCA®2002 Producció, mentre que la viabilitat espermàtica es va valorar amb una múltiple tinció fluorocromàtica. Els resultats indiquen que la filtració en columnes de granadura és un mètode efectiu per a la millora de la qualitat espermàtica de mascles reproductors Piétrain que presenten baixa qualitat espermàtica.

Paraules clau: dosi seminal, ejaculacions amb baixa qualitat espermàtica, filtració en columna, granadura, qualitat espermàtica.

Abstract

The aim of this work is to develop a method to enhance the sperm quality of low sperm quality ejaculates from Piétrain boars affected by asthenospermia, asthenoteratospermia and teratospermia. Seminal doses were filtered through columns of glass beads (length 10 + 0.5 cm) with an exit flow rate of 1 ml / 40 s. For each male 10 ml of the sperm cell-rich fraction, diluted at 1:6, were filtered. Sperm quality was assessed before and after filtration. Sperm morphology, sperm motility and sperm concentration were determined using the computer program SCA®2002 Production and, sperm viability was evaluated by fluorescence multistaining. Results show that filtration through glass beads columns is an effective method for enhancing the sperm quality of Piétrain boars with low sperm quality.

Key words: seminal dose, low sperm quality ejaculates, column filtering, glass beads, sperm quality.

INTRODUCCIÓ

L'èxit dels processos d'inseminació artificial (IA) està determinat bàsicament per la qualitat dels gàmetes. En els mascles d'alt interès genètic, però que presenten ejaculacions de baixa qualitat, cal aplicar mètodes de selecció d'espermatozoides funcionals de l'ejaculació (Morrell, 2006). Entre tots els mètodes disponibles cal escollir aquell que permeti l'obtenció de dosis seminals de major qualitat i concentració espermàtica, ja que entre el procés de recollida del semen i la IA hi ha una gran pèrdua d'espermatozoides viables (Anzar i Graham, 1995).

En mamífers, s'han desenvolupat diversos mètodes per millorar la qualitat espermàtica abans de la

IA. Entre d'altres, es poden destacar tècniques com el *swim-up* (Morrell, 2006), els gradients de Percoll (Somfai *et al.*, 2003) i la filtració amb substàncies adhesives com llana de vidre (Mogas *et al.*, 1998), Sephadex neutre (Bussalleu *et al.*, 2008) o granadura (Foote, 2001; Klinc *et al.*, 2005). L'eficiència d'aquests mètodes varia segons les espècies. Així doncs, en humans, la filtració de semen a través de granadura comporta un augment de la motilitat progressiva, de la viabilitat i de la capacitat fecundant dels espermatozoides (Daya i Gwatkin, 1987). En equins també s'ha demostrat que la filtració en granadura és efectiva per a la millora de la qualitat espermàtica (Klinc *et al.*, 2005).

L'objectiu d'aquest estudi és determinar l'efecte

de la filtració en granadura sobre la qualitat espermàtica de dosis seminals de mascles porcins afectats per astenospèrmia, ateneratospèrmia i teratospèrmia.

MATERIAL I MÈTODES

En aquest treball es van utilitzar 46 mascles porcins postpuberals i amb baixa qualitat espermàtica de la raça Piétrain, procedents de les empreses Semen Cardona (Cardona, el Bages) i Selecció Batallé (Riudarenes, la Selva).

Atenent als criteris establerts per Bonet *et al.* (1995), els mascles es van classificar com a: mascles astenospèrmics ($n = 7$), amb baixa motilitat espermàtica; mascles asteneratospèrmics ($n = 6$), amb baixa motilitat i una baixa freqüència d'espermatozoides madurs; mascles teratospèrmics amb $> 10\%$ d'anomalies cefàliques ($n = 22$); mascles teratospèrmics amb $> 10\%$ d'anomalies a la cua ($n = 3$) i mascles teratospèrmics amb $> 8\%$ d'anomalies cefàliques i $> 10\%$ anomalies de la cua ($n = 8$).

Les mostres de semen es van obtenir pel mètode de la munta sobre maniquí i masturbació manual. La fracció espermàtica recollida es va diluir a la proporció 1:6 amb diluent BTS (Tecnovit, Espanya) i es van transportar refrigerades des de les instal·lacions de Selecció Batallé i Semen Cardona al Laboratori de Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana de la Universitat de Girona. Al laboratori les dosis seminals es van filtrar en columnes de granadura (Sigma) amb les següents condicions de treball: $10 + 0,5$ cm d'alçada del llit, $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura al laboratori i un flux de sortida de $1\text{ ml} / 40\text{ s}$. Les dosis seminals filtrades es van eluir amb 40 ml del mateix diluent BTS. L'anàlisi de la qualitat espermàtica de les dosis seminals es va realitzar abans i després de la filtració. Per a la valoració de la concentració espermàtica, la motilitat (% total d'espermatozoides mòbils) i la morfologia espermàtica es va emprar el programa informàtic SCA®2002 Producció (Microptic, Barcelona, versió 2003). L'estudi de la viabilitat espermàtica es va basar en la valoració conjunta de l'estat del nucli, de la membrana plasmàtica, de l'acrosoma i la integritat de la beina mitocondrial mitjançant el mètode de la múltiple tinció fluorocròmica (Bussalleu *et al.*, 2005). Per a l'anàlisi estadística es va emprar el test ANOVA (SPSS per a Windows, versió 14.0) amb un nivell de significació de $P < 0,05$ i amb transformació arcsinus prèvia ($\sqrt{x/100}$) per a les variables.

RESULTATS

En els mascles astenospèrmics, la filtració a través de columnes de granadura provocà un augment de la freqüència d'espermatozoides madurs i una disminució de la freqüència d'espermatozoides aglutinats ($P < 0,05$), però no va afectar ni la motilitat, la viabilitat ni la concentració espermàtica ($P > 0,05$). Després de la filtració de dosis seminals de mascles teratospèrmics amb anomalies cefàliques en columnes de granadura, es va observar un augment de la freqüència d'espermatozoides madurs i una disminució de la freqüència d'espermatozoides aglutinats i d'espermatozoides amb anomalies cefàliques ($P < 0,05$). Per contra, el procés de filtració va causar un descens significatiu de la concentració espermàtica ($P < 0,05$) però no va afectar ni la freqüència d'espermatozoides mòbils ni la de viables ($P > 0,05$). En els mascles teratospèrmics amb $> 8\%$ d'anomalies cefàliques i $> 10\%$ d'anomalies de la cua, després de la filtració s'incrementà la freqüència d'espermatozoides madurs i va disminuir la freqüència d'espermatozoides amb gota distal ($P < 0,05$), mentre que la resta de paràmetres analitzats no variaren entre abans i després de la filtració ($P > 0,05$).

En els mascles asteneratospèrmics i els mascles teratospèrmics amb anomalies a la cua, la filtració en columnes de granadura no va afectar la motilitat, la viabilitat, la concentració ni la morfologia espermàtica ($P > 0,05$ en tots els casos).

DISCUSSIÓ

En aquest treball s'ha testejat l'efecte de la filtració a través de columnes de granadura sobre la qualitat espermàtica de dosis seminals de mascles reproductors Piétrain afectats d'astenospèrmia, asteneratospèrmia i teratospèrmia. En tots els grups s'observà una disminució de la concentració espermàtica, mentre que la viabilitat es va mantenir constant després de la filtració. La pèrdua d'espermatozoides després del procés de filtració s'ha descrit per a diferents espècies, com ara cavalls (Sieme *et al.*, 2003), toros (Januskauskas *et al.*, 2005) i porcs (Bussalleu *et al.*, 2008).

En aquest estudi, els espermatozoides viables eren aquells que presentaven el nucli, la membrana plasmàtica, la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes. Després de la filtració en les columnes de granadura no es va observar, en cap dels grups estudiats, que la filtració induís la reacció acrosòmica o afectés la integritat de les membranes o del DNA. En estu-

Taula 1. Grups de mascles

Paràmetre	Astenoespèrmics (n = 7)		Astenoteratospèrmics (n = 6)		Teratospèrmics amb anomalies cefàliques (n = 22)		Teratospèrmics amb anomalies a la cua (n = 3)		Teratospèrmics amb anomalies cefàliques i a la cua (n = 8)	
	Dosi no filtrada	Dosi filtrada	Dosi no filtrada	Dosi filtrada	Dosi no filtrada	Dosi filtrada	Dosi no filtrada	Dosi filtrada	Dosi no filtrada	Dosi filtrada
Motilitat espermàtica % spz. mòbils	67,69 % ± 12,60	57,26 % ± 22,19	71,47 % ± 7,09	65,85 % ± 17,74	89,17 % ± 5,03	79,46 % ± 11,45	91,67 % ± 4,02	74,83 % ± 10,59	87,80 % ± 5,56	82,43 % ± 8,16
Viabilitat espermàtica % spz. VBBAB	78,71 % ± 3,32	78,57 % ± 6,56	77,28 % ± 5,81	81,44 % ± 3,12	78,70 % ± 4,38	82,35 % ± 3,74	81,22 % ± 3,87	80,55 % ± 3,24	77,71 % ± 4,44	82,96 % ± 3,12
Morfologia espermàtica % spz. madurs	88,95 % ± 3,30	94,33 % ± 2,32 ^a	74,89 % ± 11,08	84,50 % ± 6,94	74,79 % ± 7,00	86,43 % ± 4,69 ^a	72,44 % ± 6,08	80,22 % ± 2,71	65,75 % ± 6,10	81,58 % ± 4,68 ^a
% spz. amb anomalies cefàliques	3,71 % ± 1,32	2,67 % ± 1,43	7,33 % ± 2,30	4,89 % ± 2,03	11,42 % ± 4,89	6,53 % ± 3,56 ^a	4,00 % ± 1,15	3,45 % ± 1,07	8,50 % ± 3,68	4,25 % ± 2,90
% spz. amb anomalies a la cua	0,95 % ± 0,75	0,52 % ± 0,74	3,17 % ± 2,56	2,11 % ± 1,89	1,53 % ± 1,24	0,92 % ± 1,28	12,22 % ± 4,91	10,44 % ± 4,62	15,21 % ± 7,96	9,42 % ± 5,30
% spz. amb gota proximal	1,62 % ± 1,16	0,52 % ± 0,84	2,61 % ± 0,93	1,94 % ± 1,60	4,18 % ± 2,45	2,29 % ± 2,35	1,22 % ± 1,26	1,22 % ± 2,12	0,87 % ± 0,73	0,54 % ± 0,40
% spz. amb gota distal	2,00 % ± 1,89	0,81 % ± 1,45	9,67 % ± 10,91	4,50 % ± 5,20	5,95 % ± 6,65	2,86 % ± 4,42	6,89 % ± 3,34	2,33 % ± 1,15	6,00 % ± 3,97	2,13 % ± 1,71 ^a
% spz. aglutinats	2,76 % ± 1,09	1,14 % ± 0,88 ^a	2,34 % ± 1,18	2,06 % ± 1,26	2,12 % ± 0,86	0,97 % ± 0,64 ^a	3,22 % ± 0,20	2,33 % ± 1,15	3,67 % ± 1,71	2,08 % ± 1,03
Concentració espermàtica (× 106 spz./ml)	1031,14 ± 550,47	570,86 ± 347,48	928 ± 192,62	733,50 ± 274,92	1495,45 ± 542,80	981,82 ± 479 ^a	1796,33 ± 179,81	987 ± 325,54	1377 ± 401,80	978,75 ± 596,81

Els resultats s'expressen com la mitjana % ± SD.

^aDiferències significatives entre les dosis no filtrades i les dosis filtrades en granadura ($P < 0,05$)

dis similars amb boví, però, la filtració amb granadura incrementava la freqüència d'espermatozoides viables (Foote, 2001). Així doncs, les diferències entre els nostres resultats i els obtinguts en altres treballs poden ser degudes a la tècnica utilitzada per a l'avaluació de la viabilitat espermàtica. En la majoria d'estudis, la permeabilitat de la membrana, la integritat del DNA i l'estat de l'acrosoma s'analitzen de manera independent. Per contra, en aquest treball l'estat d'aquests paràmetres s'estudia simultàniament. Conseqüentment, l'anàlisi mitjançant la múltiple tinció amb fluorocroms és més restrictiva que l'avaluació independent, ja que només es consideren viables aquells espermatozoides amb la membrana plasmàtica, el nucli, la beina mitocondrial i l'acrosoma intactes.

Respecte a la millora de la morfologia espermàtica, els millors resultats s'observen en les dosis seminals que abans de la filtració presenten més d'un 15 % d'espermatozoides aberrants. Aquests resultats concorden amb els obtinguts per Grahma i Graham (1990) en boví; segons aquests autors, l'efectivitat de la columna en la millora de la morfologia esper-

màtica està inversament correlacionada amb la qualitat espermàtica. També en equins, la filtració de semen a través de columnes de granadura ocasiona una millora de la morfologia espermàtica (Klinc *et al.*, 2005).

En conclusió, segons els resultats obtinguts en aquest estudi, malgrat que hi hagi una pèrdua de concentració espermàtica, les columnes de granadura són efectives per millorar la qualitat espermàtica de mascles reproductors Piétrain que presenten una baixa qualitat espermàtica abans dels processos d'inseminació artificial o de criopreservació.

BIBLIOGRAFIA

- ANZAR, M.; GRAHAM, E. F. (1995). «Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen». *Theriogenology*, 43: 439-449.
- BONET, S.; BRIZ, M.; PINART, E.; CAMPS, R.; FRADERA, A.; CASADEVALL, M. (1995). «Light microscopy characterization of sperm morphology». *Microsc. Anal.*, 9: 29-31.
- BUSSALLEU, E.; PINART, E.; RIVERA, M. M.; ARIAS,

- X.; BRIZ, M.; SANCHO, S.; GARCÍA-GIL, N.; BASSOLS, J.; PRUNEDA, A.; YESTE, M.; CASAS, I.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S.; (2008). «Effects of filtration of semen doses from low sperm quality ejaculates boars through new ter Sephadex columns». *Reprod. Domest. Anim.*, 43: 48-52.
- BUSSALLEU, E.; PINART, E.; YESTE, M.; BRIZ, M.; SANCHO, S.; GARCIA-GIL, N.; BADIA, E.; BASSOLS, J.; PRUNEDA, A.; CASAS, I.; BONET, S. (2005). «Development of a protocol for multiple staining with fluorochromes to assess the functional status of boar spermatozoa». *Micros. Res. Tech.*, 68(5): 277-283.
- DAYA, S.; GWATKIN, R. B. (1987). «Improvement in semen quality using glass bead column». *Arch. Androl.*, 18(3): 241-244.
- FOOTE, R. H. (2001). «Inhibition of sperm motility does not affect live-dead separation of bull sperm by glass beads». *Asian. J. Androl.*, 3: 197-204.
- GRAHAM, E. F.; GRAHAM, J. K. (1990). «The effect of whole ejaculate filtration on the morphology and fertility of bovine semen». *J. Dairy Sci.*, 73: 91-97.
- JANUSKAUSKAS, A.; LUKOSEVICIUTE, K.; NAGY, S.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2005). «Assessment of the efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa for cryopreservation». *Theriogenology*, 63: 160-178.
- KLINC, P.; KOSEC, M.; MAJDIC, G. (2005). «Freezability of equine semen after glass beads column separation». *Equine Vet. J.*, 37(1): 43-47.
- MOGAS, T.; RIGAU, T.; PIEDRAFITA, J.; BONET, S.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. (1998). «Effect of column filtration upon the quality parameters of fresh dog semen». *Theriogenology*, 50: 1171-1189.
- MORRELL, J. M. (2006). «Update on semen technologies for animal breeding». *Reprod. Domest. Anim.*, 41(1): 63-67.
- SOMFAI, T.; BODO, S.; NAGY, S.; PAPP, A. B.; IVANCICS, J.; BARANYAI, B.; GOCZA, E.; KOVACS, A. (2003). «Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa». *Reprod. Dom. Anim.*, 37(5): 285-290.

CONGELABILITAT DE LES EJACULACIONS DE PORCÍ: ESTUDI COMPARATIU DE LA QUALITAT ESPERMÀTICA I LA TAXA DE FERTILITAT *IN VIVO*

Isabel Casas,¹ Sílvia Sancho,¹ M. Dolors Briz,¹ Elisabeth Pinart,¹ Eva Bussalleu,¹
Marc Yeste,¹ Anna Fàbrega,¹ Estela Garcia,¹ Marta Puigmulé,¹ Josep Reixach,² Marta Diaz,²
Xavier Barrera³ i Sergi Bonet¹

¹ Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana, Departament de Biologia-INTEA, Facultat de Ciències, Universitat de Girona.

Campus Montilivi, s/n. 17071 Girona. isabel.casas@udg.edu.

² Grup Batallé.

³ Semen Cardona SL.

Resum

L'objectiu d'aquest treball ha estat valorar la predicció de la congelabilitat de les ejaculacions de porcí mitjançant l'estudi de la qualitat espermàtica i la comparació amb la taxa de fertilitat *in vivo*. Es van obtenir 26 ejaculacions, cadascuna de les quals es va dividir en una porció refrigerada (FS, control) i una porció destinada a ser congelada (FTS), les quals posteriorment van ser utilitzades per practicar les respectives inseminacions *in vivo*. L'anàlisi espermàtica de les ejaculacions es va realitzar en tres estadis del procés de criopreservació: 17 °C, 5 °C i 240 min postdescongelació. Segons els valors obtinguts en la motilitat progressiva i en la vitalitat espermàtica als 240 min postdescongelació, cada ejaculació es va classificar en dues possibles categories: ejaculació amb bona congelabilitat (GFE) o ejaculació amb mala congelabilitat (PFE). Els resultats mostren una major hiperactivitat espermàtica en el grup PFE quan s'assoleixen els 5 °C durant el procés de criopreservació. Aquest fet indica una sensibilitat més alta al xoc per fred respecte al grup GFE, que repercuteix en la disminució fins a la meitat de la seva taxa fecundant. No s'observen diferències entre els paràmetres de qualitat espermàtica o en la taxa de fertilitat obtinguts a 17 °C en cap dels dos grups d'ejaculacions. Per tant, la predicció de la congelabilitat d'una ejaculació a partir de paràmetres rutinaris de qualitat espermàtica és vàlida en assolir els 5 °C durant el procés de criopreservació. Aquest resultat contribueix al coneixement de possibles predictors de la congelabilitat espermàtica en porcí. No obstant això, són necessaris més estudis per aprofundir en la determinació de marcadors específics que puguin minimitzar costos en utilitzar esperma criopreservat per a inseminació artificial.

Paraules clau: criopreservació, esperma porcí, fertilitat, congelabilitat.

Abstract

The objective of this work is to value the prediction of the freezability of boar ejaculates through a study of the spermatic quality and its comparison with the *in vivo* fertility. Twenty-six ejaculates were collected and each one was divided into a refrigerated portion (FS, control) and a frozen-thawed portion (FTS) that were used in the field fertility trial. The analysis of the sperm quality was performed at three steps of the cryopreservation procedure: 17 °C, 5 °C and 240 min post-thawing. Depending on the values obtained in the sperm progressive motility and viability at 240 min post-thawing, each ejaculate was classified in two possible categories: good freezability ejaculate (GFE) or poor freezability ejaculate (PFE). Our results show a higher sperm hyperactivity in the PFE group at the 5 °C during the cryopreservation process. This fact points to a higher sensitivity of this group to cold shock with respect to the GFE, which causes the decrease of its fecundity to the half. No differences are observed in the sperm quality parameters or in the fertility rate at 17 °C between both categories of ejaculates. For that reason, the prediction of the freezability of a given ejaculate is possible when reaching the 5 °C during the cryopreservation process. This result contributes to the knowledge of possible sperm freezability predictors in the boar. Even so, more studies are necessary to penetrate in the determination of specific freezability markers that could minimize costs when using cryopreserved sperm for artificial insemination.

Key words: cryopreservation, boar sperm, fertility, freezability.

INTRODUCCIÓ

L'ús de semen congelat (FTS) en tecnologies d'inseminació artificial porcina representa sols l'1 % del total d'inseminacions en comparació de l'ús del semen refrigerat (FS) (Roca *et al.*, 2006). Aquest fet es pot explicar pel baix percentatge d'èxit obtingut en la congelació dels espermatozoides d'aquesta espècie, principalment a causa de la particular composició de la seva membrana (Watson, 2000). La tolerància de les ejaculacions al procés de congelació té una clara base genètica (Thurston, 2002a, b) i varia entre individus (Roca *et al.*, 2006), però també dins d'un mateix individu per factors no sempre determinats (Gil *et al.*, 2005). En estudis previs hem observat una freqüència de motilitat espermàtica progressiva postdescongelació inferior al 40 % en més del 50 % dels casos; és, doncs, prioritari, trobar marcadors que permetin una identificació prèvia d'aquestes ejaculacions menys aptes per criopreservar. L'existència d'una base genètica evident en la congelabilitat espermàtica ens suggereix la possibilitat de predir la qualitat postdescongelació de qualsevol ejaculació a partir d'uns valors qualitius estàndard en semen refrigerat, que podrien ser inclosos en les anàlisis de qualitat espermàtica dels centres d'inseminació artificial (IA). D'altra banda, i malgrat les evidències, encara no hi ha dades publicades sobre els percentatges de fertilitat *in vivo* que presenten les ejaculacions segons la seva congelabilitat.

MATERIAL I MÈTODES

Obtenció de mostres i disseny experimental

Vint-i-sis ejaculacions de porcí provinents de quinze mascles Piétrain madurs van ser obtingudes per masturbació manual. La fracció espermàtica de cada ejaculació va ser dividida en dues porcions, que es van etiquetar com la porció refrigerada (FS, control) i la porció destinada a ser congelada (FTS). La porció FS es va diluir fins a 3×10^9 spz/ml en diluent de llarga durada (Vitasem LD, Magapor SL, Saragossa) i es va envasar en tres dosis comercials de 90 ml, que es van preservar a 17 °C fins al moment de la IA. La resta de l'ejaculació (porció FTS) va ser diluïda 1:5, v/v en el mateix diluent que la porció FS, i va ser preservada a 17 °C abans de ser criopreservada.

Vint-i-quatre hores després de l'extracció es va realitzar l'anàlisi de la qualitat espermàtica a 17 °C a partir de la porció FTS i es va comprovar que les 26

ejaculacions complissin uns mínims qualitius: 60 % de motilitat espermàtica progressiva, 70 % d'espermatozoides morfològicament normals i 80 % de viabilitat i resistència osmòtica espermàtiques. Un cop verificats els paràmetres anteriors es va procedir a la congelació de la porció FTS fent servir un protocol estàndard en porcí (Westendorf *et al.*, 1975; Carvajal *et al.*, 2004). L'anàlisi a 5 °C es va realitzar a partir d'una alíquota d'esperma diluït en medi de criopreservació, i es va rediluir a proporció 1:3, v/v en diluent de Beltsville (BTS; Pursel i Johnson, 1975). L'anàlisi de la qualitat seminal es va fer després de 30 min a 5 °C. La resta de la porció FTS es va envasar en palletes de 0,5 ml amb 1×10^9 spz/ml i va ser emmagatzemada durant 12 h en nitrogen líquid abans de les inseminacions. Tant per a la IA com per a l'anàlisi de la qualitat espermàtica postdescongelació les palletes van ser submergides durant 20 segons en un bany a 37 °C i el seu contingut va ser diluït en BTS a 37 °C (1:3, v/v). L'esperma es va mantenir al bany fins passats 240 min.

Cada ejaculació va ser classificada com a ejaculació amb bona congelabilitat (GFE) o ejaculació amb mala congelabilitat (PFE), segons una anàlisi de conglomerats no jerarquitzada mitjançant les dissimilituds entre les mitjanes de viabilitat i motilitat progressiva obtingudes en l'esperma 240 min postdescongelació. Vuitanta-sis truges múltiples van ser inseminades aleatòriament amb un dels quatre tractaments següents: porció refrigerada d'ejaculació amb bona congelabilitat (FS-GFE), porció refrigerada d'ejaculació amb mala congelabilitat (FS-PFE), porció descongelada d'ejaculació amb bona congelabilitat (FTS-GFE) i porció descongelada d'ejaculació amb mala congelabilitat (FTS-PFE).

Anàlisi de la qualitat espermàtica

La morfologia es va analitzar únicament a 17 °C com a control de la qualitat inicial de l'ejaculació, ja que s'ha comprovat que les úniques alteracions morfològiques que provoca la congelació són canvis de volum en l'espermatozoide per efectes osmòtics (García-Herreros *et al.*, 2008; Petrunkina *et al.*, 2005). En el recompte d'espermatozoides anòmals es van incloure aquells que presentaven gota citoplasmàtica proximal, cua doblegada, cua enrotllada, cua trencada o alguna malformació del cap. La motilitat es va examinar sobre placa calefactada a 37 °C mitjançant un programa informàtic d'anàlisi computada (CASA, SCA Production 2002, Microptic SL, Barcelona). Es van analitzar onze paràmetres cinètics: motilitat total, recorreguts circulars, velocitat

curvilínia (VCL), velocitat lineal (VSL), velocitat mitjana (VAP), linealitat (LIN = VSL/VCL), rectitud (STR = VSL/VAP), oscil·lació (WOB = VAP/VCL), amplitud del desplaçament lateral del cap (ALH), freqüència de batuda (BCF) i motilitat progressiva (espermatozoides amb STR superior al 45 %). La viabilitat espermàtica es va mesurar a través de la integritat de la membrana mitjançant l'ús de les sondes fluorescents SYBR-14/PI (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) i la resistència osmòtica dels espermatozoides es va valorar segons el test ORT (Schilling *et al.*, 1984; Pérez-Llano *et al.*, 1998), calculant el percentatge com la mitjana d'espermatozoides amb acrosomes no reaccionats en solucions isotònica i hipotònica.

Inseminació artificial (IA)

Totes les truges va ser tractades amb PMSG/hcCG (Gestavet, Hipra, Girona) per induir i sincronitzar l'ovulació. Després de 48 hores de la inducció hormonal, les truges van ser inseminades aleatòriament amb un dels quatre tractaments descrits. Cada setmana es van extreure entre dues i tres ejaculacions i es van inseminar un mínim de dues truges per cada ejaculació, una amb la porció FS i l'altra amb la porció FTS. Es van realitzar dues inseminacions de 30 ml per truja i tractament en un interval de quatre hores (Waberski *et al.*, 1994), corresponents a una concentració de 1×10^9 spz/inseminació per a la porció FS (Gil, 2006; Watson i Behan, 2002) i $7,5 \times 10^9$ spz/inseminació per a la porció FTS. Les inseminacions es van dur a terme amb la sonda postcervical Soft-Quick (Import-vet SA, Barcelona). El nombre de truges prenyades es va detectar 28 dies més tard per ecografia (Echoscan T-100, Import-vet SA, Barcelona) i també es va determinar el nombre de garrins nascuts.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Tretze ejaculacions van ser classificades estadísticament com a GFE i 13 com a PFE. Els resultats de l'anàlisi espermàtica es mostren a la taula 1. L'estimació de la congelabilitat de les ejaculacions d'acord amb els paràmetres cinètics no va ser possible als 17 °C perquè no es van observar diferències entre GFE i PFE en cap dels paràmetres analitzats però sí als 5 °C, moment en el qual es van observar diferències en resistència osmòtica, motilitat progressiva, LIN i STR (*t*-student, $P \leq 0,05$). Són d'especial rellevància els baixos valors de LIN i STR a 5 °C, que

coincideixen amb l'existència d'espermatozoides amb un moviment hiperactivat, tal com s'ha observat en espermatozoides capacitats (Schmidt i Kamp, 2004). S'ha demostrat que el semen congelat pateix modificacions semblants a la capacitació, anomenades *criocapacitació*, que es manifesten en aquest tipus de moviment a causa de canvis en la fluïdesa de la membrana de l'espermatozoide durant el xoc per fred, especialment entre els 17 i els 5 °C (Watson, 2000; Andrabi, 2007), i el qual desapareix en descongelar (Guthrie i Welch, 2005; Saravia *et al.*, 2007) coincidint amb l'increment de LIN i STR. Aquest procés disminueix la supervivència de l'espermatozoide i, per tant, les oportunitats d'arribar a fecundar l'òocit (Green i Watson, 2001), i es proposa que la mortalitat provocada per la criocapacitació podria ser la causa de l'absència d'hiperactivació observada en descongelar (Cremades *et al.*, 2005). En PFE els valors de LIN i STR són inferiors que en GFE i, per tant, es pot concloure que els PFE tenen un major índex de criocapacitació, i això suggereix una alta inestabilitat de la membrana dels seus espermatozoides.

Els resultats de la IA (vegeu la taula 2) demostren, tal com s'esperava, una disminució de la fertilitat en PFE. El nombre de truges prenyades no va variar entre el tractament FTS-GFE i els tractaments control (FS-GFE/PFE) però sí entre el tractament FTS-PFE i els tractaments control i entre el tractament FTS-PFE i el tractament FTS-GFE. En ambdós casos el nombre de truges prenyades va ser inferior en FT-PFE (model lineal general, post-hoc Bonferroni, $P < 0,05$). No es van observar diferències en el nombre de garrins nascuts entre els quatre tractaments assajats. Els resultats demostren que les ejaculacions amb baixa motilitat progressiva i viabilitat espermàtica postdescongelació tenen una fecunditat fins a dues vegades inferior que la de les ejaculacions amb bona congelabilitat, fet que molt probablement està lligat a la selecció que es produeix *in vivo* en favor dels espermatozoides mòbils i viables (Taylor *et al.*, 2008).

AGRAÏMENTS

A tot el personal de BioGirona SL, pel suport en la recollida i processament de les ejaculacions. La recerca ha estat finançada amb els projectes AGL2004-04756-002-01/GAN i CDTI TAM4321 del Pla Nacional d'I+D+I i amb ajuts del Departament d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu.

Taula 1. Anàlisi de qualitat espermàtica en tres etapes de la criopreservació (17 °C, 5 °C i 240 min postdescongelació)

Anàlisi de la qualitat espermàtica		17 °C	5 °C	240 min postdescongelació
Resistència osmòtica (%)	GFE	91,33 ± 1,13	**94,47 ± 0,57	*83,03 ± 1,19
	PFE	89,19 ± 1,61	96,31 ± 0,34	78,24 ± 1,78
Viabilitat (%)	GFE	90,15 ± 0,78	86,95 ± 1,24	**50,99 ± 2,25
	PFE	89,63 ± 0,68	86,22 ± 2,14	25,67 ± 2,66
Motilitat				
Motilitat total (%)	GFE	96,95 ± 0,43	99,47 ± 0,07	**87,73 ± 2,16
	PFE	97,05 ± 0,46	93,46 ± 5,08	40,84 ± 8,05
Motilitat progressiva (%)	GFE	90,15 ± 0,78	*72,18 ± 0,76	**55,46 ± 3,02
	PFE	89,63 ± 0,68	61,30 ± 4,85	21,65 ± 5,33
Recorreguts circulars (%)	GFE	96,95 ± 0,43	66,11 ± 2,26	**39,69 ± 2,08
	PFE	97,05 ± 0,46	70,90 ± 4,73	19,71 ± 3,80
VCL (µm/s)	GFE	67,90 ± 1,51	89,73 ± 3,29	**47,54 ± 2,46
	PFE	65,00 ± 1,65	85,51 ± 7,00	33,26 ± 3,24
VSL (µm/s)	GFE	53,19 ± 2,80	37,42 ± 1,13	**28,25 ± 1,33
	PFE	56,03 ± 3,21	32,09 ± 2,94	18,67 ± 2,51
VAP (µm/s)	GFE	55,57 ± 2,54	60,12 ± 1,89	**37,85 ± 1,88
	PFE	57,88 ± 4,12	55,16 ± 4,59	24,98 ± 2,95
LIN (%)	GFE	26,56 ± 0,97	**42,58 ± 1,12	59,76 ± 1,21
	PFE	26,54 ± 1,28	37,39 ± 1,51	53,09 ± 3,46
STR (%)	GFE	40,77 ± 1,58	**62,60 ± 0,87	74,82 ± 0,91
	PFE	42,06 ± 2,38	57,69 ± 1,19	71,91 ± 2,36
WOB (%)	GFE	48,52 ± 1,35	67,70 ± 0,86	*79,74 ± 0,69
	PFE	47,11 ± 1,67	64,67 ± 2,16	72,62 ± 2,736
ALH (µm)	GFE	2,49 ± 0,10	3,74 ± 0,13	2,16 ± 0,06
	PFE	2,69 ± 0,21	3,77 ± 0,23	1,79 ± 0,19
BCF (Hz)	GFE	6,56 ± 0,11	6,49 ± 0,09	*6,38 ± 0,06
	PFE	6,59 ± 0,12	5,91 ± 0,27	4,65 ± 0,67

Es mostren les mitjanes i l'error estàndard. Els 13 paràmetres qualitius es van assajar sobre 13 ejaculacions amb bona congelabilitat (GFE) i 13 ejaculacions amb mala congelabilitat (PFE). Els valors dels paràmetres amb asterisc són estadísticament diferents entre GFE i PFE per a l'etapa a la qual es refereixen (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$).

Taula 2. Resultats de la inseminació artificial postcervical

	Porció FS (control)		Porció FTS	
	GFE	PFE	GFE	PFE
Mascles porcins ($n=15$)	9	9	9	9
Ejaculacions ($n=26$)	13	13	13	13
Truges inseminades (n)	21	20	26	19
Volum inseminat per truja (ml)	30 (×2)	30 (×2)	30 (×2)	30 (×2)
Concentració (×10 ⁹ spz/inseminació)	1	1	7,5	7,5
Truges en les quals es va observar reflux (n)	4	2	8	4
Truges prenyades als 28 dies (n)	17 ¹	17 ¹	16 ^a	5 ^{b,2}
Taxa de fecundació (%)	80,95	85	61,54	26,32
Garrins nascuts vius (n)	10,06 ± 0,89	11,27 ± 0,61	8,64 ± 0,94	9,40 ± 0,93
Garrins totals (n)	10,65 ± 0,74	12,13 ± 0,57	9,36 ± 1,15	10,60 ± 1,21

Per al nombre de garrins es mostren les mitjanes i l'error estàndard. FS-GFE: semen refrigerat d'ejaculació amb bona congelabilitat; FS-PFE: semen refrigerat d'ejaculació amb mala congelabilitat; FTS-GFE: semen descongelat d'ejaculació amb bona congelabilitat; FTS-PFE: semen descongelat d'ejaculació amb mala congelabilitat. Els valors a la mateixa fila amb diferent superíndex són significativament diferents (^{a,b} $P < 0,05$; ^{1,2} $P < 0,01$).

BIBLIOGRAFIA

- ANDRABI, S. M. H. (2007). «Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa (mini review)». *Int. J. Agri. Biol.*, 9(2): 367-369.
- CARVAJAL, G.; CUELLO, C.; RUÍZ, M.; VÁZQUEZ, J.

- M.; MARTÍNEZ, E. A.; ROCA, J. (2004). «Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival». *J. Androl.*, 25(3): 389-396.
- CREMADES, T.; ROCA, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; ABAIGAR, T.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E. A. (2005). «Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa». *J. Androl.*, 26(5): 610-608.
- GARCÍA-HERREROS, M.; BARÓN, F. J.; APARICIO, I. M.; SANTOS, A. J.; GARCÍA-MARÍN, L. J.; GIL, M. C. (2008). «Morphometric changes in boar spermatozoa induced by cryopreservation». *Int. J. Androl.*, 31(5): 490-408.
- GIL, J. (2006). «Inseminación post-cervical. Utilización en rutina de trabajo». *Avances en Tecnología Porcina*, 3(3): 66-76.
- GIL, M. A.; ROCA, J.; CREMADES, T.; HERNÁNDEZ, M.; VÁZQUEZ, J. M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; MARTÍNEZ, E. A. (2005). «Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate in vitro fertility of boar individual ejaculates?». *Theriogenology*, 64(2): 305-316.
- GREEN, C. E.; WATSON, P. F. (2001). «Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation». *Reproduction*, 122(6): 889-898.
- GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. (2005). «Effects of hypothermic liquid storage and cryopreservation on basal and induced plasma membrane phospholipid disorder and acrosome exocytosis in boar spermatozoa». *Reprod. Fertil. Dev.*, 17(4): 467-477.
- PÉREZ-LLANO, B.; SANCHEZ-SANCHEZ, J. L.; LORENZO-GONZÁLEZ, P.; GARCÍA-CASADO, P. (1998). «A short version of the osmotic resistance test for boar semen». *Proceedings of the XVth International Pigs Veterinary Society Congress (IPVS), Birmingham*, 61.
- PETRUNKINA, A. M.; JEBE, E.; TÖPFER-PETERSEN, E. (2005). «Regulatory and necrotic volume increase in boar spermatozoa». *J. Cell Physiol.*, 204(2): 508-521.
- PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A. (1975). «Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure». *J. Anim. Sci.*, 40(1): 99-102.
- ROCA, J.; HERNÁNDEZ, M.; CARVAJAL, G.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E. A. (2006). «Factors influencing boar sperm cryosurvival». *J. Anim. Sci.*, 84(10): 2692-2699.
- SARAVIA, F.; HERNÁNDEZ, M.; WALLGREN, M.; JOHANSSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. (2007). «Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculate». *Int. J. Androl.*, 30(6): 485-499.
- SCHILLING, E.; VENGUST, M.; SMIDT, D. (1984) «ORT - A new test to predict the freezability and storage of boar spermatozoa». *Proceedings of the VIIIth International Pigs Veterinary Society Congress (IPVS) Ghent*, 296.
- SCHMIDT, H.; KAMP, G. (2004). «Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis». *Reproduction*, 128(2): 171-179.
- TAYLOR, U.; RATH, D.; ZERBE, H.; SCHUBERTH, H.-J. (2008). «Interaction of intact porcine spermatozoa with epithelial cells and neutrophilic granulocytes during uterine passage». *Reprod. Domest. Anim.*, 43(2): 166-175.
- THURSTON, L. M.; SIGGINS, K.; MILEHAM, A. J.; WATSON, P. F.; HOLT, W. V. (2002a) «Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation?». *Cryo. Letters*, 23(4): 255-262.
- (2002b). «Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability cryopreservation». *Biol. Reprod.*, 66(3): 545-554.
- WABERSKI, D.; WEITZE, K. F.; GLEUMES, T.; SCHWARZ, M.; WILLMEN, T.; PETZOLDT, R. (1994). «Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen». *Theriogenology*, 42(5): 831-840.
- WATSON, P. F. (2000). «The causes of reduced fertility with cryopreserved semen». *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 481-492.
- WATSON, P. F.; BEHAN, J. R. (2002). «Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial». *Theriogenology*, 57(6): 1683-1893.
- WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. (1975). «Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletten-Verfahren». *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 82: 261-267.

SOBREEXPRESSIÓ DEL GENS *HSP90AA1* I *HSPA8* EN CÈL·LULES EPITELIALS DE L'OVIDUCTE (OEC) PRODUÏDA PER ESPERMATOZOIDES EN L'ESPÈCIE PORCINA

Marc Yeste,^{1,2} William V. Holt,² M. Dolors Briz,¹ Sergi Bonet¹ i Rhiannon E. Lloyd²

¹ 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.edu.

² Reproductive Biology, Institute of Zoology, Zoological Society of London.

Resum

Les cèl·lules epitelials de l'oviducte (OEC) afecten la viabilitat, la capacitació i la motilitat espermàtiques en porcí i en altres mamífers. S'ha observat que algunes proteïnes oviductals també afecten la funcionalitat espermàtica. L'objectiu d'aquest estudi fou l'anàlisi dels canvis en l'expressió de dos gens que codifiquen dues proteïnes de xoc tèrmic prèviament identificades en un extracte de 70 kDa de proteïnes de les membranes apicals de les OEC (sAPM). Els canvis en l'expressió del gens *heat shock protein 90 kDa alpha A.1 (HSP90AA1)* i *heat shock cognate protein related 70 kDa (HSPA8)* es van determinar durant un cocultiu *in vitro* de cèl·lules oviductals i espermatozoides durant 24 hores, amb presència o absència d'una membrana semipermeable que impedia el contacte directe entre ambdós tipus cel·lulars. Es va observar que els espermatozoides induïen l'expressió del gens *HSP90AA1* i *HSPA8* a les OEC després de 3 o 6 hores de cocultiu, respectivament, quan hi ha contacte directe entre ambdues cèl·lules. Això suggereix que les proteïnes HSP90AA1 i HSPA8 podrien tenir un paper important en el manteniment de la funcionalitat espermàtica en el reservori seminal.

Paraules clau: espermatozoides, cèl·lules oviductals, HSP90AA1, HSPA8, porcí.

Abstract

Oviductal epithelial cells (OEC) influence viability, capacitation and motility of sperm cells in boar and other mammalian species. Moreover, some oviductal proteins have also been shown to affect the sperm function. The aim of the present study was to analyze the changes in the expression of two relevant genes, all of their corresponding proteins being present in a 70 kDa porcine sAPM (solubilised apical plasma membrane extracts from OEC) protein band. Expression changes of heat shock protein 90 kDa alpha A.1 (*HSP90AA1*) and heat shock cognate protein related 70 kDa (*HSPA8*) were assessed in *in vitro* co-culture of OEC and Percoll-washed spermatozoa, over a 24 hour period, with or without a diffusible membrane insert to prevent direct contact between OEC and spermatozoa. Spermatozoa induce the upregulation of *HSP90AA1* and *HSPA8* after either 3 hours or 6 hours, respectively, of co-incubation in OEC, when there is direct contact between both types of cells. These results suggest HSP90AA1 and HSPA8 may play an integral role in the maintenance of spermatozoa in the oviductal sperm reservoir.

Key words: spermatozoa, oviductal cells, HSP90AA1, HSPA8, porcine.

INTRODUCCIÓ

Les cèl·lules epitelials de l'oviducte (OEC) afecten la viabilitat i la motilitat espermàtiques com a conseqüència del contacte directe entre ambdós tipus de cèl·lules i de l'activitat secretora d'aquestes cèl·lules somàtiques, tal i com s'ha observat en estudis previs (Yeste *et al.*, 2008a). D'altra banda, en altres estudis duts a terme en cavalls (Ellington *et al.*, 1993) i vaques (Thomas *et al.*, 1995), s'ha observat que quan

els espermatozoides s'uneixen a les OEC alteren quantitativament i qualitativament l'expressió proteica després d'establir un cocultiu homòleg *in vitro*. A més, en porcí s'ha determinat que *in vivo* els espermatozoides també influeixen en l'expressió gènica de les cèl·lules de l'oviducte (Georgiou *et al.*, 2007).

D'altra banda, és ben conegut que la coïncubació d'espermatozoides amb extractes de proteïnes de les membranes apicals (APM) de les cèl·lules oviductals

Taula 1. *Primers utilitzats*

Gen	Seqüències dels primers	Mida de l'amplicó	Temperatura de fusió (°C)	Nombre de cicles	EMBL (accession number)
ACTB	5' -GCCATGTACGTGGCCATCCAGGC-3' 5' -CTTAGCGGTCCCCCGTGCAA-3'	455	63	30	NM_001009784 AJ312183 M10277
HSPA8	5' -GGACCTGCAGTTGGCATTGATCT-3' 5' -TAGCCTGACGCTGAGAGTCGTTA-3'	362	60	35	NM_174345 CX062900 CX061052
HSP90AA1	5' -TTCAGCCTAGATGCCCGAGGAAA-3' 5' -ATGTGCAGCTCTTCCCGGAGTC-3'	219	61	35	NM_213973 U94395 X15183

manté la viabilitat espermàtica en diferents espècies de mamífers (Smith i Nothnick, 1997; Fazeli *et al.*, 2003). Atès que en porcí s'han identificat, entre d'altres, dues proteïnes de xoc tèrmic, la *heat shock cognate protein 70 kDa* (HSPA8) i la *heat shock protein 90 kDa alpha A.1* (HSP90AA1), com a constituents de l'APM (Elliot *et al.*, 2009), l'objectiu d'aquest estudi ha estat determinar els canvis en l'expressió dels gens que codifiquen aquestes dues proteïnes en les cèl·lules oviductals durant 24 hores de cocultiu. Per això, s'han dut a terme dos experiments de cocultiu diferents, amb contacte directe OEC-espermatozoide (sense *insert*) i sense contacte directe OEC-espermatozoide (amb *insert*).

MATERIAL I MÈTODES

Obtenció i cultiu de cèl·lules oviductals (OEC)

El cultiu primari de cèl·lules oviductals es va obtenir d'acord amb el protocol descrit per Yeste i col·laboradors (2008a). Els oviductes amb els ovaris es van recollir de femelles entre 10 i 16 mesos d'edat i es van distingir les fases fol·licular i luteínica atenent a l'aparença dels ovaris. Posteriorment les cèl·lules es van sembrar utilitzant medi de cultiu 199 suplementat amb sèrum fetal (10 %), penicil·lina/estreptomicina (1 %) i fungicida (0,5 %) a una concentració de 10⁶ cèl·lules per ml i es van cultivar a 37,5 °C i atmosfera al 5 % de CO₂ fins que es va assolir la confluència (6-7 dies). El medi de cultiu es va canviar cada 48 hores i la naturalesa epitelial de les cèl·lules oviductals es va comprovar mitjançant immunofluorescència anticitoqueratines.

Obtenció d'espermatozoides i cocultiu amb OEC

Es van utilitzar 11 mostres seminals que es van ren-

tar amb gradient de Percoll (35-70 %). Posteriorment, els espermatozoides es van resuspendre en medi Tyrode's modificat (Yeste *et al.*, 2008a) a una concentració de 1,87 × 10⁶ espermatozoides/ml. Els cocultius es van incubar a 37,5 °C, 100 % humitat i 5 % CO₂ i l'expressió gènica de les cèl·lules oviductals es va determinar després de 0, 3, 6, 12 i 24 hores. En els cocultius en els quals es volia impedir el contacte directe cèl·lula oviductal-espermatozoide, es va dipositar prèviament una membrana semipermeable (o *insert*) amb un diàmetre de porus de 4 µm (Millipore Corp.).

L'experiment es va repetir 11 vegades utilitzant esperma i cultius cel·lulars procedents d'animals diferents.

Extracció de RNA i RT-PCR semiquantitativa

L'mRNA es va extreure mitjançant un *kit* comercial i la seva puresa es va determinar mitjançant espectroscòpia (Abs₂₆₀/Abs₂₈₀). La transcripció inversa es va dur a terme utilitzant el *kit* Reverse Transcription System durant dues hores a 42 °C.

La PCR es va realitzar emprant *primers* (vegeu la taula 1) que es van dissenyar específicament en cada cas. Els productes de la RT-PCR es van separar mitjançant electroforesi amb gel d'agarosa al 2 % i a 100 V. Els gels es van visualitzar posteriorment amb un transil·luminador i les imatges obtingudes es van analitzar mitjançant el programari SynGene Genetools, el qual permet estimar la quantitat de cDNA mitjançant densitometria. Totes les mostres es van normalitzar utilitzant el gen de la β-actina (*ACTB*) com a estàndard intern.

Anàlisi estadística

Les abundàncies relatives de cDNA per a cada gen (*x*) (11 rèpliques) es van transformar mitjançant el

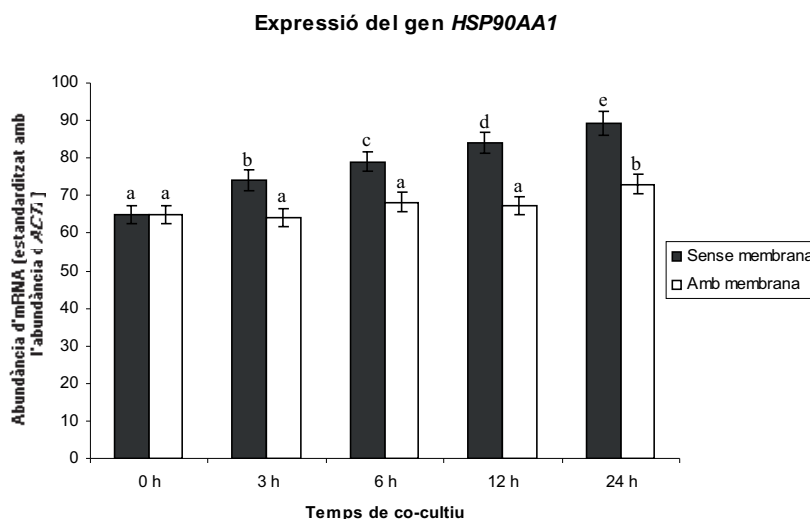


Figura 1. Expressió del gen *HSP90AA1* durant el cocultiu amb i sense membrana semipermeable. Els superíndexs (*a, b, c, d* i *e*) indiquen diferències significatives ($P < 0,05$) entre les abundàncies relatives.

càlcul de l'arcsin \sqrt{x} , per ser analitzades després amb mètodes paramètrics (ANOVA de mesures repetides, test post-hoc de Tukey i test *t* amb correcció de Bonferroni) i no paramètrics (tests de Friedman i Wilcoxon). El nivell de significació es va fixar per a $P < 0,05$. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de la mitjana.

RESULTATS

La figura 1 mostra l'expressió relativa del gen *HSP90AA1* a les OEC durant el temps de cocultiu. S'observa que els espermatozoides sobreregulen l'expressió d'aquest gen després de 3 hores de cocultiu i de manera creixent respecte al temps de cocultiu només quan estan en contacte directe amb les cèl·lules oviductals (sense membrana semipermeable), excepte després de 24 hores de coincubació, quan s'observa una sobreregulació marginal en el tractament amb membrana semipermeable.

Pel que fa a l'expressió del gen *HSPA8* a les OEC (vegeu la figura 2), només s'observen diferències significatives quan els espermatozoides estan en contacte directe amb aquestes cèl·lules oviductals (tractament sense membrana) després de 6 hores de cocultiu.

DISCUSSIÓ

La incubació dels espermatozoides amb l'APM (APM) de l'oviducte manté la seva viabilitat en conills (Smith i Nothnick, 1997), porcs (Fazeli *et al.*, 2003) i vaques (Boilard *et al.*, 2004). En porcí, aquests extractes han estat parcialment caracteritzats (Elliot *et al.*, 2009) i s'hi han identificat, entre d'altres, les proteïnes HSP90AA1 i HSPA8. En aquest estudi es demostra com l'expressió d'aquests dos gens en les cèl·lules oviductals es mostra sobreregulada quan els espermatozoides es poden unir de manera directa a aquestes cèl·lules. Recentment, s'ha observat que la incubació d'espermatozoides tant d'espècie porcina (Elliot *et al.*, 2009) com ovina (Lloyd *et al.*, 2009) amb la proteïna HSPA8 recombinant augmenta la viabilitat espermàtica. D'altra banda, s'ha determinat que la HSP90AA1 dels espermatozoides està implicada en la seva capacitació (Ecroyd *et al.*, 2003). Així doncs, a partir dels estudis previs, dels resultats d'aquest estudi i de les dades obtingudes a partir del cocultiu d'espermatozoides amb cèl·lules epitelials no reproductores (LLC-PK1) (Yeste *et al.*, 2008b), se suggereix que aquestes dues proteïnes són dos components de l'APM implicats en la modulació de la funcionalitat espermàtica en el reservori seminal i en el manteniment dels oòcits fecundats en les etapes primerenques del desenvolupament preimplantacional.

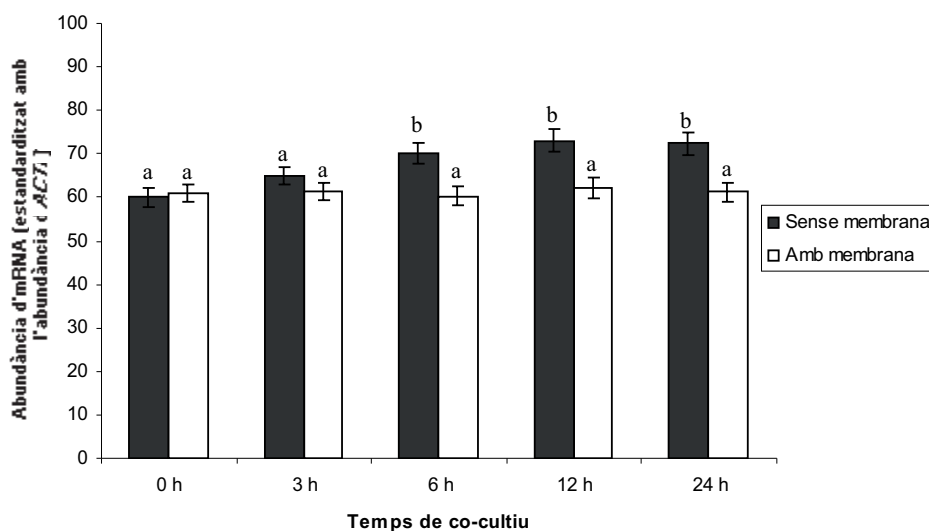
Expressió del gen *HSPA8*

Figura 2. Expressió del gen *HSPA8* durant el cocultiu amb i sense membrana semipermeable. Els superíndexs *a* i *b* indiquen diferències significatives ($P < 0,05$) entre les abundàncies relatives.

BIBLIOGRAFIA

- BOILARD, M.; REYES MORENO, C.; LACHANCE, C.; MASSICOTTE, L.; BAILEY, J. L.; SIRARD, M. A.; LECCLERC, P. (2004). «Localization of the chaperone proteins GRP78 and HSP60 on the luminal surface of bovine oviduct epithelial cells and their association with spermatozoa». *Biology of Reproduction*, 71: 1879-1889.
- ECROYD, H.; JONES, R. C.; AITKEN, R. J. (2003). «Tyrosine phosphorylation of HSP-90 during mammalian sperm capacitation». *Biology of Reproduction*, 69: 1801-1807.
- ELLINGTON, J. E.; IGNOTZ, G. G.; BALL, B. A.; MEYERS-WALLEN, V. N.; CURRIE, W. B. (1993). «De novo protein synthesis by bovine uterine tube (oviduct) epithelial cells changes during co-culture with bull spermatozoa». *Biology of Reproduction*, 48: 851-856.
- ELLIOTT, R. M.; LLOYD, R. E.; FAZELI, A.; SOSTARIC, E.; GEORGIU, A. S.; SATAKE, N.; WATSON, P. F.; HOLT, W. V. (2009). «Effects of HSPA8, an evolutionarily conserved oviductal protein, on boar and bull spermatozoa». *Reproduction*, 137: 191-203.
- FAZELI, A.; ELLIOTT, R. M.; DUNCAN, A. E.; MOORE, A.; WATSON, P. F.; HOLT, W. V. (2003). «In vitro maintenance of boar sperm viability by a soluble fraction obtained from oviductal plasma membrane preparations». *Reproduction*, 125: 509-517.
- GEORGIU, A. S.; SNIJDERS, A. P.; SOSTARIC, E.; AFLATOONIAN, R.; VÁZQUEZ, J. L.; VÁZQUEZ, J. M.; ROCA, J.; MARTÍNEZ, E. A.; WRIGHT, P. C.; FAZELI, A. (2007). «Modulation of the oviductal environment by gametes». *Journal of Proteome Research*, 6: 4656-4666.
- LLOYD, R. E.; ELLIOTT, R. M.; FAZELI, A.; WATSON, P. F.; HOLT, W. V. (2009). «Effects of oviductal proteins, including heat shock 70 kDa protein 8, on survival of ram spermatozoa over 48 h in vitro». *Reproduction, Fertility and Development*, 21: 408-418.
- SMITH, T. T.; NOTHNICK, W. B. (1997). «Role of direct contact between spermatozoa and oviductal epithelial cells in maintaining rabbit sperm viability». *Biology of Reproduction*, 56: 83-89.
- THOMAS, P. G.; IGNOTZ, G. G.; BALL, B. A.; BRINSKO, S. P.; CURIE, W. B. (1995). «Effect of coculture with stallion spermatozoa on de novo protein synthesis and secretion by equine oviduct epithelial cells». *American Journal of Veterinary Research*, 56: 1657-1662.
- YESTE, M.; LLOYD, R. E.; BADIA, E.; BRIZ, M.; BONET, S.; HOLT, W. V. (2008a). «Direct contact between boar spermatozoa and porcine oviductal epithelial cell (OEC) cultures is needed for optimal sperm survival in vitro». *Animal Reproduction Science*, DOI:10.1016/j.anireprosci.2008.08.018.
- YESTE, M.; LLOYD, R. E.; BRIZ, M.; BONET, S.; HOLT, W. V. (2008b). «The changes in the expression of three Heat Shock Proteins during in vitro homologous oviductal epithelial cell co-culture». 1st International Meeting of the Spanish Association for Animal Reproduction (AERA) and the British Andrology Society (BAS). Gijón, Spain. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(supl. 4): 53.

AVALUACIÓ DELS EFECTES CRÒNICS DE LA MDMA (ÈXTASI) EN LA FERTILITAT I LA REPRODUCCIÓ EN RATA MASCLE

Marta Barenys,¹ Núria Macià,¹ Lydia Camps,² Joaquín de Lapuente,² Jesús Gómez-Catalán,¹ Javier González-Linares,² Miquel Borràs,² Miguel Rodamilans¹ i Joan M. Llobet¹

¹GRET-CERETOX, Unitat de Toxicologia, Departament de Salut Pública, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona.

Av. Joan XXIII, s/n. 08028 Barcelona. mbarenys@ub.edu.

²GRET-CERETOX, Unitat de Toxicologia Experimental i Ecotoxicologia, Parc Científic de Barcelona.

Resum

La MDMA, droga d'abús coneguda, és consumida principalment per població jove. A aquesta edat és d'especial rellevància prendre en consideració els efectes sobre el sistema reproductor. L'impacte de la MDMA en la salut ha estat repetidament documentat, però els seus efectes sobre la reproducció encara no s'han estudiat amb profunditat. El consum de MDMA afecta diferents sistemes de neurotransmissors com el serotoninèrgic, el dopaminèrgic i el noradrenèrgic, que estan implicats en el control neuroendocrí de les funcions reproductores. En aquest estudi s'ha avaluat la influència de l'èxtasi sobre la fertilitat i reproducció en rates mascles. La MDMA es va administrar per via SC a rates mascle SD un cop al dia, tres dies consecutius per setmana, simulant el consum associat al cap de setmana. Es van administrar 0,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg o solució salina (control) durant 12 setmanes, cobrint l'inici de la pubertat i l'arribada a la maduresa sexual. En la meitat dels animals es van avaluar paràmetres hormonals (LH, FSH i testosterona), hematològics, bioquímics, histològics, genotoxicològics (test d'esperma Comet), testiculars i de l'esperma (pes d'epidídim i testicle, mobilitat, morfologia i quantificació d'espermatozoides i quantificació d'espermàtides). La resta dels animals es van aparellar amb femelles no tractades, sexualment receptives, per avaluar els índexs d'aparellament i d'embaràs. Les úniques diferències trobades van ser un augment significatiu de la incidència de dany en el DNA en el test Comet en espermatozoides i degeneració tubular i edema intersticial en els testicles. La degeneració tubular decreixia amb la dosi, mentre que l'edema intersticial augmentava. Els epidídimis eren normals en tots els grups experimentals i plens d'espermatozoides madurs. L'exposició a MDMA no va afectar la mobilitat i la morfologia dels espermatozoides en cap dosi. Els resultats de l'estudi d'aparellament no van mostrar diferències significatives en els índexs d'aparellament i d'embaràs ni en el nombre de llocs d'implantació. Aquest estudi omple el buit de coneixement existent sobre els efectes crònics de la MDMA en la funció reproductora amb un disseny experimental realista. Els resultats mostren dades patològiques descrites per primera vegada. Tenint en consideració la major sensibilitat en humans, es manté la preocupació sobre els efectes en la salut reproductora. Així, s'haurien de realitzar més estudis en rata per entendre els mecanismes i per clarificar la rellevància patològica en humans.

Paraules clau: èxtasi, MDMA, 3,4-metilendioximetamfetamina, rata, fertilitat masculina, administració crònica.

Abstract

MDMA, a well known drug of abuse, is consumed mainly by young population. At this age, it is especially relevant to take into consideration all the effects on the reproductive system. The impact of MDMA on the health has been repeatedly documented in the past, but its effects on reproduction have not yet been deeply studied. MDMA consumption affects several neurotransmitter systems such as serotonergic, dopaminergic and norepinephrine which are implied in the neuroendocrine control of reproductive functions. In this study the influence of ecstasy on the fertility and reproduction of the male rat was assessed. MDMA was administered (SC) to SD male rats once a day, three consecutive days a week, simulating human week-end associated consumption. 0.5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg or saline (control) were given during 12 weeks, covering the puberty onset and the sexual maturity achievement. Hormonal (LH, FSH and testosterone), haematological, biochemical, histological, genotoxicological (Comet test in sperm) and, testicular and sperm parameters (mobility, morphology and quantification of spermatozoa and spermatids, epididymides and testes weight), were evaluated in half of the animals. The remaining animals were mated with untreated sexually receptive females to evaluate the mating and pregnancy rates. The only differences found were a significantly higher incidence of DNA damage in Comet Test in sperm, and tubular degeneration and interstitial oedema in testes. The tubular degeneration was decreasing with dose while the interstitial oedema was increasing. Epididymides were normal in all experimental groups and filled with mature spermatozoa. Exposure to MDMA at all dose levels did not affect sperm motility and morphology. The results of mating study showed no significant differences in mating and pregnancy rates and num-

ber of implantation sites. This study fills the existing gap of knowledge about the chronic effects of MDMA in reproductive function using a realistic experimental design. The results show some pathological data described by the very first time. Taking into account the higher sensitivity of human male, some concerns about the effects on the reproductive health remain. Thus, further studies should be carried out in rats to understand the mechanism, and to clarify the pathological relevance in humans.

Key words: extasis, MDMA, 3,4-metylendioxymetamphetamine, rat, male fecundity, chronic administration.

INTRODUCCIÓ

La 3,4-metilendioximetamfetamina (MDMA, «èxtasi») és una droga d'abús que durant els últims vint anys ha augmentat la seva popularitat a Europa i Amèrica del Nord. La consumeixen principalment joves en entorns de festa i música (*raves*). En general, l'abús no mostra un fort patró addictiu; la majoria de consumidors de MDMA en prenen de manera intermitent, durant festes que duren tota la nit, una sola nit o al llarg del cap de setmana.

La MDMA és un derivat sintètic amfetamínic amb accions psicotròpiques que inclouen efectes estimulants similars als amfetamínics i efectes entactògens. Segons l'últim informe de l'European Monitoring Centre for Drugs, 9,5 milions d'europers han provat la MDMA (3 % de la població) i gairebé 3 milions n'han consumit en l'últim any (EMCDDA, 2007).

Els efectes potencials de la MDMA en la funció reproductora, segons el nostre coneixement, no han estat extensament estudiats. Des d'un punt de vista de salut pública, és una qüestió important: una considerable proporció de joves que està en edat fèrtil i està consumint una substància que podria comprometre la seva capacitat reproductora. Des d'un punt de vista toxicològic, es tracta d'una qüestió pertinent, ja que algunes de les diferents vies neurològiques alterades per la MDMA contribueixen, en part, al control neuroendocrí de les funcions reproductores.

MATERIAL I MÈTODES

Rates mascles Sprague-Dawley de 100-125 g, establades en condicions estàndard. La MDMA va ser cedida per la Delegació del Govern a Catalunya (Àrea de Sanitat) i purificada al Laboratori de Química Orgànica de la Facultat de Farmàcia de la UB, (99,5 % de puresa).

Es va administrar MDMA (0,5 mg/kg, 5 mg/kg i 10 mg/kg) o solució salina a 20 rates per grup per via SC un cop al dia, tres dies consecutius a la set-

mana durant 12 setmanes. En 10 animals de cada grup es van avaluar paràmetres hormonals, hematològics, bioquímics, histològics, genotoxicològics, testiculars i de l'esperma. La resta dels animals es van aparellar amb femelles receptives no tractades sexualment. El pes dels animals, el consum d'aigua i menjar i aspectes generals de salut van ser supervisats durant tot l'experiment.

Paràmetres hormonals, hematològics i bioquímics.

La LH i FSH de rata es van determinar per RIA [¹²⁵I] heterogeni de doble anticòs amb separació magnètica (Amersham Biosciences). La testosterona es va determinar per immunoassaig de micropartícules quimioluminiscent (Abbot Diagnostics). Es van utilitzar els procediments estàndard de laboratori clínic per a la determinació de paràmetres hematològics i de bioquímica sèrica.

Tests de genotoxicitat

El Test de micronuclis es va realitzar en eritròcits circulants seguint la guia OECD 474 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. El test Comet es va realitzar en espermatozoides de l'epidídim seguint el protocol de Haines *et al.*, 2002 modificat.

Histopatologia de testicles i epidídims.

Els testicles i epidídims drets es van fixar en Bouin, es van incloure en parafina, es van tallar a 5 µm de gruix i es van tenyir amb hematoxilina-eosina.

Paràmetres testiculars i de l'esperma

Es va avaluar la mobilitat de l'esperma seguint el mètode i el sistema de puntuació de Blazak *et al.* (1985), i la morfologia segons Wyrobek i Bruce, 1975. Per a la quantificació d'espermatozoides i espermàtides es van seguir els protocols descrits a Robb *et al.* (1978) i Llobet *et al.* (1993).

Taula 1. Efectes de l'exposició crònica a MDMA en el consum d'aigua i menjar i en el pes final

	MDMA mg/kg			
	Control	0,5	5	10
Consum d'aigua (ml/dia)	25,6 ± 2,9	26,5 ± 1,9	29,3 ± 1,9**	33,9 ± 1,5**
Consum de menjar (g/dia)	20,5 ± 0,7	19,9 ± 0,4	20,5 ± 0,6	22,3 ± 0,5**
Increment de pes corporal (g)	253,5 ± 22,5	242,8 ± 25,0	247,4 ± 26,4	270,2 ± 32,1
Pes corporal final (g)	394,9 ± 25,6	383,2 ± 24,6	386,9 ± 26,1	417,3 ± 32,7

** $p < 0,01$ **Taula 2.** Absència de tendència relacionada amb la dosi en els efectes en la LH, FSH i testosterona

	MDMA mg/kg			
	Control	0,5	5	10
LH (ng/ml)	0,63 ± 0,29	1,04 ± 0,22**	0,51 ± 0,33	0,84 ± 0,32
FSH (ng/ml)	7,65 ± 1,64	8,04 ± 0,93	7,95 ± 1,71	9,05 ± 1,51
Testosterona (ng/ml)	5,47 ± 4,10	3,29 ± 1,27	5,82 ± 3,96	4,52 ± 2,97

** $p < 0,01$ **Taula 3.** Efectes de l'exposició crònica a MDMA en el pes de testicles i epidídim i en paràmetres funcionals

	MDMA mg/kg			
	Control	0,5	5	10
Pes testicle (g)	1,89 ± 0,14	1,84 ± 0,16	1,91 ± 0,10	1,91 ± 0,17
Pes epidídim (g)	0,69 ± 0,06	0,66 ± 0,06	0,70 ± 0,05	0,65 ± 0,05
% d'espermatozoides mòbils	61,7 ± 13,6	67,3 ± 9,3	66,7 ± 11,1	66,6 ± 6,3
% d'espermatozoides anormals	1,7 ± 1,4	0,8 ± 0,9	1,2 ± 0,6	1,8 ± 1,0
Nre. d'espermatozoides ($\times 10^7 \text{ g}^{-1}$)				
per epidídim	47,36 ± 8,05	50,91 ± 17,85	64,93 ± 26,16 *	71,75 ± 21,68 *
per g d'epidídim	21,96 ± 4,47	29,50 ± 9,20 *	31,68 ± 12,10 *	32,98 ± 11,02 *
Nre. d'espermàtides ($\times 10^7 \text{ g}^{-1}$)				
per testicle	31,43 ± 5,46	29,50 ± 3,41	24,84 ± 2,76 **	35,02 ± 4,91
per g de testicle	16,65 ± 2,59	16,05 ± 1,90	13,01 ± 1,30 **	18,31 ± 1,84

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Índexs d'aparellament i embaràs

Deu animals per grup es van ajuntar amb femelles no tractades, sexualment receptives, durant una nit (1:1). L'aparellament es va confirmar per frotis vaginal. Per obtenir l'índex d'embaràs les femelles van ser sacrificades el dia 14 de gestació.

Anàlisi estadística

L'homogeneïtat de les variàncies de les variables contínues es va avaluar amb el test de Bartlett. La comparació estadística dels paràmetres homogenis es va fer utilitzant l'anàlisi de la variància (ANOVA) i el test de Duncan. La comparació estadística dels paràmetres no homogenis es va fer utilitzant el test de Kruskal Wallis. Les variables categòri-

ques es van analitzar mitjançant el test exacte de Fisher.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

La present administració a llarg termini de MDMA va produir pocs efectes en els principals marcadors de salut generals. Els paràmetres hematològics i bioquímics i el pes corporal i dels òrgans eren normals i no es van observar diferències significatives entre grups. L'augment en el consum d'aigua observat en les dosis mitjana i alta és un efecte ben conegut (Campbell i Rosner, 2008) (vegeu la taula 1).

Les concentracions hormonals no van mostrar cap tendència relacionada amb la dosi (vegeu la taula 2). Això suggereix que l'administració crònica de MDMA no produeix efectes a llarg termini en l'eix

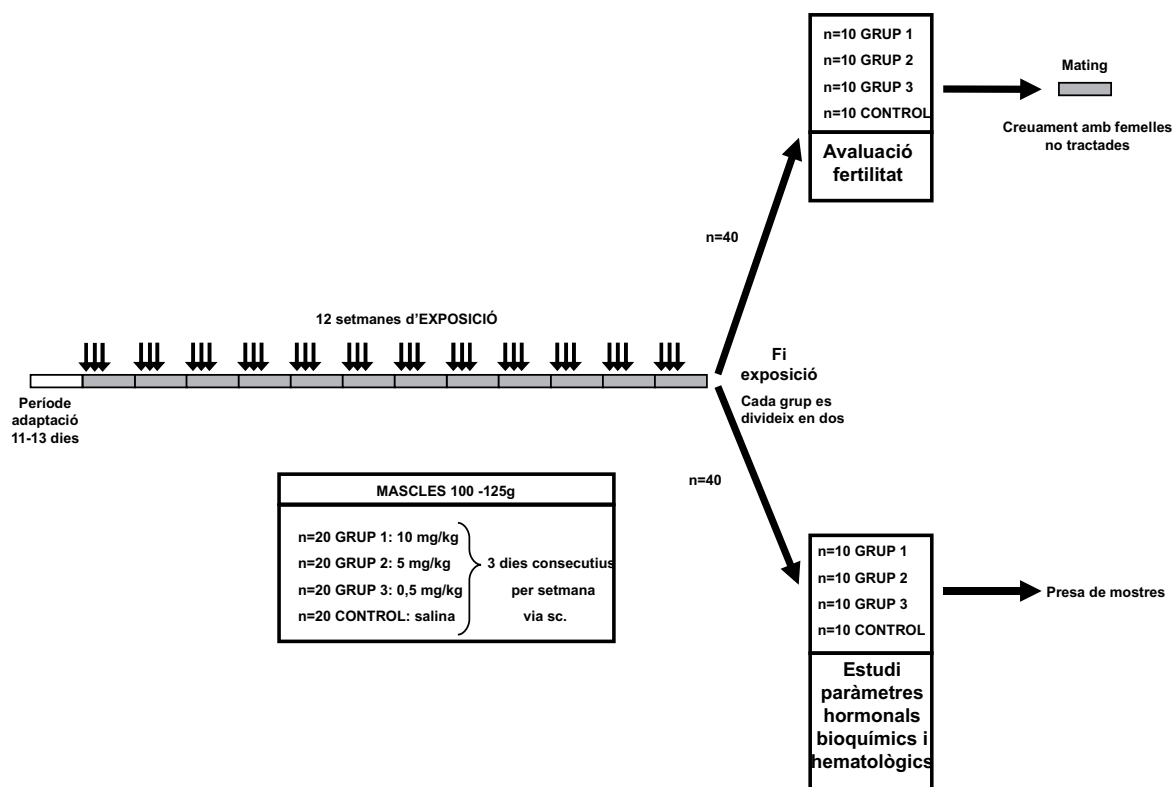


Figura 1. Estructura experimental: es va administrar MDMA SC (0,5 mg/kg, 5 mg/kg o 10 mg/kg) o solució salina a animals mascles durant 12 setmanes, tres dies consecutius per setmana.

hipotàlem-hipòfisi-gònada. Aquest resultat és oposat a les conclusions d'una publicació recent (Dickerson *et al.*, 2008). Tot i així, els autors d'aquesta publicació trobaven diferències significatives en els valors de GnRH mRNA hipotalàmic i testosterona només

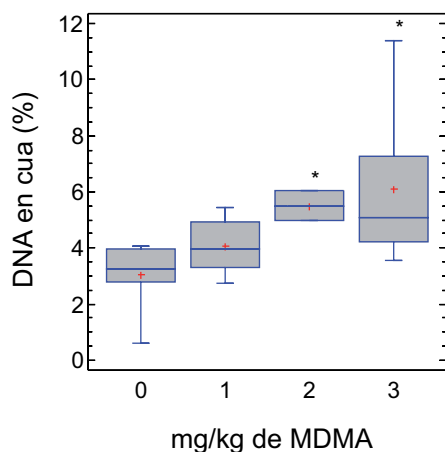


Figura 2. Test Comet: efecte genotòxic de l'exposició a MDMA en espermatozoides. Resultats expressats com a % de DNA a la cua. * $p < 0,05$.

quan barrejaven els resultats d'experiments amb exposició aguda i crònica.

El test de micronuclis no va indicar efecte clastogènic en eritròcits perifèrics, però el test Comet en espermatozoides de l'epidídim mostrava un increment del dany en el DNA relacionat amb la dosi (vegeu la figura 2). Aquestes diferències podrien ser originades per diverses raons: més sensibilitat del test Comet, diferent susceptibilitat dels dos tipus cel·lulars, diferent metabolisme de la MDMA o susceptibilitat del DNA dels espermatozoides a l'estrès per calor associat a la hipertèrmia induïda per la MDMA.

L'estudi histològic dels testicles del grup control va mostrar una espermatogènesi normal sense degeneració tubular. Al cap de 12 setmanes d'exposició, es va observar degeneració tubular en tots els grups tractats i edema intersticial en els grups de 5 mg/kg i 10 mg/kg (vegeu la figura 3). La degeneració tubular decreixia amb la dosi, mentre que l'edema intersticial augmentava (vegeu la figura 4). Els epidídim eren normals en tots els grups i plens d'espermatozoides madurs.

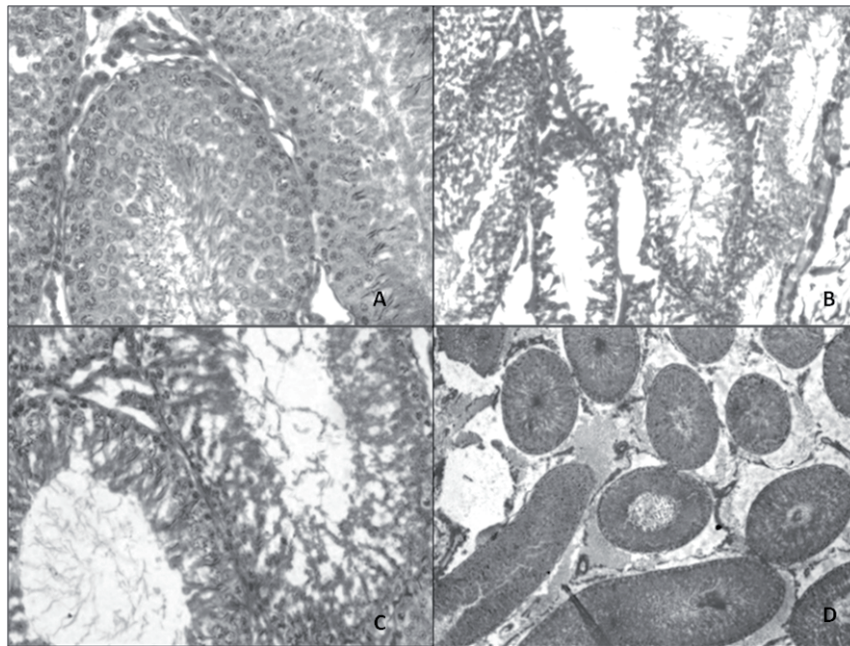


Figura 3. Imatges de la histologia dels testicles. A) Control; túbuls seminífers i interstici normals. B) Dosi baixa; degeneració tubular amb marcada depleció de l'epiteli germinal. C) Dosi baixa: degeneració tubular, detall. D) Dosi alta; edema intersticial.

L'exposició a MDMA no va afectar la mobilitat i morfologia dels espermatozoides. Hi va haver un augment significatiu en la quantificació d'espermatozoides en tots els grups i una disminució significativa en la quantificació d'espermàtides en el grup de 5 mg/kg (vegeu la taula 3).

La rellevància dels resultats presentats podria ser

limitada pel fet que els índexs d'aparellament i d'embaràs mostren que la fertilitat dels animals no estava compromesa. Atès que els humans presenten una fertilitat relativament més baixa i, en general, una major sensibilitat, es podria presentar un risc més elevat, a partir de tòxics, per a la funció reproductora, que en animals comuns de laboratori

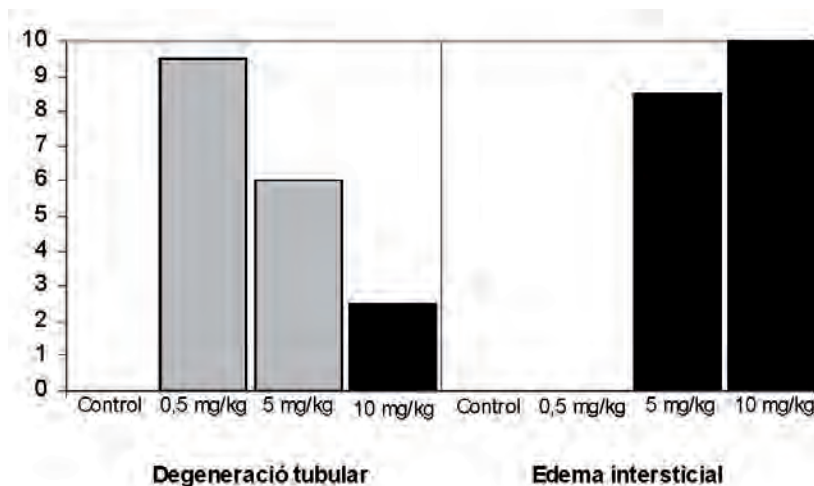


Figura 4. Examen histològic. Semiquantificació dels signes patològics observats en els testicles del control i els altres grups tractats. El dany per cada caràcter individual està representat per una variable discontinua (assignada subjectivament a una classe). L'eix de les y representa la suma del producte de les freqüències de cada classe per un coeficient relacionat amb la intensitat del dany.

(Working, 1988; Amann, 1986). A més, hi ha evidències que el dany genètic pot ser transmès via esperma a la descendència (Olsen *et al.*, 2005). Fins i tot amb nivells significatius de dany al DNA, els espermatozoides mantenen la capacitat de fertilitzar els oòcits; ara bé, el desenvolupament posterior pot ser alterat o donar lloc a la mort del zigot. Les implicacions subsegüents són avortaments primerencs, malformacions congènites i malalties, que inclouen càncer, en la descendència (Ahmadi i Ng, 1999; Zenzes *et al.*, 1999; Brinkworth, 2000). Són necessaris més estudis per avaluar si els efectes en els testicles són reversibles i quins són els mecanismes implicats. Els resultats del present treball adverteixen de l'interès de més investigacions en l'impacte de l'abús de la MDMA en la fertilitat de consumidors humans.

AGRAÏMENTS

Aquest estudi ha estat finançat per una beca FIS del Ministeri de Salut i Consum (PI061284). Agraïm l'assistència tècnica de Joan Serret i l'experta ajuda del Servei d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona.

BIBLIOGRAFIA

- AHMADI, A.; NG, S. C. (1999). «Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa». *J. Exp. Zool.*, 284: 696-704.
- AMANN, R. P. (1986). «Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals». *Environ. Health Perspect.*, 70: 149-158.
- BLAZAK, W. F.; ERNST, T. L.; STEWART, B. E. (1985). «Potential indicators of reproductive toxicity: testicular sperm production and epididymal sperm number, transit time, and motility in Fischer 344 rats». *Fundam. Appl. Toxicol.*, 5: 1097-1103.
- BRINKWORTH, M. H. (2000). «Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans». *Int. J. Androl.*, 23: 123-135.
- CAMPBELL, G. A.; ROSNER, M. H. (2008). «The agony of ecstasy: MDMA (3,4-methylenedioxyamphetamine) and the kidney». *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 3: 1852-1860.
- DICKERSON, S. M.; WALKER, D. M.; REVERON, M. E.; DUVAUCHELLE, C. L.; GORE, A. C. (2008). «The recreational drug ecstasy disrupts the hypothalamic-pituitary-gonadal reproductive axis in adult male rats». *Neuroendocrinology*, 88: 95-102.
- EMCDDA (2007). *Annual report 2007: the state of the drugs problem in Europe*. Luxemburg: Office for Official Publications of the European Communities.
- HAINES, G. A.; HENDRY, J. H.; DANIEL, C. P.; MORRIS, I. D. (2002). «Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation». *Biol. Reprod.*, 67: 854-861.
- LLOBET, J. M.; COLOMINA, M. T.; SIRVENT, J. J.; DOMINGO, J. L.; CORBELLA, J. (1993). «Reproductive toxicity evaluation of vanadium in male mice». *Toxicolog.*, 80: 199-206.
- OLSEN, A. K.; LINDEMAN, B.; WIGER, R.; DUALE, N.; BRUNBORG, G. (2005). «How do male germ cells handle DNA damage?» *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 207: 521-531.
- ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. (1978). «Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats». *J. Reprod. Fertil.*, 54: 103-107.
- WORKING, P. K. (1988). «Male reproductive toxicology: comparison of the human to animal models». *Environ. Health Perspect.*, 77: 37-44.
- WYROBEK, A. J.; BRUCE, W. R. (1975). «Chemical induction of sperm abnormalities in mice». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 4425-4429.
- ZENZES, M. T.; PUY, L. A.; BIELECKI, R.; REED, T. E. (1999). «Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in embryos from smoking couples: evidence for transmission by spermatozoa». *Mol. Hum. Reprod.*, 5: 125-131.

GENS I ISOFORMES DEL RECEPTOR DE KISSPEPTINA (KISS1R) EN VERTEBRATS

Alejandro S. Mechaly, Jordi Viñas i Francesc Piferrer

Departament de Recursos Marins Renovables, Institut de Ciències del Mar (CSIC).
Passeig Marítim, 37-49. 08003 Barcelona. piferrer@icm.csic.es.

Resum

Aquest treball se centra en la descripció del sistema de la kisspeptina i el seu receptor (KISS1R), ja que tenen una funció clau com a reguladors de l'inici de la pubertat en animals. Es descriu i es discuteix l'evolució dels gens i de les diferents isoformes del KISS1R trobades recentment. Aquests gens i isoformes són produïts per duplicacions gèniques o per mecanismes d'empalmament alternatiu dins d'un mateix gen. Finalment, es plantegen les possibles línies d'investigació sobre el sistema i es mencionen els possibles factors de transcripció que poden formar part del mecanisme regulador de KISS1R.

Paraules clau: pubertat, KISS1R, kisspeptina, duplicació gènica, empalmament alternatiu.

Abstract

This review focalizes on the kisspeptin and its receptor (KISS1R) because their relationship with the regulation of the initiation of puberty in animals. The evolution of the genes and isoforms of KISS1R is discussed. These different genes and isoforms are originated by gene duplication and by alternative splicing mechanisms. Finally, we present possible research avenues in the field of the kisspeptin-KISS1R system and introduce some transcription factors that appear to be involved in the regulation of KISS1R.

Key words: puberty, KISS1R, kisspeptin, gene duplication, alternative splicing.

INTRODUCCIÓ GENERAL

La pubertat és el procés de l'adquisició de la capacitat reproductiva d'un individu immadur i afecta tant els humans com tota la resta dels vertebrats (Dufour i Rousseau, 2007). Aquest procés comporta un control endocrí amb una acció seqüencial de diverses hormones que es produeixen al cervell i que tenen el seu efecte final a les gònades (Roux *et al.*, 2003). En vertebrats, el mecanisme comença a l'hipotàlem amb la secreció de l'hormona alliberadora de gonadotrofines (GnRH), que estimula la hipòfisi o pituitària i que, al seu torn, allibera dues hormones missatgeres, les gonadotrofines (GTH): l'hormona fol·liculoestimulant (FSH) i l'hormona luteïnitzant (LH). Les gonadotrofines circulen pel sistema vascular fins a les gònades, on una vegada s'ha rebut el senyal a través dels seus receptors específics comencen a madurar. En aquest procés de maduració els esteroides sexuals tenen un paper molt important (Funes *et al.*, 2003). En els invertebrats, i malgrat que no tenen un cervell pròpiament dit, l'acció seqüencial de les hormones és molt similar al descrit en els vertebrats (Burke *et*

al., 2006). Fins a finals del segle passat, les GnRH i els seus receptors (GnRHR) van ser considerats com l'escaló superior de l'eix reproductor i, per tant, un factor clau en el seu control. En els últims anys, però, nombrosos estudis genètics i moleculars han descrit un nou sistema, la kisspeptina-KISS1R, el qual controla l'alliberament de les GnRH, per la qual cosa s'ha assignat com a principal regulador del control neuroendocrí de la reproducció i, més concretament, de l'inici de la pubertat (Seminara *et al.*, 2005). En vertebrats, el procés hormonal té el seu inici a partir d'un pèptid, la kisspeptina, i de l'activació del seu receptor, el KISS1R (Seminara *et al.*, 2003). En invertebrats, malgrat que encara no ha estat identificat el lligand que activa el procés, se sospita de la seva existència, a causa de la presència de dos receptors de kisspeptina en un equinoderm, l'erizó de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) (Rosegui *et al.*, 2006). Pel que fa al sistema GnRH/GnRHR, està molt més estudiat i és present en tots els vertebrats (Kah *et al.*, 2007) i invertebrats (Tsai, 2006). També, les GTH/GTHR dels vertebrats tenen les seves hormones homòlogues a les dels invertebrats,

les GSS/GSSR (Mita *et al.*, 2007) (vegeu la figura 1).

Finalment, el descobriment de nombroses formes i isoformes del KISS1R i la publicació de diversos treballs que relacionen el sistema amb altres funcions, com l'acció vasoconstrictora (Mead *et al.*, 2007), la secreció d'insulina (Haugue-Evans *et al.*, 2006) i el càncer (Ohtaki *et al.*, 2003) entre d'altres, han obert un important camp d'investigació. En aquest estudi ens centrarem en el KISS1R, en què recentment s'han descobert fins a tres gens i dues isoformes que poden ajudar a esclarir la diversitat de funcions del sistema kisspeptina-KISSR.

DUPLICACIÓ GÈNICA DEL RECEPTOR DE KISSPEPTINA (KISS1R) EN EL REGNE ANIMAL

La duplicació gènica es considera un dels principals motors de l'evolució, i permet la diversitat biològica i la creació de noves funcions amb gens ja existents.

El gen de la KISS1R no sembla una excepció, i recentment se n'han detectat duplicacions en nombroses espècies, tot i que encara es desconeix l'origen d'aquestes duplicacions (Lee *et al.*, 2009). La primera duplicació s'observa ja en invertebrats (1D), concretament en l'eriçó de mar, el qual presenta dos gens paral·lels. Una segona duplicació (2D) es produeix en vertebrats, en el grup dels peixos teleostis, en què s'originen dos gens paral·lels addicionals del *KISS1R-1*, el *KISS1R-1a*, que aparentment evoluciona envers els gens que després es troben en mamífers, però que possiblement es perd en teleostis, i un segon gen, el *KISS1R-1b*, també present en amfibis. Finalment, en peixos s'observa una tercera duplicació (3D), que origina dos gens, el *KISS1R-2a* i el *KISS1R-2b* (el primer es creu que està actualment extingit). Les relacions d'homologia dels gens del KISS1R en amfibis són les més complexes, amb tres gens diferents, dos gens originats a partir de la duplicació 2D i un tercer a partir de la duplicació 3D (vegeu la figura 2).

MECANISMES DE CONTROL DE L'EXPRESSIÓ EN EL KISS1R EN VERTEBRATS

L'empalmament alternatiu és el mecanisme pel qual a partir d'un transcrit primari de mRNA s'originen diverses variants de mRNA madures conseqüència de les diferents combinacions dels exons gènics. Aquest procés és clau en la regulació gènica i la diversificació de funcions d'un mateix gen (Izquierdo i Valcarcel, 2006). En un treball realitzat en el nostre laboratori s'han detectat, per primera vegada en vertebrats, dues isoformes de KISS1R en un peix teleosti, el llenguado senegalès (*Solea senegalensis*) (Mechaly *et al.*, 2009). En aquesta espècie, el mecanisme d'empalmament alternatiu es produeix per la retenció completa de l'intró 3, el qual provoca l'aparició de dos triplets d'aminoàcids amb un senyal d'aturada a dins de l'intró retingut. Aquest fet probablement genera la formació d'una proteïna truncada per a aquesta isoforma. A més, estudis d'expressió d'ambdues isoformes mostren un patró d'expressió diferent entre cervell i gònades. Mentre que els nivells d'expressió de la isoforma que no reté l'intró són més elevats al cervell en els diferents estadis i sexes, la isoforma que sí que reté l'intró té una expressió més alta en les gònades. D'altra banda, i basant-nos en les seqüències d'accés públic (GenBank NCBI), s'ha pogut observar un mecanisme d'empalmament alternatiu similar en l'ovella. En aquest dar-

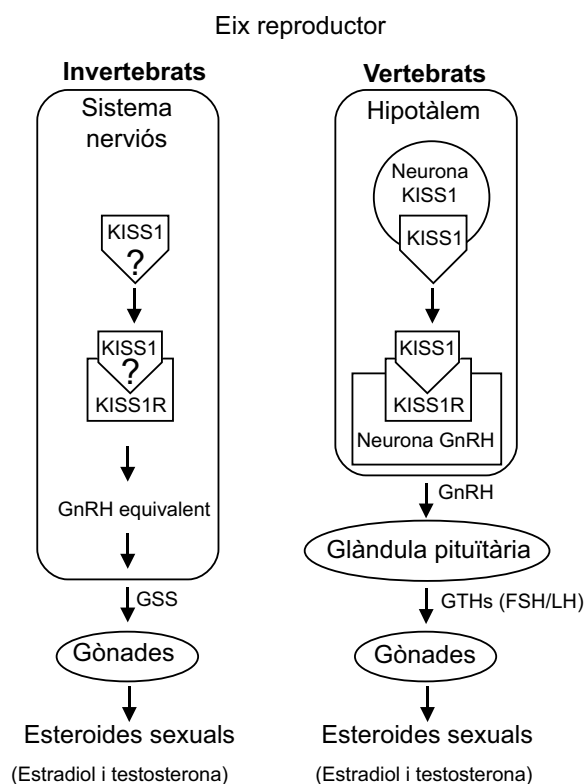


Figura 1. Esquema comparatiu de l'eix reproductor d'invertebrats i vertebrats. Kisspeptina (KISS1); receptor de kisspeptina (KISS1R); hormones alliberadores de gonadotrofines (GnRH); substància estimuladora de gònades (GSS); hormones gonadotrofines (GTH: LH, hormona luteïnitzant i FSH, hormona fol·liculoestimulant).

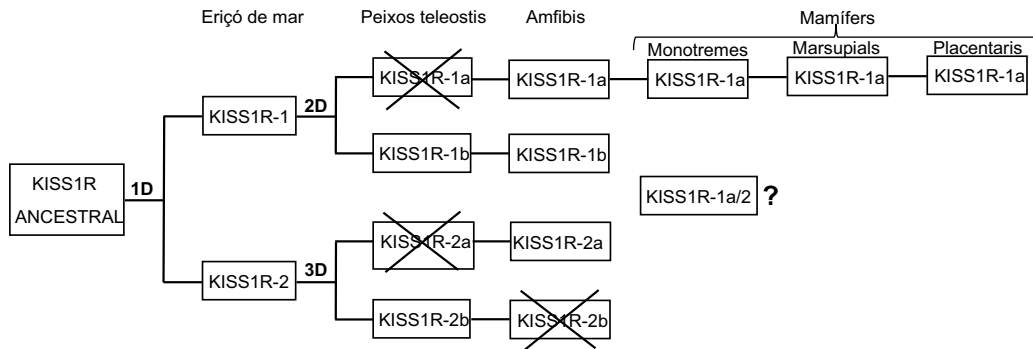


Figura 2. Proposta de la història evolutiva dels gens *KISS1R* originats a partir d'un gen ancestral comú. Duplicacions (D), modificacions i pèrdues de gens (modificat de Lee *et al.*, 2009).

rer cas, i a diferència del que passa en el llenguado senegalès, l'intró 1 és el que es reté. Finalment, s'ha observat en el ratolí un altre mecanisme d'empalmament alternatiu, provocat en aquest cas per una deleció de 51 aminoàcids, en què es perd el domini transmembranós 4 (TM4) i, per tant, possiblement la funció del receptor (vegeu la figura 3).

CONCLUSIÓ GENERAL I PERSPECTIVES

En els últims anys, s'han publicats nombrosos estudis sobre el sistema kisspeptina-KISS1R amb relació, principalment, al seu paper en la regulació de l'eix reproductiu. Existeixen gran quantitat d'espècies en què s'ha clonat, caracteritzat i localitzat el lligand i el receptor. Malgrat això, avui dia no existeix cap estudi dels promotors i dels mecanismes reguladors de la kisspeptina i el KISS1R. En un treball rea-

litzat en el nostre laboratori amb un peix teleostí com a model, l'halibut de l'Atlàntic (*Hippoglossus hippoglossus*), es va seqüenciar una regió de prop de 1000 bp del promotor, en què es va detectar la presència, entre d'altres, del factor de transcripció de la proteïna d'unió a l'octàmer (OCT1). Un factor de la mateixa família, l'OCT2, es va comprovar que té un paper fonamental en el control neuroendocrí de la pubertat en mamífers (Ojeda *et al.*, 1999). Aquesta observació obre moltes possibilitats de recerca en l'estudi del control de la pubertat. D'altra banda, estudis bioinformàtics han permès detectar en altres regions promotores de peixos (peix zebra, *fugu*, *pufferfish*, *medaka* i *stickleback*) la presència d'aquest factor (Mechaly *et al.*, dades no publicades).

En resum, s'ha descrit la presència d'un pèptid, la kisspeptina, i el seu receptor, KISS1R, en moltes espècies de vertebrats i almenys en un invertebrat, l'eriçó de mar. Ara bé, el control de la pubertat amb

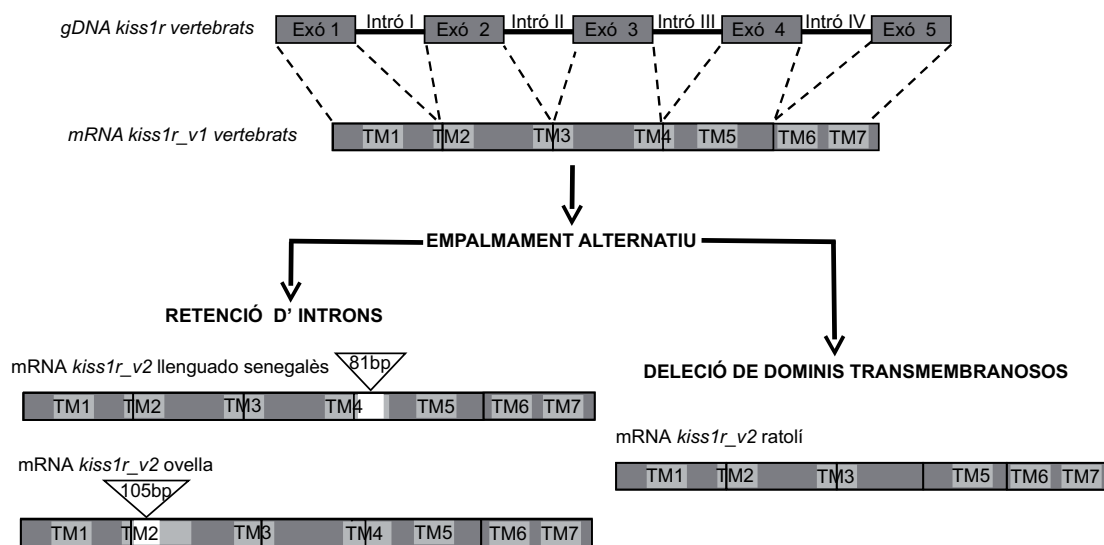


Figura 3. Model esquemàtic dels diferents tipus de mecanismes d'empalmament alternatiu del receptor de kisspeptina (KISS1R) detectats en vertebrats.

el sistema kisspeptina-KISS1R en els vertebrats implica una combinació de diferents gens i isoformes. Això implica que el control de la pubertat en animals pot ser més complex del que inicialment es preveia. Així, en una mateixa espècie l'inici de la pubertat pot estar controlada per més d'un gen, amb les seves corresponents isoformes. Aquest fet també explicaria l'acció pleotròpica del sistema kisspeptina-KISS1R, amb acció en moltes funcions fisiològiques. Queda clar que el sistema kisspeptina-KISS1R seguirà sent, de ben segur, objecte d'una intensa activitat de recerca arreu del món en els propers anys.

BIBLIOGRAFIA

- BURKE, R. D.; ANGERER, L. M.; ELPHICK, M. R.; HUMPHREY, G. W.; YAGUCHI, S.; KIYAMA, T.; LIANG, S.; MU, X.; AGCA, C.; KLEIN, W. H.; BRANDHORST, B. P.; ROWE, M.; WILSON, K.; CHURCHER, A. M.; TAYLOR, J. S.; CHEN, N.; MURRAY, G.; WANG, D.; MELLOTT, D.; OLINSKI, R.; HALLBOOK, F.; THORNDYKE, M. C. (2006). «A genomic view of the sea urchin nervous system». *Dev. Biol.*, 300: 434-460.
- DUFOUR, S.; ROUSSEAU, K. (2007). «Neuroendocrinology of fish metamorphosis and puberty: Evolutionary and ecophysiological. evolutionary and ecophysiological perspectives». *J. Marine Sci. Technol.*, 15: 55-68.
- 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 regulation of gonadotropin secretion in the mouse». *Endocrinology*, 145: 4073-4077.
- HAUGE-EVANS, A. C.; RICHARDSON, C. C.; MILNE, H. M.; CHRISTIE, M. R.; PERSAUD, S. J.; JONES, P. M. (2006). «A role for kisspeptin in islet function». *Diabetologia*, 49: 2131-2135.
- IZQUIERDO, J. M.; VALCÁRCEL, J. (2006). «A simple principle to explain the evolution of pre-mRNA splicing». *Genes Dev.*, 20: 1679-1684.
- KAH, O.; LETHIMONIER, C.; SOMOZA, G.; GUILGUR, L. G.; VAILLANT, C.; LAREYRE, J. J. (2006). «GnRH and GnRH receptors in metazoa: A historical, comparative, and evolutive perspective». *Gen. Comp. Endocrinol.*, 153: 346-364.
- LEE, Y. R.; TSUNEKAWA, K.; MOON, M. J.; UM, H. N.; HWANG, J. I.; OSUGI, T.; OTAKI, N.; SUNAKAWA, Y.; KIM, K.; VAUDRY, H.; KWON, H. B.; SEONG, J. Y.; TSUTSUI, K. (2009). «Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates». *Endocrinology*. [En premsa]
- MEAD, E. J.; MAGUIRE, J. J.; KUC, R. E.; DAVENPORT, A. P. (2007). «Kisspeptins are novel potent vasoconstrictors in humans, with a discrete localization of their receptor, G protein-coupled receptor 54, to atherosclerosis-prone vessels». *Endocrinology*, 148: 140-147.
- MECHALY, A. S.; VIÑAS, J.; PIFERRER, F. (2009). «Identification of two isoforms of the kisspeptin-1 receptor (kiss1r) generated by alternative splicing in a modern teleost, the Senegalese sole (*Solea senegalensis*)». *Biol. Reprod.*, 80: 60-69.
- MITA, M.; YAMAMOTO, K.; YOSHIKUNI, M.; OHNO, K.; NAGAHAMA, Y. (2007). «Preliminary study on the receptor of gonad-stimulating substance (GSS) as a gonadotropin of starfish». *Gen. Comp. Endocrinol.*, 153: 299-301.
- 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.; FUJINO, M. (2001). «Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor». *Nature*, 411: 613-617.
- OJEDA, S. R.; HILL, J.; HILL, D. F.; COSTA, M. E.; TAPIA, V.; CORNEA, A.; YING, J. M. A. (1999). «The Oct-2 POU domain gene in the neuroendocrine brain: A transcriptional regulator of mammalian puberty». *Endocrinology*, 140: 3774-3789.
- ROA, J.; VIGO, E.; CASTELLANO, J. M.; NAVARRO, V. M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; CASANUEVA, F. F.; DIEGUEZ, C.; AGUILAR, E.; PINILLA, L.; TENASEMPERE, M. (2006). «Hypothalamic expression of KiSS-1 system and gonadotropin-releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female rat». *Endocrinology*, 147: 2864-2878.
- ROUX, N. DE; 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.
- SEMINARA, S. B.; KAISER, U. B. (2005). «New gatekeepers of reproduction: GPR54 and its cognate ligand, KiSS-1». *Endocrinology*, 146: 1686-1688.
- SEMINARA, S. B.; MESSENGER, 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.
- TSAI, P. S. (2006). «Gonadotropin-releasing hormone in invertebrates: Structure, function, and evolution». *Gen. Comp. Endocrinol.*, 148: 48-53.

AÏLLAMENT DEL NUCLI D'ESPERMATOZOIDES HUMANS I ANÀLISI DEL SEU PROTEOMA

Sara de Mateo,¹ Josep Maria Estanyol,² José Luís Ballecà³ i Rafael Oliva¹

¹ Laboratori de Genètica Humana, IDIBAPS, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona; Hospital Clínic. Casanova, 143. 08036 Barcelona. roliva@ub.edu.

² Unitat de Proteòmica, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

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

Resum

Recents estudis publicats pel nostre laboratori van descriure parcialment el proteoma de l'espermatozoide humà gràcies a la tècnica de gels 2D i l'anàlisi MALDI-TOF MS. En aquests estudis es van trobar diverses proteïnes nuclears, com són factors de transcripció, que podrien indicar que l'espermatozoide també té el potencial de proporcionar aquestes proteïnes a l'oòcit. Aquest treball s'ha enfocat en la descripció del proteoma nuclear de caps aïllats d'espermatozoides humans. Hem obtingut caps d'espermatozoides segons dues metodologies diferents: sonicació i tractament amb CTAB. Ambdues metodologies són convenients per a l'obtenció de caps d'espermatozoides. Tanmateix, l'eficàcia del tractament amb CTAB és més alta que amb sonicació. Hem aconseguit així el 100 % de caps sense cap fragment de cua connectat a través de l'estratègia del CTAB, i la seva puresa s'ha provat amb microscòpia electrònica. Una vegada els caps d'espermatozoides humans van ser aïllats, les seves proteïnes nuclears van ser extretes i analitzades per espectrometria de masses. La identificació de diversos tipus diferents d'histones no ens va sorprendre, ja que més del 15 % del DNA dels espermatozoides es troba empaquetat amb histones i el 85 % amb protamines. Altres proteïnes també van ser identificades i localitzades al nucli de l'espermatozoide per primera vegada en el model humà. Per tant, serà interessant aclarir la funció d'aquestes proteïnes en l'espermatozoide humà madur i explorar el seu paper potencial en el procés de fertilització.

Paraules clau: proteòmica, sonicació, CTAB, espectrometria de masses.

Abstract

Previous recent studies in our laboratory have contributed with the identification of the whole human sperm proteome using a 2D approach followed by MALDI-TOF MS analysis. Several nuclear proteins, some potentially involved in transcription, were detected indicating that the sperm cell also has the potential to deliver these proteins to the oocyte. In the present work we have focused in the sperm nuclear proteomic identification using isolated human sperm heads. We have isolated sperm heads using two different methodologies, sonication and CTAB treatment. Both methodologies were suitable to obtain sperm heads, however, efficiency of CTAB treatment was higher than sonication. Nearly 100% of heads without any tail fragments attached to them were obtained by CTAB and their purity was also tested by electron microscopy. Once human sperm heads were isolated, nuclear sperm proteins were separated by 2D, excised from the gels and analyzed with mass spectrometry. The identification of several different types of histones was expected as approximately 15% of sperm DNA is known to be compacted by histones and 85% by protamines. However several additional proteins were also identified for the first time, and hence, localized in sperm nucleus. Therefore, it will be interesting to find out the function of these proteins in mature spermatozoa and to explore its potential role in the subsequent fertilization process.

Key words: proteomics, sonication, CTAB, mass spectrometry.

INTRODUCCIÓ I METODOLOGIA

L'espermatozoide humà és una cèl·lula molt accessible que es pot purificar i estudiar fàcilment. Recentment s'han publicat articles en què es descriuen a gran escala la composició proteica d'aquests esper-

matozoides gràcies a la tecnologia d'espectrometria de masses (Baker *et al.*, 2007; Oliva *et al.*, 2009). El nostre laboratori també ha col·laborat en la descripció proteòmica de l'espermatozoide humà gràcies a la tècnica de gels bidimensionals i l'anàlisi MALDI-TOF MS (Martínez-Heredia *et al.*, 2006, Mateo *et*

al., 2007). En aquest treball es van trobar diverses proteïnes involucrades en transcripció i d'altres processos nuclear, i això indica que l'espermatozoide podria tenir també el potencial de proporcionar aquestes proteïnes a l'oòcit per al desenvolupament zigòtic. L'estudi que es presenta aquí es troba enfocant en l'aïllament de caps d'espermatozoide humà mitjançant dues metodologies diferents: la sonicació i el tractament amb CTAB (vegeu la figura 1). Posteriorment s'intenta descriure el proteoma nuclear gràcies a l'espectrometria de masses.

Sonicació

Les mostres amb un alt comptatge ($> 200 \times 10^6$ espermatozoides totals) van ser sonicades uns minuts en gel i es va fer un seguiment de l'eliminació de les

cues amb el microscopi òptic. Les mostres van ser sonicades fins que almenys un 80 % de les cèl·lules espermàtiques no presentaven visiblement cap tros de cua adherida. Seguidament, un gradient de densitat consistent en un primer coixí de 0,40 mg/ml CsCl, un segon coixí de sacarosa 2 M i finalment el sonicat sobre aquests dos coixins, va ser ultracentrifugat a 100.000 g uns 45 min. El sediment es va resuspendre en 50 mM Tris pH 7,4 (Sotolongo *et al.*, 2005).

Tractament amb CTAB

Les mostres que també presentaven un alt comptatge, prèviament netejades, van ser incubades amb 1 % CTAB a 4 °C uns 30 min i els caps espermàtics van ser obtinguts després de diversos rentats i centri-

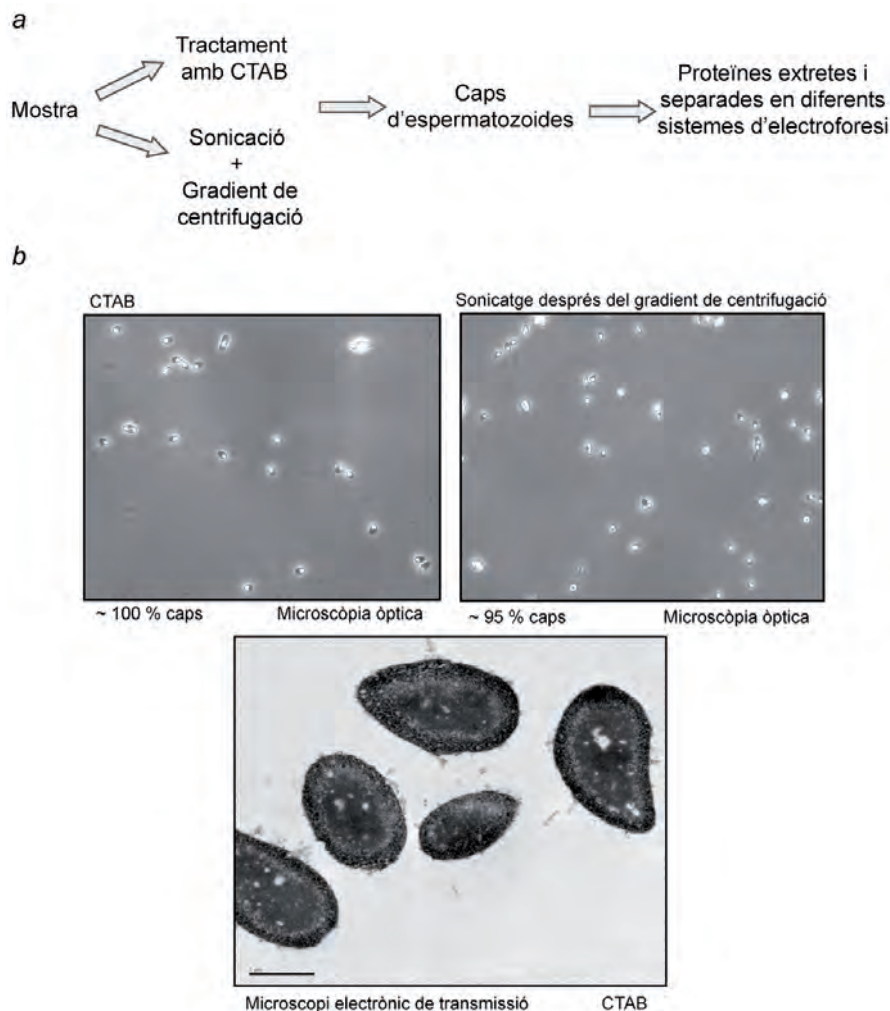


Figura 1. Aïllament de caps d'espermatozoides humans. *a)* Protocol d'aïllament de caps, extracció i separació de proteïnes nuclears. *b)* Imatges de caps d'espermatozoide, amb microscòpia òptica i electrònica.

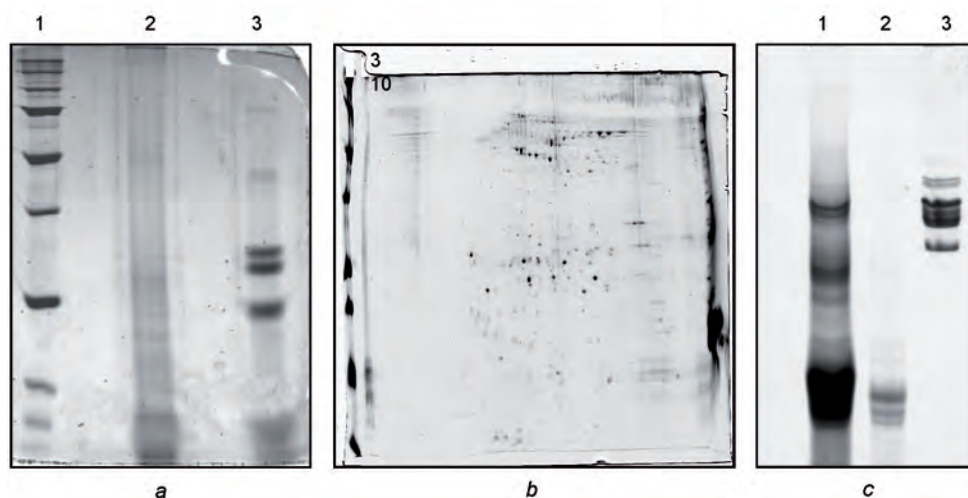


Figura 2. Proteïnes nuclears de caps d'espermatozoide d'humà. *a)* Gel monodimensional SDS-PAGE; carril 1, estàndard de pes molecular; carril 2, mostra; carril 3, estàndard d'histones. *b)* Gel bidimensional amb tires de 17 cm i pH de 3-10 (BioRad). *c)* Gel àcid; carril 1, mostra; carril 2, estàndard de protamines; carril 3, estàndard d'histones.

fugacions suplementats amb 0,05 % de digitonina per minimitzar l'agrupació dels nuclis (Wykes i Krawetz, 2003).

Gels bidimensionals, SDS-PAGE i àcids per a la identificació de proteïnes

Una vegada els caps d'espermatozoide humà van ser aïllats, les proteïnes nuclears van ser extretes i separades amb electroforesi monodimensional SDS-PAGE, gels bidimensionals segons Mateo *et al.* (2007) i gels àcids segons Mateo *et al.* (2008). Els *spots*-bandes d'aquests gels (vegeu la figura 2) van ser escindits i identificats amb espectrometria de masses (MALDI-TOF o MS/MS), tal com es descriu a Martínez-Heredia *et al.* (2006).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Tant la sonicació com el tractament amb CTAB van ser adequats per obtenir caps d'espermatozoides humans aïllats, sense cap tros de cua adherit. No obstant això, el tractament amb CTAB ofereix una eficiència major que la sonicació. Després del gradient de centrifugació de les mostres sonicades, al voltant del 90 % dels caps espermàtics sense cua van ser recuperats, però es van trobar diferents eficiències i el temps de sonicació necessari variava entre les mostres utilitzades. D'altra banda, quasi el 100 % de caps sense cap fragment de cua unit van ser detectats amb l'aïllament amb CTAB en totes les mostres ana-

litzades. La puresa dels caps obtinguts amb CTAB va ser també testejat amb el microscopi electrònic per assegurar-nos de no tenir cap tros de cua adherida que no poguéssim veure amb el microscopi òptic (vegeu la figura 1). La figura 2 mostra les proteïnes extretes dels caps espermàtics carregats a un gel monodimensional SDS-PAGE, a un gel bidimensional i a un gel monodimensional àcid. Els resultats preliminars d'identificació de proteïnes es van obtenir gràcies a l'escissió de *spots*/bandes dels gels, seguida de l'anàlisi d'aquests per espectrometria de masses. Diversos tipus d'histones i altres proteïnes addicionals van ser identificats. Altres estudis d'immunofluorescència estan sent realitzats per immunolocalitzar al cap de l'espermatozoide aquestes proteïnes noves i, per tant, per confirmar la seva localització nuclear.

Concloem, per tant, que la detecció d'histones no ens va sorprendre, ja que vora el 15 % del DNA dels espermatozoides està compactat per histones i el 85 % per protamines. La principal troballa nova és que altres proteïnes han estat també identificades i, per tant, localitzades en el nucli espermàtic per primera vegada. Alguns d'aquests resultats es troben en concordança amb el fet que la formació del cap transcorre durant l'espermioogènesi gràcies a la natura d'algunes de les proteïnes identificades en aquest treball. Per tant, descobrir la funció d'aquestes proteïnes en l'espermatozoide madur i explorar el seu paper potencial en el procés de fertilització serà un tema important a estudiar (Oliva *et al.*, 2008, 2009).

AGRAÏMENTS

Subvencionat amb càrrec al projecte del Ministeri d'Educació i Ciència BFU2006-03479 i per fons europeus. S. de M. es troba subvencionada per una beca predoctoral de la Generalitat de Catalunya FI.

BIBLIOGRAFIA

- BAKER, M. A.; REEVES, G.; HETHERINGTON, L.; MÜLLER, J.; BAUR, I.; AITKEN, R. J. (2007). «Identification of gene products present in Triton X-100 soluble and insoluble fractions of human spermatozoa lysates using LC-MS/MS analysis». *Proteomic*, 1: 524-532.
- MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; ESTANYOL, J. M.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. (2006). «Proteomic identification of human sperm proteins». *Proteomics*, 6(15): 4356-4369.
- MATEO, S. DE; GÁZQUEZ, C.; GUIMERÀ, M.; BALASH, J.; MEISTRICH, M. L.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. (2008). «Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome». *Fertil. Steril.*, 91(3): 715-722.
- MATEO, S. DE; MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; ESTANYOL, J. M.; DOMÍNGUEZ-FANDOS, D.; VIDAL-TABOADA, J. M.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. (2007). «Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa». *Proteomics*, 7(23): 4264-4277.
- OLIVA, R.; MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; ESTANYOL, J. M. (2008). «Proteomics in the study of the sperm cell composition, differentiation and function». *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 54(1): 23-36.
- OLIVA, R.; MATEO, S. DE; ESTANYOL, J. M. (2009). «Sperm cell proteomics». *Proteomics*, 9(4): 1004-1017.
- SOTOLONGO, B.; HUANG, T. T.; ISENBERGER, E.; WARD, W. S. (2005). «An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments». *J. Androl.*, 26(2): 272-280.
- WYKES, S. M.; KRAWETZ, S. A. (2003). «The structural organization of sperm chromatin». *J. Biol. Chem.*, 278(32): 29471-29477.

ESTUDI MUTACIONAL DEL GEN *HSPA2* EN PACIENTS INFÈRTILS I EN CONTROLS

Rubén Azpiazu,¹ Meritxell Jodar,¹ Jordi Cámara,¹ Josep Oriola,¹ José Luís Ballecà²
i Rafael Oliva¹

¹ Grup de Genètica Humana, IDIBAPS, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona; Hospital Clínic. Casanova, 143. 08036 Barcelona. roliva@ub.edu.

² Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia, Hospital Clínic i Provincial.

Resum

Les proteïnes de xoc tèrmic HSP són xaperones moleculars que assisteixen altres proteïnes en el seu plegament i transport. Les proteïnes HSPA2 són un tipus específic que s'expressa especialment en les cèl·lules espermatogèniques. Tenen diverses funcions conegudes: són essencials per al procés meiótic, s'associen al complex sinaptonemal, es relacionen amb la inhibició apoptòtica i amb la transició nucli-histona nucli-protamina. D'acord amb les troballes descrites en ratolins genoanul·lats per a HSPA2 (Zhu *et al.*, 1997), en què s'observava que ratolins masculins eren infèrtils amb parada madurativa en l'estadi d'espermatòcits primaris, i dels resultats proteòmics previs del nostre grup, que van trobar un augment significatiu de la HSPA2 en pacients amb major lesió germinal determinada per TUNEL i en pacients astenozoospermics (Mateo *et al.*, 2007), hem iniciat un estudi mutacional del gen corresponent en pacients infèrtils. S'han inclòs 10 pacients azoospermics amb aturada madurativa, 10 pacients oligoastenoteratozoospermics severes, 10 pacients teratozoospermics i 10 controls d'individus amb fertilitat provada. Mitjançant el disseny de primers específics hem aconseguit amplificar i seqüenciar de manera específica el gen de la HSPA2, discriminant pseudogens i gens homòlegs de la família de la HSP. Fins avui hem trobat dues SNP i cap mutació patogènica.

Paraules clau: HSPA2, aturada madurativa, azoospermia, oligoastenoteratozoospermia severa, teratozoospermia, polimorfisme, mutació.

Abstract

The heat shock proteins HSP are molecular chaperones that assist other proteins in their folding and transport. HSPA2 proteins are a specific type that are specifically expressed in spermatogenic cells. They have several known functions: they are essential for the meiotic process, are associated with the synaptonemal complex, and are related to the apoptotic inhibition and with the nucleus-histone to nucleus-protamine transition. Based on the findings described in knock-out mice for HSPA2, where it was observed that male mice were infertile with maturation arrest in the primary spermatocyte stage, the previous proteomic results of our group where it was detected a significant increase of the HSPA2 in patients with lower DNA integrity as determined by TUNEL and in asthenozoospermic patients (Mateo *et al.*, 2007, *Proteomics*, 7: 4264-4277), we have initiated a mutational study of the corresponding gene in infertile patients. We have included 10 azoospermic patients with maturation arrest, 10 severe oligoasthenoteratozoospermic patients, 10 teratozoospermic patients, and 10 controls with proven fertility. Through the design of specific primers we have amplified and sequenced the *HSPA2* gene specifically, distinguishing from pseudogenes and homologous genes of the HSP family. So far we have found two SNPs but no pathogenic mutation.

Key words: HSPA2, maturation stop, azoospermia, teratozoospermia, severe oligoasthenoteratozoospermia, polymorphism, mutation.

INTRODUCCIÓ

S'estima que al voltant d'un 15 % de parelles presenten una fertilitat reduïda i la infertilitat masculina és responsable de la meitat dels casos (OMS, 1999). Tanmateix, la majoria de causes d'infertilitat mascu-

lina encara es desconeixen. D'aquí la importància de conèixer el proteoma de l'espermatozoide i, en conseqüència, els gens candidats a analitzar. Un d'aquests gens és el de la proteïna HSPA2, que s'expressa i té un paper important en l'espermatogènesi (Govin *et al.*, 2006). Aquesta proteïna també ha estat

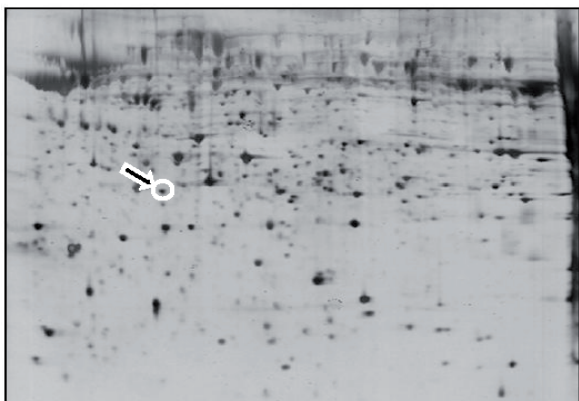


Figura 1. Detecció de la proteïna HSPA2 (noteu la sargeta) en bidimensionals formant part dels estudis proteòmics realitzats en el nostre grup i detectada mitjançant espectrometria de masses.

detectada com a alterada en pacients infèrtils en projectes recents en el nostre grup (Oliva *et al.*, 2008, 2009; Mateo *et al.*, 2007; vegeu la figura 1). Per tant, en aquest treball ens hem plantejat l'estudi mutacional del gen corresponent a la recerca de possibles mutacions o polimorfismes potencialment associats a la infertilitat.

MATERIAL I MÈTODES

En aquest estudi es van incloure 10 mostres d'individus control (paternitat provada), 10 d'individus azo-

ospermics (amb bloqueig maduratiu determinat en biòpsia testicular), 10 mostres d'individus teratozoospermics i 10 mostres d'oligoastenoteratozoospermics. Partint de mostres d'ejaculació dels pacients teratozoospermics i oligoastenoteratozoospermics severes es van aïllar els espermatozoides mitjançant gradient de Percoll, i a continuació es va aïllar el seu DNA. El DNA de la resta de pacients es va aïllar a partir de mostres de sang perifèrica. Tots els pacients i controls van donar el consentiment informat.

El gen *HSPA2* s'amplifica per PCR mitjançant primers específics de la regió d'interès per seqüenciar-la posteriorment (vegeu la figura 2). Per a un procés correcte és necessari el tractament previ amb EXOSAP-IT, i la reacció de seqüenciació es realitza amb el kit de seqüenciació cíclica BigDye Terminator v3.1. El seqüenciador automàtic és el DNA 3100. Una vegada obtinguda la seqüència s'analitza mitjançant els programes CHROMAS i DNASTAR.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

En aquest treball s'ha posat a punt el mètode per a l'amplificació i estandardització de les condicions, així com els primers adequats, per amplificar per complet el gen *HSPA2*. La seqüència codificant està formada per un sol exó de 1920 pb i s'han utilitzat diferents combinacions de primers per poder amplificar-lo (vegeu la figura 2).

5'
 CTCGGCCTCCCAAGTGTGGGATTACAGCGTTAGCCACTGCGCCCGGCCAGCCAGGCAGTTTAAATCGAGCGCTCACAACTGAGACGCAGTGAAGCACCCACCATAAA
 ATCCCAGGAGGCCAGCCCGGTTACAGACTTTTCTTTTCTTAAATCCCGTCCAAGGATCCGCGCTCACCCCCACCCAGCCACCCCAATTCCCTATTCCCTCCCTTGGA
 CGGCGCCGGGAAAACAGCTGCTCGAGCTTTATTTCTTCGGTGCACCAACTCAGAAATTCCTCCGCCCTGCTGCTCAGTGAGTCCGACCCCTAGCAGTGAAGTGCAT
 TTAACACCTCAGGAATTGAGCGAATCTCCAGTGGCTCTCCTCACCGGATCCCTTCCACGCTCTCTCCCGTCCGCGCTCAGTCCGACTGCTCATTTGGCCGCTGCC
 TGCCAAATCCGATGCACGTCCGCTAGGGCAAGACCGGAAAAAGCGCTACACCTGGCTCTGGGAGCGCGCCCTAACGCCAGCCAGCAGCAGGAGGCGCGGAGCCACCG
 CCTGGCGCGGAGAGTCAAGGAGGAACCTCAATTTACATAACCGCCCGCTCTGCTCTCTGGCGGGGCGGAGTCCCGCCCTCGTCCAACCTTGAATCTGTTGGTACAGG
 CCAGTCACTCCGACCTAGGCAAGCTGTGGTGGAGTGGAAAGTGTGGAGGGCGGTCGCCGGAGCGGATTTGGTCTGGGAGTTCCAGAGGCGGCTATAAGAACCGGAACT
 GGGCGGGGAGCTGAGTGTGGTGTAGTCCCGTGGTCTGGTTCGAGGTGGCGGTTAGTTGACTCCGCGGAGTTTCACTCCCTGGTTTTCCCGTCTCAAGCTCGCTCGCTT
 TCAGTCAGGATGTCTGCGCGTGGCCGGCTATCGGCATCGACCTGGGCACCACCTATTCGTCGCTCGGGTCTTCCAACATGGCAAGTGGAGATCATCGCCAAAGCAGCAGGGC
 AATCGCACCCAGCCAGCTACGTGGCTTTCAGGCACCCGAGCGCCTCATCCGCGCAGCCCGCCAGAACACAGTGGCCATGAACCCCAACACCATCTTCGACGCCAAGAGG
 CTGATTTGACGGAAATTCAGGATGCCACAGTGCAGTCCGATATGAACACTGGCCGTTCCGGTGGTGAAGCAGGAGGCAAGCCAAAGTGAAGTAGAGTCAAGGGGGAG
 ACCAAGACTTCTTCCAGAGGAGATATCTCCATGGTCTCACGAAAGTGAAGGAGATCCCGGAAGCTTACCTGGGGGCAAGTGCACAGCCGCTTCAACCGTCCCGGCC
 TATTTCAACGACTCGCAGCGCCAGGCCCAAGGACCGCAGCCATCACGGGCTCAATGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCACGGCGCGGCCATCGCTACGGCTGGAC
 AAGAAAGGCTGCGCGGGCGGAGAAAGACCGCTCACTTTGACCTGGCGGTGGCACTTTCGACGTGTCCATCCTGACCATCGAGGATGGCATCTTCGAGGTGAAGTCCAG
 GCCGGCGATACCCACTGGCGGTGAGGACTTCGACAACCGCATGGTGAAGCCACTGGCGGAGGATTCAGCCGCAAGCACAAGAAGGACATTTGGCCCAACAGCGCCCGCTG
 AGCGGCTGCGCACCGCTTGCAGCGCCCAAGCGCACCTGAGTCTGTCACGAGGCGAGCATCGAGATCGACTCGCTCTACGAGGGCGTGGACTTCTATACGTCCTCACG
 CGCGCCGCTTCGAGGAGTCAATCCGACCTTCTTCGCGGACCTGGAGCCGTTGGAGAAGCGCTGCGCGACGCCAAGCTGGACAAGGGCCAGATCCAGGAGATCGTGTCTG
 TGGGCGGCTCCACTCGTATCCCCAAGATCCAGAAGCTGCTGCAAGATTTCTTCAACGGCAAGGAGTGAACAAGAGCATCAACCCCGACGAGGCGGTGGCCATTTGGCGCCG
 GTGAGGGGCCATCCTCATCGCGCAAAATCAGAGAATGTGCAAGACTGCTGCTACTCGACGTGACCCCGTTGCTGCTGGGCATCGACAGCTGGCGGTGTCATGACCCCA
 CTCAATCAGAGGAAACACAGATCCCCACCAAGCAGACGACGACTTCACCCACTACTCGGACAACCAAGCAGCGTACTGGTGCAGGTATACGAGGGCGAACGGCCATGACC
 AAGGACATAAACCCTGCTGGCAAGTTTCAGCTGACCGGATTTCCCTCGCCCTCGCGGGTCCCCAAATCGAGGTACCTTCGAGATTTGACGCCAATGGCATCTTAACTGTT
 ACCCGCGCGCAAGAGCACCCGGTAAGGAAAAAATAACCATCACCAATGACAAGGTCGTCGAGCAAGGACGACATTTGACCCGATGGTGCAGGAGGCGGAGCGGTACAAA
 TCGGAAGATGAGGGCAATCCGACCCGAGTCCGCGGCAAAAACGCCCTGGAGTCTTATACCTACAAATCAAGCAGACGCGTGAAGACGAGAACTGAGGGCAAGATTAGCGAG
 CAGGACAAAACAGATCCTTCGACAAGTGTCAAGGATGATCAACTGGCTCGACCGAAACAGATGGCAGAGAAGATGAGTATGAACCAAGCAGAAAGAGCTCGAAAGATTT
 TGCACCCCATCATCAGCAACTTTTACCAAGTGGTCTGCGCGGCGCAGCGCGGCGGCTTCAGGAGCTCCGCGGGGACCCACCATCGAAGAAGTGGACTTAACTGCACT
 CAAGTCAGCGTAAACCTCTTGGCTTTCTCTCTCTCTTTTTTTTTTTGTTTGTCTTGTGAAATGTCCTTGTGCCAAGTACGAGATCTATTGTTGGAAGTCTTTGGTATATGCA
 AATGAAAGGAGAGTGAACCAACTTAGTTTAAATATAAAAGTTCCAAAGTTGTTTAAAAACATTTATCGAGTTTCTCTTAAATGATTTGCGTGTGCTGACTTTGAG
 CATTTTTGATTAGTTCGTGATGGAGATTTGTTGAGATGAGAACTTAAGTTTGCACACTGTTCTGTAGAGCTTGGAAACAGTAAAAATATATAGGAGCTTAAATTTGTTA
 TTTTATGTACTACTTTAAACTAACTGAACTATGCAGTAAATGTTAAGGACAGTATACTTTTTGAACAAATGCATAAATGCAATGTAAGTAAAGCTGAAATGTATC
 3'

Figura 2. Gen de la HSPA2. En negra es mostra la seqüència codificant. Es van realitzar tres amplificacions amb els primers 1F/1R, 2F/2R i 3F/3R (subratllats). En fons gris es mostren les bases en les quals s'han observat polimorfismes.

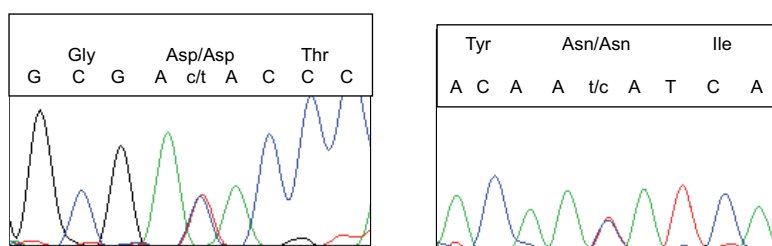


Figura 3. Part de les seqüències on s'observen els dos polimorfismes en forma d'heterozigots, els quals no comporten canvi d'aminoàcid.

S'han detectat 2 SNP, ja descrits prèviament, que no comporten canvi d'aminoàcid (vegeu les figures 2 i 3). La variant c.684 T>C l'hem trobada en tots els tipus d'infertilitat i en controls. La variant c.1653 C>T es presenta en un cas d'oligoastenoteratozoospermia severa. En les mostres estudiades fins ara no s'ha detectat cap mutació patogènica.

Encara que s'observa que es tracta d'un gen bastant conservat, ja que s'expressa en diferents teixits i presenta diverses funcions importants, queda oberta ara la possibilitat d'incrementar el nombre de pacients a analitzar, la qual cosa permetrà determinar la possible existència de mutacions patogèniques en el gen *HSPA2*.

AGRAÏMENTS

Subvencionat amb càrrec al projecte del Ministeri d'Educació i Ciència BFU2006-03479.

BIBLIOGRAFIA

GOVIN, J.; CARON, C.; ESCOFFIER, E.; FERRO, M.; KUHN, L.; ROUSSEAU, S.; EDDY, E. M.; GARIN, J.; KHOCHBIN, S. (2006). «Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis». *J. Biol. Chem.*, 281(49): 37888-37892.

MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; MATEO, S. DE; VIDAL-TABOADA, J. M.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA R. (2008). «Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples». *Hum. Reprod.*, 23(4): 783-791.

MATEO, S. DE; MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; ESTANYOL, J. M.; DOMÍNGUEZ-FANDOS, D.; VIDAL-TABOADA, J. M.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. (2007). «Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa». *Proteomics*, 7(23): 4264-4277.

OLIVA, R.; MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; ESTANYOL, J. M. (2008). «Proteomics in the study of the sperm cell composition, differentiation and function». *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 54(1): 23-36. [Revisió]

OLIVA, R.; MATEO, S. DE; ESTANYOL, J. M. (2009). «Sperm cell proteomics». *Proteomics*, 9(4): 1004-1017.

ORGANITZACIÓ MUNDIAL DE LA SALUT (1999). *WHO laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction*. Cambridge: Cambridge University Press.

ZHU, D.; DIX, D. J.; EDDY, E. M. (1997). «HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes». *Development*, 124(15): 3007-3014.

ESTUDI MUTACIONAL DELS GENS DE LA PROTAMINA 1 I 2 EN PACIENTS INFÈRTILS I CONTROLS

Meritxell Jodar,¹ Gemma Mestre,¹ Josep Oriola,¹ Manel Gené,² José Luís Balleascà³ i Rafael Oliva¹

¹ Grup de Genètica Humana, IDIBAPS, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona; Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Barcelona.

roliva@ub.es.

² Medicina Legal, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

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

Resum

Les protamines són les proteïnes més abundants en espermatozoides i actuen empaquetant el genoma patern. S'ha observat que animals genoanul·lats per a la protamina 1 (PRM1) i per a la protamina 2 (PRM2) presenten una infertilitat severa. En humans s'ha demostrat que en alguns pacients infèrtils hi ha alteració en l'expressió d'aquestes protamines. L'objectiu del present treball és l'estudi mutacional de *PRM1* i *PRM2* en pacients amb un fenotip ben definit, teratozoospermics (formes normals (FN) $\leq 9\%$), així com corroborar la possible associació de l'SNP c.-190C>A en *PRM1* en pacients amb morfologia espermàtica alterada descrita prèviament per Gázquez *et al.* (2008). Com a controls per a aquest estudi hem escollit individus amb paternitat provada i pacients amb FN $> 9\%$. Descrivim diferents variants trobades en els dos gens i confirmem l'associació entre el genotip AA (c.-190C>A) i la morfologia espermàtica alterada. A més, hem establert els haplotips més comuns en la nostra població.

Paraules clau: infertilitat, espermatozoide, protamines, factor de risc, haplotips.

Abstract

Protamines are the major nuclear sperm proteins and they are important for the correct packaging of the DNA in the sperm nucleus. Protamine haploinsufficiency in mice results in infertility. Studies in humans have demonstrated the presence of an altered expression of protamines in some infertile patients. Our goals in the present study have been the screening of protamine 1 (*PRM1*) and protamine 2 genes (*PRM2*) in order to look for mutations in patients with abnormal sperm morphology (Normal Forms (NF) $\leq 9\%$) and corroborate the association previously described by Gázquez *et al.* (2008) between the c.-190C>A SNP present in the *PRM1* gene and altered sperm morphology. We have selected fertile men and patients with NF $> 9\%$ as controls. We describe different variants in both genes. Our results show association between the AA genotype in the c.-190C>A polymorphism and the altered sperm morphology. In addition, we have established the most common haplotypes in our population.

Key words: infertility, sperm, protamines, risk factor, haplotypes.

INTRODUCCIÓ

Les protamines són les proteïnes nuclears més abundants en espermatozoides i actuen empaquetant el genoma patern (Oliva i Dixon, 1991). En humans hi ha una còpia del gen de *PRM1* i una còpia del gen de *PRM2* per genoma haploide. Mentre que la *PRM1* és sintetitzada com una proteïna madura, els components de la família de *PRM2* es generen per la proteòlisi d'un precursor comú, que es transcriu d'un únic gen (Oliva, 2006). La importància de les protamines durant l'espermatogènesi va ser emfatitzada per la

creació d'un model animal genoanul·lat en què una haploinsuficiència de *PRM1* i *PRM2* causava en ratolins una infertilitat severa (Cho *et al.*, 2001). En el nucli espermàtic humà el contingut de protamina 1 és molt similar al de la protamina 2 (la relació P1/P2 és aproximadament 1), però diferents estudis han demostrat que en alguns pacients infèrtils hi ha una alteració en l'expressió de protamines (Yebra *et al.*, 1998; Oliva, 2006).

Tan aviat com es va veure que aquestes diferències en el contingut de protamines implicaven infertilitat en la majoria de pacients, es van succeir diferents

estudis d'aquests gens a la recerca de mutacions que poguessin explicar aquesta reducció de l'expressió de protamines en pacients infèrtils. No obstant això, l'anàlisi mutacional inicial en els gens de les protamines suggereix que les mutacions patogèniques en aquests són una causa rara d'infertilitat masculina. Aquesta baixa incidència de variacions en els gens de la protamina que causin substitucions d'aminoàcids en homes fèrtils indica la gran importància que té la conservació d'aquests al llarg de l'evolució per garantir una bona espermatogènesi i, així, la continuïtat de l'espècie. Però en estudis més recents s'han trobat certes variants que podrien estar implicades en la infertilitat. Per tant, les mutacions en els gens de les protamines són una causa infreqüent d'infertilitat, però no tan rara com es pensava en un principi.

Ja que s'ha vist aquesta baixa variabilitat en la zona codificant del gens, els nous estudis s'han enfocat envers les regions no codificants 5' i 3' (les mutacions en aquestes regions dels gens poden provocar variacions en la seva expressió). En tots els camps de la medicina hi ha un gran interès per l'estudi dels marcadors genètics, com són els polimorfismes, ja que una variant genètica pot ser la responsable directa d'alterar la funció o l'expressió de la proteïna, o bé pot estar en desequilibri de lligament amb una mutació rellevant que formi part del mateix gen o del mateix haplotip. Per tant, actualment els estudis genètics d'infertilitat es fan amb una selecció acurada de pacients infèrtils segons les característiques del seminograma, per detectar possibles variants. En el nostre grup s'ha publicat recentment un polimorfisme en el promotor de la *PRMI* que es correlaciona amb espermatozoides amb morfologia alterada. (Gázquez *et al.*, 2008). El present estudi suposa la continuació lògica d'aquest treball previ.

OBJECTIUS

Confirmar l'associació entre l'homozigositat AA del polimorfisme c.-190C >A de *PRMI* i la morfologia alterada descrita anteriorment en el nostre grup en un grup independent de pacients i controls.

Estudi de les regions codificants i no codificants del gens de *PRMI* i *PRM2* a la recerca de variants.

A causa de la proximitat dels dos gens en estudi *PRMI* i *PRM2* (estan separats únicament per 5.000 parells de bases), cal establir els haplotips més comuns en la nostra població.

MATERIALS I MÈTODES

Per a l'estudi del gen *PRMI* hem utilitzat 125 pacients infèrtils (77 pacients amb una morfologia espermàtica amb formes normals (FN) \leq 9 % i 48 pacients amb FN > 9 %). També hem inclòs 102 controls de paternitat provada. El polimorfisme c.-190C>A es va estudiar amb anterioritat en 194 pacients (51 amb FN \leq 9 % i 143 amb FN > 9 %) i en 101 controls procedents de donants de sang (Gázquez *et al.*, 2008, vegeu la taula 1). Per a l'estudi del gen de la *PRM2* hem utilitzat 88 pacients infèrtils (61 pacients amb FN \leq 9 % i 27 pacients amb FN > 9 %), i s'han inclòs també 39 controls de paternitat provada. Les mostres dels pacients provenen de l'ejaculació i, per tant, s'han de separar els espermatozoides del fluid seminal i d'altres cèl·lules presents en el semen, i un cop es tenen els espermatozoides purs s'aïlla el DNA. El protocol que s'utilitza en l'aïllament de DNA d'espermatozoides és el que apareix a Hoissan *et al.* (1997), amb certes modificacions. Els dos gens s'amplifiquen mitjançant la tècnica de PCR i se seqüencien mitjançant seqüenciació directa, tant la regió codificant com la no codificant.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

En l'estudi del gen *PRMI* hem confirmat en una població independent que el polimorfisme del promotor (c.-190C>A) en homozigosi es comporta com a factor de risc per a la teratozoospermia. (Gázquez *et al.*, 2008, vegeu la taula 1). Addicionalment es van trobar diferents variants en *PRMI* i *PRM2* (vegeu la figura 1), encara que cap d'aquestes no mostra diferències significatives entre pacients i controls. Tot i això, cal destacar certes variants:

— En el gen *PRMI* s'ha trobat en heterozigosi la mutació p.Arg34Ser (c.102G>T). Aquesta mutació va ser descrita per Iguchi *et al.* (2006) en tres pacients de 30 amb un fenotip similar al del ratolí genoanulat (comptatge espermàtic normal, fragmentació de DNA i morfologia alterada). En el nostre estudi hem trobat aquesta variant en un pacient normozoospermic i, encara que no tenim dades de fragmentació, aquest resultat concorda amb el que descriuen Kichine *et al.* (2008).

— En el gen *PRM2* s'ha trobat en heterozigosi la variant c.309*61G>C. Aquesta variant va ser descrita per Hammound *et al.* (2007) en pacients amb una relació P1/P2 alterada, i en el nostre estudi la trobem en un control de paternitat provada en dos pacients amb una relació P1/P2 normal.

Taula 1

	Pacients infèrtils (≤ 9 % NF)	Pacients infèrtils (> 9 % NF)	Tots els pacients	Població control (paternitat provada)	Població control (donants de sang homes)	Població control (paternitat provada + donants homes)
N	128	191	319	102	101	203
Genotip						
AA % (n)	10,16* (13)	4,18 (8)	6,5 (21)	3,9 (4)	2,97 (3)	3,4 (7)
AC % (n)	36,71 (47)	42,4 (81)	40,12 (128)	37,2 (38)	29,7 (30)	33,5 (68)
CC % (n)	53,12 (68)	53,4 (102)	53,29 (170)	58,8 (60)	67,3 (68)	63,1 (128)
Freqüència al·lèlica						
A	0,285** (73)	0,253 (97)	0,266** (170)	0,225 (46)	0,178 (36)	0,202 (82)
C	0,714 (183)	0,746 (285)	0,733 (468)	0,774 (158)	0,821 (166)	0,798 (324)

* La freqüència del genotip AA en pacients amb FN ≤ 9 % és superior significativament a la dels pacients amb FN > 9 % (p = 0,35) si es compara amb les altres freqüències genotípiques, i significativament superior a la present en controls (tots els controls o donants de sang) (p = 0,007 i 0,017) si es compara amb la freqüència genotípica CC.
 ** La freqüència al·lèlica de A en pacients és significativament superior (p < 0,05) si es compara amb la població control.

Taula 2. Haplotips més comuns (95 % de la població)

Protamina 1	Protamina 2		c.-371G>C	c.-226G>A	c.271+27G>C	c.271+102C>A
	c.-190C>A	c.139C>A				
C	C	C	G	G	G	A
C	C	C	G	A	G	A
A	A	T	G	G	C	C
C	A	T	G	G	C	C
C	A	T	C	G	G	C

— En el gen *PRM2* s’han trobat també en heterozigosi les tres variants intròniques c.271+10C>T, c.271+19C>T i c.271+135C>T, que van ser descrites per Aoki *et al.* (2006) en pacients amb una relació

P1/P2 alterada. En el nostre estudi es van trobar en un control de paternitat provada i en un pacient amb una relació de P1/P2 normal.

Hi ha dues variants en el gen *PRM1* i cinc en el

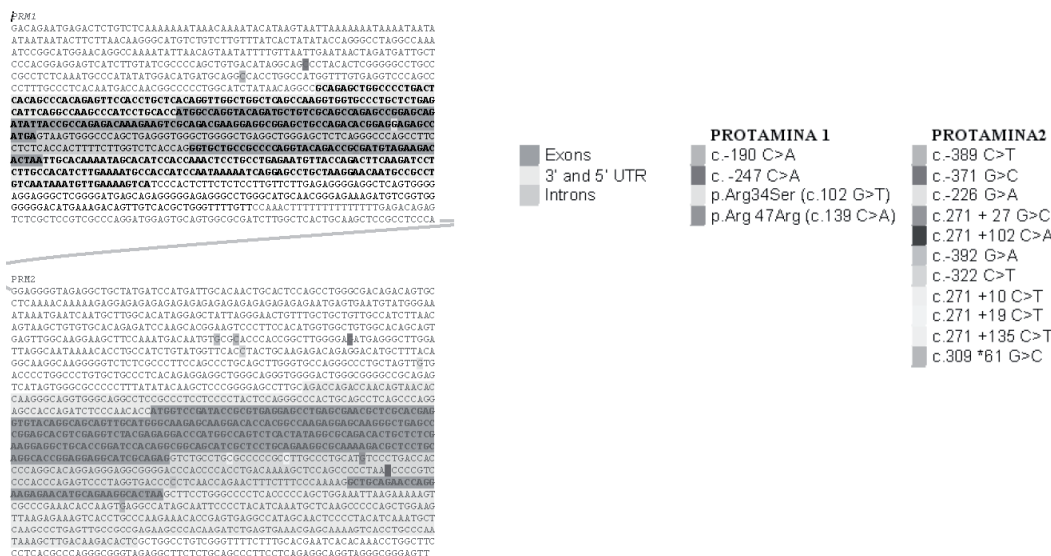


Figura 1. Variants trobades en el gen de la protamina 1 i de la protamina 2.

gen *PRM2* que presenten una freqüència elevada. A causa de la proximitat dels dos gens és probable que el nombre de combinacions d'aquestes variants estigui restringit a uns determinats haplotips. En el nostre estudi veiem que cinc haplotips estan presents en més del 95 % de la població estudiada (vegeu la taula 2). Si comparem la freqüència d'aquests haplotips entre controls i pacients no observem diferències significatives; no obstant això, hi ha certs haplotips que no s'inclouen en la classificació anterior. Un de 78 allels, en controls, 8 de 122, en pacients teratozoospermics, i 2 de 54, en normozoospermics, presentaven altres haplotips (5 %). Per tant, observem que, dels onze haplotips diferents, únicament un correspon als controls. Sembla que en pacients amb morfologia alterada hi ha més haplotips menys freqüents, tot i que no observem diferències significatives, probablement a causa del nombre escàs de mostres estudiades.

AGRAÏMENTS

Subvencionat amb càrrec al projecte del Ministeri d'Educació i Ciència BFU2006-03479.

BIBLIOGRAFIA

- AOKI, V. W.; CHRISTENSEN, G. L.; ATKINS, J. F.; CARRELL, D. T. (2006). «Identification of novel polymorphisms in the nuclear protein genes and their relationship with human sperm protamine deficiency and severe male infertility». *Fertil. Steril.*, 86: 1416-1422.
- CHO, C.; WILLIS, W. D.; GOULDING, E. H.; JUNG-HA, H.; CHOI, Y. C.; HECHT, N. B.; EDDY, E. M. (2001). «Haploinsufficiency of protamine-1 or-2 causes infertility in mice». *Nat. Genet.*, 28: 82-86.
- GÁZQUEZ, C.; ORIOLA, J.; MATEO, S. DE; VIDAL-TABOADA, J. M.; BALLESCA, J. L.; OLIVA, R. (2008). «A common protamine 1 promotor polymorphism (-190C→A) correlates with abnormal sperm morphology and increased protamine P1/P2 ratio in infertile patients». *J. Androl.*, 29: 540-548.
- HAMMOUD, S.; EMERY, B. R.; AOKI, V. W.; CARRELL, D. T. (2007). «Identification of genetic variation in the 5' and 3' non-coding regions of the protamine genes in patients with protamine deregulation». *Androl.*, 53: 267-274.
- HOSSAIN, A. M.; RIZK, B.; BEHZADIAN, A.; THORNEYCROFT, I. H. (1997). «Modified guanidinium thiocyanate method for human sperm DNA isolation». *Mol. Hum. Reprod.*, 3: 953-956.
- IGUCHI, N.; YANG, S.; LAMB, D. J.; HECHT, N. B. (2006). «An SNP in protamine 1: a possible genetic cause of male infertility?». *J. Med. Genet.*, 43: 382-384.
- KICHINE, E.; MSAIDIE, S.; BOKILO, A. D.; DUCOURNEAU, A.; NAVARRO, A.; LEVY, N.; TERRIOU, P.; COLLIGNON, P.; BOETSCH, G.; CHIARONI, J.; MITCHELL, M. J. (2008). «Low-frequency protamine 1 gene transversions c.102G->T and c.-107G->C do not correlate with male infertility». *J. Med. Genet.*, 45: 255-256.
- OLIVA, R. (2006). «Protamines and male infertility». *Hum. Reprod. Update*, 12: 417-435.
- OLIVA, R.; DIXON, G. H. (1991). «Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction». *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 40: 25-94.
- YEBRA, L. DE; BALLESCA, J. L.; VANRELL, J. A.; CORZETT, M.; BALHORN, R.; OLIVA, R. (1998). «Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels». *Fertil. Steril.*, 69: 755-759.

CORRELACIÓ ENTRE LA RELACIÓ DE PROTAMINES I LA PRESENCIA DE POLIMORFISMES A LA REGIÓ PROMOTORA DEL GEN DE LA PROTAMINA 1

Judit Castillo,¹ Sara de Mateo,¹ Meritzell Jodar,¹ Josep Oriola,¹ José Luís Ballecà²
i Rafael Oliva¹

¹ Grup de Genètica Humana, IDIBAPS, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona i Hospital Clínic.
Casanova, 143. 08036 Barcelona. *roliva@ub.edu*.

² Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia, Hospital Clínic i Provincial.

Resum

Existeix evidència que en una proporció important dels pacients infèrtils es troben presents alteracions en els nivells de protamines. El nostre grup ha identificat recentment en la nostra població un polimorfisme a la regió promotora del gen de la protamina 1 (c.-190C>A), amb el genotip AA com el més freqüent en pacients teratozoospermics. Amb l'objectiu de contribuir a identificar el mecanisme responsable d'aquesta associació, hem iniciat un projecte per determinar la relació de protamines P1/P2 i protamines/DNA en relació amb el polimorfisme detectat, així com la morfologia i mobilitat dels espermatozoides, en un grup d'11 pacients c.-190AA, 34 pacients c.-190AC, 44 pacients c.-190CC i 10 controls de fertilitat provada. Les protamines s'extreuen a partir de 10 milions d'espermatozoides i s'analitzen en gels àcids de poliàcrilamida. El DNA es quantifica després de la hidròlisi en àcid perclòric. Els resultats indiquen un increment en la relació P1/P2 en el grup de pacients amb el genotip AA en comparació de la resta de pacients i controls, i també una relació significativa entre el quocient protamina/DNA i la morfologia dels espermatozoides. Una possible interpretació és que el polimorfisme c.-190C>A incrementa l'expressió del gen de la protamina 1, que resulta en un augment de la relació P1/P2 i en una morfologia alterada en pacients infèrtils.

Paraules clau: protamines, infertilitat, espermatozoides, factor de risc.

Abstract

An abnormal expression of protamines has been described in some infertile patients. Recently, our group has identified a protamine 1 promoter gene polymorphism (c.-190C>A) in our population, and the AA genotype is more frequent in teratozoospermic patients. With the aim to help to identify the mechanism responsible for this association, we have begun the present study to determine the protamine P1/P2 ratio and the protamines/DNA ratios, and to relate this information with the studied polymorphism and the sperm morphology and mobility, in a group constituted by 11 c.-190AA patients, 34 c.-190AC patients, 44 c.-190CC patients and 10 controls. The protamines have been extracted from 10 millions sperm cells and have been analysed in acidic polyacrylamide gels. The DNA has been quantified after its 0.5 N perchloric acid hydrolysis at 90 °C. The results show an increased P1/P2 ratio in the AA patient group compared with the CA or CC groups and controls, and a significantly relation between protamine/DNA ratio and the sperm cell morphology has been detected. A possible interpretation for the results is that the c.-190C>A polymorphism increases the protamine 1 gene expression resulting in a high P1/P2 ratio and an abnormal sperm cell morphology in infertile patients.

Key words: protamines, infertility, sperm, risk factor.

INTRODUCCIÓ

Les protamines són les proteïnes nuclears més abundants presents en les cèl·lules espermàtiques de moltes espècies diferents (Oliva i Dixon, 1991). En l'home es coneixen dos tipus de protamines, la protamina 1 (P1) i la protamina 2 (P2). Molts estudis

han demostrat que es troben alteracions en els seus nivells en una proporció important de pacients infèrtils (Balhorn *et al.*, 1988; Yebra *et al.*, 1993; Aoki *et al.*, 2005; Oliva, 2006; Torregrosa *et al.*, 2006). Tan aviat com es van observar diferències en el contingut de protamines, es va postular que hi podia haver mutacions en els gens corresponents (Yebra *et al.*,

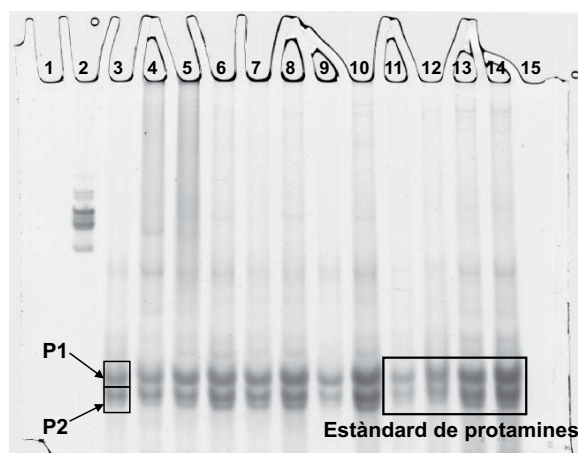


Figura 1. Exemple de gel àcid de poliacrilamida per a l'anàlisi de protamines per electroforesi. Carril 2, estàndard d'histones; carrils 3-10, mostres de pacients infèrtils; carrils 11-14, estàndard de protamines, necessari per determinar la quantitat de protamines en μg . La banda superior correspon a la protamina 1 (P1) i la inferior a la protamina 2 (P2).

1993). Recentment, el nostre grup ha identificat en la nostra població un polimorfisme en la regió promotora del gen de la P1 (c.-190C>A). Aquest canvi de nucleòtid s'ha detectat amb més freqüència en pacients teratozoospèrmics, és a dir, amb una morfologia alterada en els seus espermatozoides. Els paci-

ents amb genotip AA presentaven una relació P1/P2 incrementada en comparació de pacients amb genotips A/C o C/C (Gázquez *et al.*, 2008).

El present estudi pretén contribuir a identificar el mecanisme responsable d'aquesta associació mitjançant la determinació de la relació P1/P2 en un nombre superior de pacients, així com la relació protamines/DNA, relacionant les dades obtingudes amb el polimorfisme detectat i la morfologia dels espermatozoides. D'altra banda, es pretén comprovar la relació que existeix entre la morfologia de les cèl·lules espermàtiques i la seva mobilitat.

MATERIAL I MÈTODES

L'estudi consta d'un total de 89 pacients infèrtils, dels quals 23 són normozoospèrmics i 66 teratozoospèrmics, tots ells procedents del laboratori d'andrologia de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. Onze pacients presenten el genotip de risc c.-190AA, 34 pacients són heterozigots c.-190AC i 44 homozigots c.-190CC. Addicionalment, s'han inclòs deu controls de fertilitat provada.

Les protamines s'han extret a partir de 10 milions d'espermatozoides mitjançant precipitació amb etanol i tractament amb HCl 0,5 M. Finalment, s'han analitzat per electroforesi en gels àcids de poliacrila-

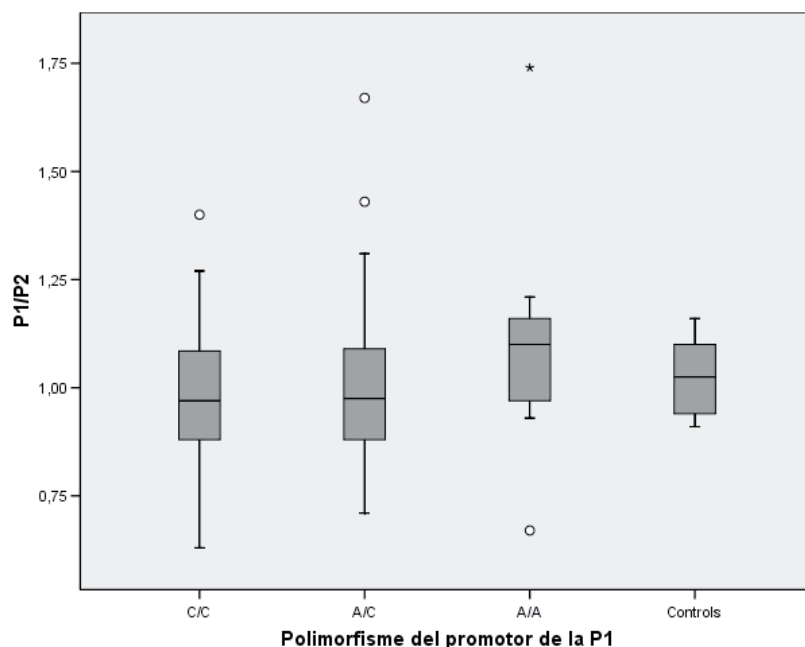


Figura 2. Distribució del quocient entre protamina 1 i protamina 2 (P1/P2) a cada grup de pacients, d'acord amb el polimorfisme de la regió promotora del gen de la protamina 1 (*PRM1* c.-190C>A), i controls.

Taula 1. Representació de la mitjana \pm desviació estàndard de les relacions P1/P2, P/DNA, P1/DNA i P2/DNA per al grup de pacients que no presenta genotip de risc i per al grup de pacients amb el polimorfisme *PRMI* c.-190AA per un costat, i per al conjunt de pacients amb un percentatge de formes normals (FN) al semen inferior o igual al 9 % i per als que presenten una proporció major a 9 %

	P1/P2	P/DNA	P1/DNA	P2/DNA
C/C	0,987 \pm 0,156*	0,488 \pm 0,090	0,241 \pm 0,050	0,247 \pm 0,047
A/A	1,103 \pm 0,260*	0,447 \pm 0,119	0,231 \pm 0,064	0,216 \pm 0,062
FN \leq 9 %	1,011 \pm 0,211	0,459 \pm 0,102**	0,228 \pm 0,054**	0,231 \pm 0,056**
FN > 9 %	1,001 \pm 0,129	0,521 \pm 0,108**	0,260 \pm 0,057**	0,261 \pm 0,055**

* $P = 0,058$, Mann-Whitney, entre pacients C/C i A/A.

** $P < 0,05$, Mann-Whitney, entre pacients amb FN \leq 9 i FN > 9.

mida (vegeu la figura 1), tal i com s'explica en l'article de Gázquez *et al.* (2008), però amb els següents canvis: la preelectroforesi s'ha dut a terme durant 1 h i 20 min i l'electroforesi durant 1 h; en cadascun dels gels s'han inclòs quatre mostres estàndard amb concentració coneguda de protamines per a la quantificació posterior de les mostres; els gels han estat tenyits amb EZBlueTM Gel Staining Reagent, solució preparada que conté Coomassie Brilliant Blue G-250, segons el protocol comercial (SIGMA).

El DNA s'ha quantificat després de la hidròlisi en àcid perclòric 0,5 N a 90 °C durant 20 min i la deter-

minació posterior de l'absorbància a 260 nm mitjançant l'espectrofotòmetre NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer.

La proporció de formes normals (FN) i la mobilitat progressiva ràpida s'han mesurat com a percentatge d'espermatozoides en el semen mitjançant el criteri estricte de Kruger i el sistema CASA (*computer assisted semen analysis*), respectivament.

Les anàlisis estadístiques s'han dut a terme amb el programari informàtic SPSS (versió 14.0) i el test no paramètric Mann-Whitney.

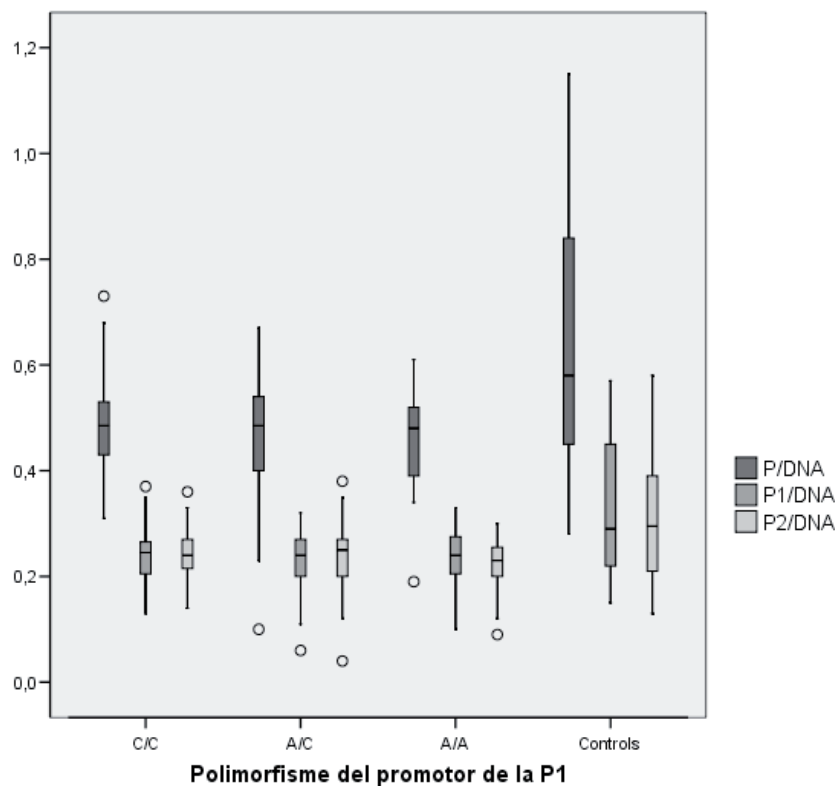


Figura 3. Distribució del quocient entre protamina 1 + protamina 2 i DNA (P/DNA), protamina 1 i DNA (P1/DNA) i protamina 2 i DNA (P2/DNA) per a cada grup de pacients, d'acord amb el polimorfisme de la regió promotora del gen de la protamina 1 (*PRMI* c.-190C>A), i controls.

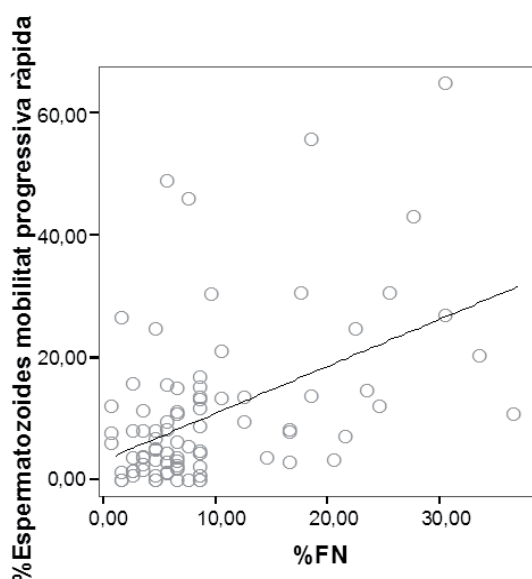


Figura 4. Correlació entre el percentatge de formes normals (FN) presents en el semen de cada pacient i la proporció d'espermatozoides amb una mobilitat progressiva ràpida.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

En coherència amb els resultats de l'estudi anterior que es va dur a terme en el nostre grup (Gázquez *et al.*, 2008), el genotip c.-190AA està lligat a un augment de la relació P1/P2, en comparació de la resta de pacients i el grup control (vegeu la figura 2). Una possible interpretació d'aquest resultat és que aquest polimorfisme potencia l'expressió del gen de la protamina 1 i això suposa un augment del quocient P1/P2. Tot i això, en el present estudi s'observa una clara tendència (vegeu la figura 2), però no diferències significatives entre els pacients amb genotip AA i el grup que no el presenta ($P = 0,058$) (vegeu la taula 1).

Pel que fa a les relacions entre protamines i DNA, ambdues en μg , tant en protamines totals (P/DNA) com en cadascuna per separat (P1/DNA i P2/DNA), no s'observen diferències significatives entre el grup de pacients amb genotip AA i el grup que no el presenta (vegeu la figura 3). Aquest fet es pot donar, ja que en aquesta determinació es produeixen dues fonts d'error: durant l'anàlisi de les protamines, d'una banda, i en l'anàlisi del DNA, de l'altra. Això resulta en una major dispersió dels resultats del quocient protamina/DNA. És interessant destacar que dins del grup amb el genotip c.-190CC el pacient que presenta els valors més elevats de P/DNA, P1/DNA i P2/DNA presenta un polimorfisme diferent en la re-

gió promotora del gen de la P1 (c.-247C>A), descrit prèviament per Hammoud *et al.* (2007).

D'altra banda, el quocient protamina/DNA es veu afectat de manera significativa amb la proporció de FN presents al semen dels pacients estudiats, tant en el cas de P/DNA, amb $P = 0,036$, com en P1/DNA i P2/DNA, amb $P = 0,046$ i $P = 0,043$, respectivament (vegeu la taula 1). Tal i com s'ha vist en el nostre grup (Jodar *et al.*, 2009), el genotip AA està lligat a una morfologia alterada ($\text{FN} \leq 9\%$), si es compara aquest grup amb el conjunt de pacients amb genotips C/C i A/C ($P < 0,05$). Aquest fet, juntament amb els resultats obtinguts, permet hipotetitzar que la presència del polimorfisme c.-190AA a la regió promotora és un factor de risc relacionat amb una morfologia alterada dels espermatozoides, però segurament existeixen altres causes que afectarien el percentatge de FN presents sense alterar el quocient P1/P2.

Per acabar, tal i com es va veure anteriorment en el nostre grup (Torregrosa *et al.*, 2006), en el present estudi s'ha observat una relació significativa entre la morfologia i la mobilitat progressiva ràpida dels espermatozoides dels pacients estudiats, amb $P = 1,049 \times 10^{-5}$, amb una correlació positiva entre els seus valors (vegeu la figura 4).

Futurs experiments de quantificació de l'expressió dels gens de P1 i P2 mitjançant PCR a temps real i experiments d'expressió *in vitro* de construccions del promotor, que contenen el canvi amb un gen reporter, ens ajudaran a aclarir les associacions detectades.

AGRAÏMENTS

Subvencionat amb càrrec al projecte del Ministeri d'Educació i Ciència BFU2006-03479.

BIBLIOGRAFIA

- AOKI, V. W.; LIU, L.; CARRELL, D. T. (2005). «Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males». *Hum. Reprod.*, 20: 1298-1306.
- BALHORN, R.; REED, S.; TANPHAICHITR, N. (1988). «Aberrant protamine1/protamine2 ratios in sperm of infertile human males». *Experientia*, 44: 52-55.
- GÁZQUEZ, C.; ORIOLA, J.; MATEO, S. DE; VIDAL-TABOADA, J. M.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. (2008). «A common protamine 1 promoter polymorphism (-190 C→A) correlates with abnormal sperm morphology and increased protamine P1/P2 ratio in infertile patients». *J. Androl.*, 29: 540-548.
- HAMMOUD, S.; EMERY, B. R.; AOKI, V. W.; CARRELL,

- D. T. (2007). «Identification of genetic variation in the 5' and 3' non-coding regions of the protamine genes in patients with protamine deregulation». *Androl.*, 53: 267-274.
- JODAR, M.; ORIOLA, J.; GENE, M.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. (2009). «Sequencing of the protamine 1 gene confirms the c.-190C>A promoter polymorphism as a risk factor for altered sperm morphology and identifies new genetic variants» *Supplement J. Androl.*, 30: 120.
- OLIVA, R. (2006). «Protamines and male infertility». *Hum. Reprod. Update*, 12: 417-435.
- OLIVA, R.; DIXON, G. H. (1991). «Vertebrate protamines and the histone-to-protamine replacement reaction». *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 40: 25-94.
- TORREGROSA, N.; DOMINGUEZ-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(8): 2084-2089.
- 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.

SELECCIÓN DE OVOCITOS BOVINOS MEDIANTE TINCIÓN CON BRILLIANT CRESYL BLUE (BCB) PARA DESARROLLO HASTA BLASTOCISTO TRAS ACTIVACIÓN PARTENOGENÉTICA

Cornelia Milovanov,¹ Anna Veiga,² Begoña Aran,² Rita Vassena² y Juan Carlos Izpisua^{1,3}

¹ Centre de Medicina Regenerativa, Barcelona.
cmilovanov@cmrb.eu.

² Banc de Cèl·lules Mare, Centre de Medicina Regenerativa, Barcelona.

³ The Salk Institute for Biomedical Studies, La Jolla, EEUU.

Resumen

El objetivo de este estudio es determinar si la tinción Brilliant Cresyl Blue (BCB) es útil para la selección de ovocitos bovinos previa a la maduración *in vitro* (IVM) y a la activación partenogenética. Para ello, los ovocitos fueron seleccionados según su actividad glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) mediante la tinción con BCB antes de madurarlos *in vitro*. Se postula que los ovocitos en maduración presentan niveles más altos de G6PDH que los ovocitos ya maduros. Nuestros resultados demuestran que la tinción de COC con BCB antes de la IVM puede ser útil para la selección de ovocitos competentes para la activación partenogenética. Además, la actividad G6PDH podría ser un marcador útil para determinar la calidad ovocitaria posterior. La clasificación de los COC bovinos mediante tinción con BCB (o actividad G6PDH) podría utilizarse para una mejor selección antes de realizar activación partenogenética, fecundación *in vitro* (FIV) o transferencia nuclear interespecífica (SCNT).

Palabras clave: BCB, partenogénesis, ionoforo A23187, 6-DMAP.

Abstract

The objective of this study was to determine if Brilliant Cresyl Blue staining (BCB) can be used to select oocytes for *in vitro* maturation (IVM), and parthenogenetic activation. For this purpose, prior to IVM oocytes were selected for developmental competence on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity indicated by Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining. It has been hypothesized that growing oocytes have a higher level of active G6PDH in comparison to the mature oocytes. Our results show that the staining of bovine cumulus-oocytes complexes with BCB before IVM can be used to select developmentally competent oocytes for parthenogenetic activation. In addition, G6PDH activity could also prove to be a useful marker for determining oocyte quality in the future. The classification of bovine cumulus-oocyte complexes on the basis of BCB staining (or G6PDH activity) could be effectively used to select bovine oocytes in terms of their further developmental competence for, IVF and interspecies SCNT protocol.

Key words: BCB, G6PDH, parthenogenesis, ionophore A23187, 6-DMAP.

INTRODUCCIÓN

La competencia de desarrollo ovocitario se define como la capacidad de un ovocito de finalizar la meiosis, de dividirse tras la fecundación, alcanzar el estadio de blastocisto y conseguir un embarazo que llegue a término con descendencia sana (Sirard *et al.*, 2006). Esta capacidad se adquiere gradualmente durante la foliculogénesis mientras el ovocito crece y las células somáticas que lo acompañan se diferencian (Eppig *et al.*, 1994). Se ha demostrado que muchos factores afectan al potencial de desarrollo del

ovocito, incluyendo el tamaño y la calidad del folículo (Blondin y Sirard, 1995), la estimulación hormonal (Blondin *et al.*, 2002), el medio de maduración (Warzych *et al.*, 2007), la edad (Rizos *et al.*, 2005), etc. Los criterios morfológicos basados en grosor y compactación del cúmulo y la homogeneidad del ooplasma se han utilizado frecuentemente y son una manera práctica de evaluar la calidad ovocitaria. Sin embargo, la valoración morfológica es insuficiente para seleccionar los ovocitos capaces de dar lugar a un embarazo a término (Loneragan *et al.*, 2003). La tinción con BCB ha sido utilizada en di-

Cuadro 1. Efecto de la selección ovocitaria de la actividad G6PDH mediante tinción BCB en la IVM y desarrollo embrionario tras activación partenogenética

	Nº ovocitos	MII (%)	División (%)	Blastocistos (%)
Control	208	150/208 (72)	90/150 (60)	21/90 (23)
BCB+*	129	98/129 (76)	64/98 (65)	23/64 (36)
BCB-**	107	55/107 (51)	20/55 (36)	1/20 (5)

* $P < 0,3$. ** $P = 0,1$

versas especies, incluyendo el cerdo (Wongsrikeao *et al.*, 2006), la cabra (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2002) y el bovino (Bhojwani *et al.*, 2007). Los ovocitos inmaduros sintetizan una serie de proteínas como la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH). Los ovocitos inmaduros presentan niveles altos de G6PDH en comparación con los ovocitos maduros. El test de BCB, que mide la actividad G6PDH, está basado en la capacidad de la G6PDH en convertir la tinción azul del BCB a incolora (Ericsson *et al.*, 1993). El objetivo de este estudio es determinar si el BCB puede ser útil para seleccionar ovocitos bovinos competentes antes de la maduración IVM y el desarrollo a blastocisto tras la activación partenogenética.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recuperación de ovocitos y tinción con BCB

Los ovocitos fueron aspirados a partir de ovarios proporcionados por un matadero y fueron teñidos con BCB. El método de tinción con BCB ha sido ya descrito en estudios anteriores (Alm *et al.*, 2005; Bhojwani *et al.*, 2007). Los COC fueron sometidos a una solución de 26 μ M de BCB (B-5388, Sigma-

Alderich) diluida en mDPBSs durante 90 min a 38,5 °C en atmósfera húmeda. Tras su lavado, los COC teñidos fueron examinados bajo el estereomicroscopio y clasificados en tres grupos: un grupo control y dos grupos según la coloración del citoplasma: ovocitos con coloración azul (BCB+) y ovocitos sin coloración azul (BCB-). Se evaluó la capacidad de desarrollo de los ovocitos de cada grupo, tras IVM, activación partenogenética y cultivo *in vitro* (IVC).

Maduración in vitro (IVM)

Los COC fueron lavados dos veces en medio de maduración (TCM-199) suplementado con suero fetal bovino inactivado y 10 μ g/ml de hormona foliculoestimulante (Ovagen, Auckland, ICP, Nueva Zelanda) (*v/v*) al 20 %. Seguidamente fueron incubados con medio de maduración durante 24 h a 38,5 °C y 5 % CO₂.

Activación y cultivo in vitro de los embriones

Tras la IVM, las células del cúmulo fueron eliminadas con hialuronidasa al 0,1 % en PBS (*phosphate buffered saline*) sin calcio, a 38,5 °C durante 5 min y mecánicamente mediante una pipeta durante 3-

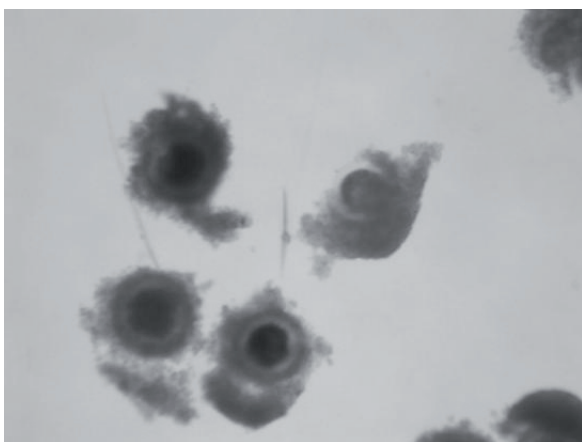


Figura 1. Tinción diferencial de COC tras exposición a BCB

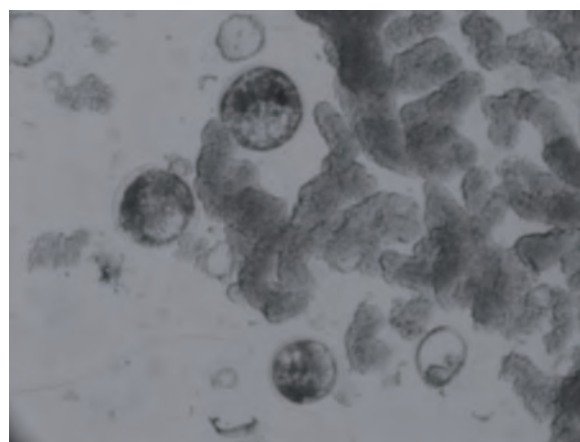


Figura 2. Blastocistos bovinos en día 8 de desarrollo procedentes de ovocitos activados mediante CI y 6-DMAP.

5 min. Únicamente los ovocitos con corpúsculo polar visible fueron activados mediante incubación en ionóforo de calcio A23187 (10 μ M durante 5 min) y 6-DMAP (2 mM durante 3 h). Tras la activación, los ovocitos fueron lavados tres veces y transferidos a medio Menezos B2 (Laboratoire CCD, París, Francia) y co-cultivados sobre una monocapa de células epiteliales de oviducto bovino (BOEC) bajo aceite. Fueron cultivados durante siete días para evaluar la tasa de blastocisto y el desarrollo partenogenético.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fueron recuperados y utilizados para el estudio un total de 605 COC bovinos. Ciento sesenta y uno se usaron para evaluar la configuración meiótica tras IVM y 444 para la IVM, activación partenogenética y posterior desarrollo: 208 se usaron para el grupo control, mientras que 236 fueron teñidos con BCB, de los cuales 129 (54,6 %) resultaron BCB+ y 107 (45,4 %) fueron BCB- y seleccionados para la activación partenogenética. Tras 24 h de IVM, no hubo diferencias significativas en la proporción de ovocitos que alcanzaron el estadio de MII entre el grupo control y el grupo BCB+ (72 % y 76 %, respectivamente), pero este porcentaje fue significativamente menor en el grupo BCB- (51 %). También se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en la tasa de blastocisto alcanzada en el octavo día tras la activación partenogenética. La tasa de blastocisto alcanzada en el grupo BCB+ fue significativamente mayor (36 %) que en los otros grupos. La tasa de blastocisto en el grupo control fue significativamente mayor que en el grupo BCB (23 % y 5 %, respectivamente). Los blastocistos presentaron una morfología normal en todos los tratamientos.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la tinción de COC bovinos con BCB tras IVM es efectiva para seleccionar los ovocitos competentes para la activación partenogenética. Además, la actividad G6PDH podría ser un marcador útil para determinar la calidad ovocitaria posterior. La clasificación de los COC bovinos mediante tinción con BCB (o actividad G6PDH) podría utilizarse para seleccionar los ovocitos bovinos para realizar activación partenogenética, fecundación *in vitro* (FIV) o transferencia nuclear interespecífica (SCNT).

BIBLIOGRAFÍA

- BHOJWANI, S.; ALM, H.; TORNER, H.; KANITZ, W.; POEHLAND, R. (2007). «Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer». *Theriogenology*, 67: 341-354.
- BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M. A. (2002). «Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes». *Biology of Reproduction*, 66: 38-43.
- BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. (1995). «Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes». *Molecular Reproduction and Development*, 41: 54-62.
- EPPIG, J. J.; SCHULTZ, R. M.; O'BRIEN, M.; CHESNEL, F. (1994). «Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes». *Developmental Biology*, 164: 1-9.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. (2003). «Oocytes and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns». *Reproduction in Domestic Animals*, 38: 259-267.
- RIZOS, D.; BURKE, L.; DUFFY, P.; WADE, M.; MEE, J. F.; O'FARELL, K. J.; MACSIURTAİN, M.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. (2005). «Comparisons between nulliparous heifers and cow as oocyte donors for embryo production *in vitro*». *Theriogenology*, 63: 939-949.
- RODRIGUEZ-GONZALES, E.; LOPEZ-BEJAR, M.; VELLILLA, E.; PARAMIO, M. T. (2002). «Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test». *Theriogenology*, 57: 1397-1409.
- SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. (2006). «Contribution of the oocyte to embryo quality». *Theriogenology*, 65: 126-136.
- WARZYCH, E.; PEIPPO, J.; SZYDŁOWSKI, M.; LECHNIAK, D. (2007). «Supplements to *in vitro* maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes». *Animal Reproduction Science*, 97: 334-343.
- WONGSRIKEAO, P.; OTOI, T.; YAMASAKI, H.; AGUNG, B.; TANIGUCHI, M.; NAOI, H.; SHIMIZU, R.; NAGAI, T. (2006). «Effect of single and double exposure to brilliant cresyl blue on the section of porcine oocytes for *in vitro* production of embryos». *Theriogenology*, 66: 366-372.

CODIFICACIÓ D'EMBRIONS DE RATOLÍ AMB MICRODISPOSITIUS DE POLISILICI

Sergi Novo,¹ Rodrigo Gómez,² Leonard Barrios,¹ Marta Duch,² Jaume Esteve,² Jose Antonio Plaza,² Josep Santaló,¹ Carme Nogués¹ i Elena Ibáñez¹

¹Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona.

08193 Bellaterra. elena.ibanez@uab.cat.

²Centro Nacional de Microelectrónica.

Resum

L'alt nombre de pacients en les clíniques de reproducció assistida implica la simultaneïtat de cicles de reproducció independents, que indueixen possibles errors de traçabilitat del material reproductiu. Diverses societats científiques i empreses privades han desenvolupat mecanismes que minimitzen l'impacte d'aquest tipus d'errors, però que no l'aboleixen definitivament. En aquest treball es presenta un nou sistema per a la identificació directa del material reproductiu, basat en la introducció de micropartícules de polisilici codificades (microdispositius) en l'espai perivitellí d'embrions. S'ha comprovat que aquest sistema no afecta la capacitat de desenvolupament preimplantacional *in vitro* dels embrions de ratolí i que la introducció de quatre microdispositius per embrió permet la identificació correcta de més del 95 % dels embrions codificats.

Paraules clau: embrions de ratolí, microdispositius de polisilici.

Abstract

The increasingly high number of patients in assisted reproduction centers implies that independent reproductive cycles are performed simultaneously, leading to possible traceability problems of the reproductive samples. Scientific societies and private companies have developed several mechanisms that minimize the impact of traceability errors but do not abolish it completely. In this work we present a system for the direct identification of the reproductive samples, which is based on the introduction of encoded polysilicon microparticles (microdevices) in the perivitelline space of the embryos. This approach has been tested on mouse embryos and no impact on the *in vitro* preimplantation development has been found. Moreover, the introduction of 4 microdevices per embryo allows the correct identification of over 95% of the coded embryos.

Key words: murine embryo, polysilicon microparticles.

INTRODUCCIÓ

L'alt nombre de pacients que reben les clíniques de reproducció assistida (RA) fa impossible individualitzar totalment el procés i destinar un lloc de treball, emmagatzematge i incubació per a cada mostra. Això implica la simultaneïtat de cicles de reproducció independents, fet que indueix possibles errors en la correcta traçabilitat de les mostres. Aquests errors s'han mostrat, a causa del naixement de nens amb fenotip marcadament diferent al dels pares biològics (Bender, 2003). Probablement casos similars haurien passat desapercebuts en cas de no presentar aquesta evidència per ser detectats (Vince, 2002). Per evitar al màxim aquests errors, societats científiques com

l'European Society for Human Reproduction & Embryology (ESHRE) proposen, en les seves guies de bona pràctica, que tota acció realitzada durant un cas clínic sigui comprovada per una segona persona (Magli *et al.*, 2008). L'aplicació d'aquesta pràctica suposa un augment del personal i, en conseqüència, del cost del procés, però no evita totalment l'error, ja que el control el continua realitzant una altra persona.

Les tendències per solucionar aquest problema es dirigeixen envers l'automatització del procés de reconeixement i verificació de complementarietat de les mostres. Diverses empreses del Regne Unit (IMT Internacional Limited, Research Instruments) comercialitzen productes promoguts per la Human Fertil-

zation and Embryology Authority basats en l'etiquetatge i la identificació automàtica del material de laboratori emprat per a cada cas clínic. Aquestes eines, però, no eliminen el possible error, ja que el material reproductiu ha d'anar canviant de recipient durant el procés. Una possible solució seria idear un marcatge que viatgi amb l'embrió mateix durant tot l'itinerari.

En aquest treball es descriu un possible mètode d'identificació directa d'embrions, a través de la microinjecció de microdispositius de polisilici, material emprat comunament en microelectrònica (Lin *et al.*, 1989), en l'espai perivitellí de zigots de ratolí. Per tal de determinar la validesa d'aquesta aproximació com a sistema de codificació dels embrions, es van estudiar els següents paràmetres: *a*) efecte de la presència del microdispositiu en el potencial de desenvolupament *in vitro* dels embrions, *b*) retenció del microdispositiu en l'espai perivitellí dels embrions durant tot el desenvolupament preimplantacional, *c*) identificació correcta de l'embrió al microscopi mitjançant el codi del microdispositiu i *d*) alliberament del microdispositiu un cop l'embrió eclosiona i es desprèn de la zona pel·lúcida.

MATERIAL I MÈTODES

Els protocols emprats en aquest estudi han estat revisats i aprovats per la Comissió d'Ètica en Experimentació Animal i Humana de la UAB i pel Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca (DARP) de la Generalitat de Catalunya.

Fabricació i característiques dels microdispositius

La fabricació dels microdispositius es va dur a terme al Centro Nacional de Microelectrònica (CNM), combinant tècniques de microelectrònica i microfabricació. Es van utilitzar tres tipus de microdispositius, amb diferents formes, dimensions i sistemes de

codificació binària, amb 256 possibles combinacions cadascun: el microdispositiu de tipus *a*, cilíndric, amb 3 µm de diàmetre i 10 µm de longitud i una codificació de 8 bits basada en entrades i sortides; el microdispositiu de tipus *b*, rectangular, amb dimensions de 6 × 10 µm i una codificació de 8 bits basada en entrades i sortides, i el microdispositiu de tipus *c*, rectangular, amb dimensions de 6 × 10 µm i una codificació de 8 bits basada en orificis (vegeu la figura 1).

Obtenció dels embrions de ratolí

Es van utilitzar zigots de femelles de ratolí B6C-BAF1 (C57BL/C6JxCBA7J) superovulades, creuades i sacrificades 25 hores després de la inducció de l'ovulació. Els embrions alliberats de l'ampolla van ser decumulats amb medi de manipulació mKSOM-H (Biggers *et al.*, 2000) suplementat amb hialuronidasa (156 U/ml). Després de ser rentats amb mKSOM-H, es van mantenir en medi de cultiu KSOM (EmbryoMax, Millipore) a 37 °C i 5 % CO₂.

Microinjecció dels embrions

Per codificar els embrions, els microdispositius es van injectar a l'espai perivitellí dels zigots emprant tècniques de micromanipulació. En una primera sèrie d'experiments, es va microinjectar un sol tipus de microdispositiu per embrió. Un cop seleccionat el microdispositiu més òptim, es va dur a terme una segona sèrie microinjectant fins a quatre microdispositius per embrió.

Cultiu d'embrions i criteris de valoració del sistema de codificació

En cada experiment es va cultivar, en paral·lel als embrions microinjectats, un grup d'embrions no microinjectats com a control de desenvolupament. Ca-

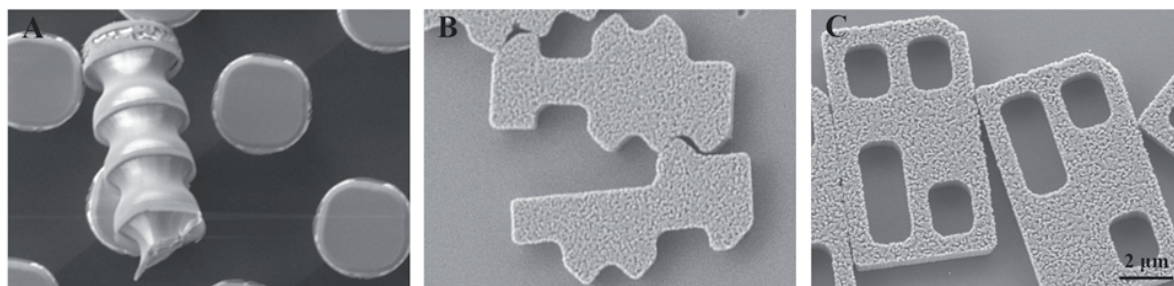


Figura 1. Microdispositius de polisilici visualitzats en el microscopi electrònic de rastreig. A) microdispositiu de tipus *a*; B) microdispositiu de tipus *b*; C) microdispositiu de tipus *c*.

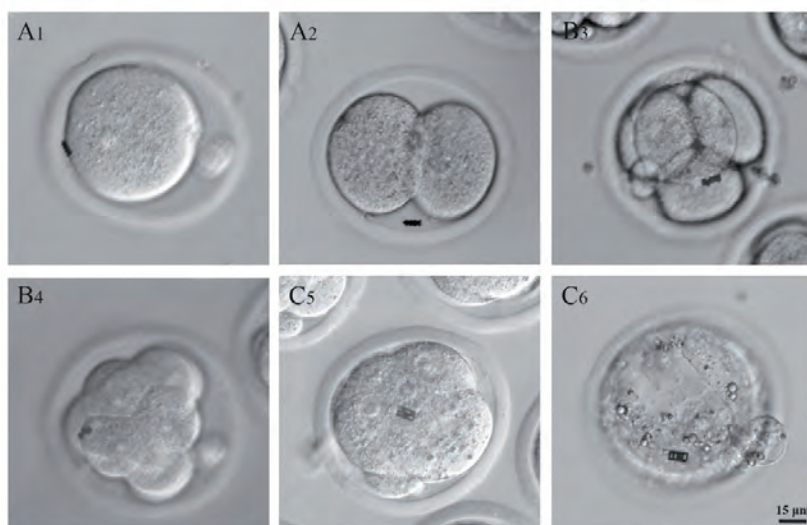


Figura 2. Desenvolupament embrionari en presència de microdispositius de polisilici a l'espai perivitellí. A) embrions en estadi d'una cèl·lula (A1) i de 2 cèl·lules (A2) amb un microdispositiu de tipus *a*; B) embrions en estadi de 4 cèl·lules (B3) i de 8 cèl·lules (B4) amb un microdispositiu de tipus *b*; C) embrions en estadi de mórula (C5) i de blastocist (C6) amb un microdispositiu *c*.

da 24 hores es va valorar l'estadi de desenvolupament de cada grup i, en els cas dels embrions microinjectats, es va valorar també la presència del microdispositiu a l'espai perivitellí (taxa de retenció) i la identificabilitat del codi del microdispositiu (lectura òptica d'almenys un dels microdispositius per embrió). En el cas dels embrions microinjectats amb més d'un dispositiu, es va valorar també l'alliberament dels microdispositius en els blastocists eclosionats (taxa d'alliberament). Tenint en compte que no

tots els embrions cultivats *in vitro* aconsegueixen eclosionar, per tal d'augmentar la mida de la mostra es va digerir amb pronasa (35 U/ml) la zona pellúcida dels embrions que no eren capaços de desprendre's en la seva totalitat de la zona en el moment de l'eclosió.

Anàlisi estadística dels resultats

Es van realitzar tres rèpliques per cada grup. Els re-

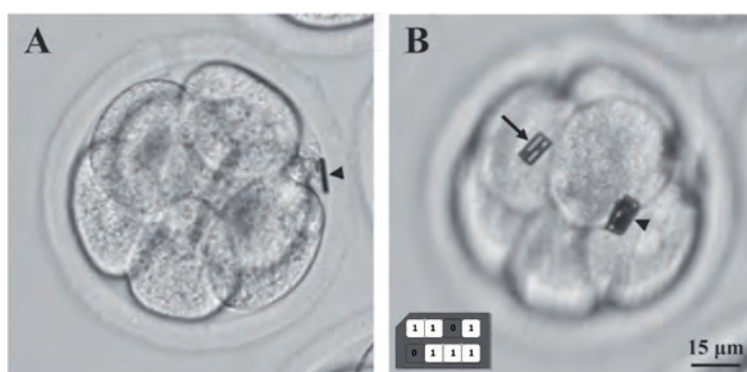


Figura 3. Mecanisme d'identificabilitat embrionària. Embrió en estadi de 8 cèl·lules amb 4 microdispositius de tipus *c* i identificació positiva. A) Enfocament en el pla mitjà de l'embrió, on es pot observar un microdispositiu amb orientació perpendicular al pla d'enfocament (cap de fletxa). B) Pla focal on s'observen dos microdispositius superposats (cap de fletxa) i un microdispositiu llegible correctament (fletxa). En l'*insert* es mostra una representació gràfica del codi del microdispositiu llegible.

Taula 1. Desenvolupament preimplantacional *in vitro* i taxa de retenció en embrions microinjectats amb diferents models de microdispositius

Grups d'embrions	Tipus de microdispositiu	Nre. embrions microinjectats	Nre. blastocists (%)	Taxa de retenció*
Control	–	76	64 (84,2 %)	–
Injectats	<i>a</i>	80	68 (85,0 %)	63 (92,6 %)
	<i>b</i>	80	63 (78,8 %)	59 (93,7 %)
	<i>c</i>	80	66 (82,5 %)	66 (100 %)

* Nombre de blastocists que mantenen el microdispositiu microinjectat

Taula 2. Desenvolupament preimplantacional *in vitro*, taxa de retenció i taxa d'alliberament en embrions microinjectats amb diferent nombre de microdispositius de tipus *c* per embrió

Grups d'embrions	Nre. de microdispositius	Nre. d'embrions microinjectats	Nre. de blastocists (%)	Taxa de retenció*	Taxa d'alliberament**
Control	–	125	108 (86,4 %)	–	–
Injectats	1	80	66 (82,5 %)	66 (100 %) ^a	–
	2	80	70 (87,5 %)	58 (82,5 %) ^b	44 (75,9 %) ^a
	3	80	68 (85,0 %)	57 (83,8 %) ^b	31 (54,4 %) ^b
	4	80	76 (95,0 %)	63 (82,9 %) ^b	11 (17,5 %) ^c

*Nombre de blastocists que mantenen tots els microdispositius microinjectats.

**Nombre de blastocists eclosionats lliures del total de microdispositius microinjectats.

^{a, b, c} Diferents superíndexs indiquen diferències significatives entre les diverses files de la mateixa columna ($p \leq 0,05$)

sultats van ser analitzats mitjançant el test χ^2 , considerant significatius els valors de $p \leq 0,05$.

RESULTATS i DISCUSSIÓ

Selecció del tipus de microdispositiu òptim per a la codificació d'embrions

Per seleccionar el millor tipus de microdispositiu per al desenvolupament del sistema de codificació d'embrions plantejat, es van tenir en compte diferents aspectes. Un dels factors imprescindibles a valorar va ser la viabilitat embrionària, i en comparar els grups d'embrions microinjectats amb diferents tipus de microdispositius amb el grup d'embrions control no es van observar diferències significatives en el seu desenvolupament fins a blastocist (vegeu la taula 1 i la figura 2). Per tant, aquests resultats indiquen que ni el procés de microinjecció ni el microdispositiu mateix de polisilici present a l'espai perivitellí afecten la capacitat de desenvolupament preimplantacional *in vitro* dels embrions.

Un altre dels paràmetres avaluats va ser la retenció del microdispositiu a l'espai perivitellí de l'embrió durant tot el període de cultiu *in vitro*, i no es van detectar diferències significatives entre els diferents models de microdispositius (vegeu la taula 1).

Finalment, i pel que fa a la identificabilitat embrionària, tampoc no es van trobar diferències significatives entre els embrions microinjectats amb els diferents tipus de microdispositius (*a*: 55,6%; *b*: 44,8%; *c*: 45,8%), fet que indica que la forma i el model de codificació dels microdispositius no influeix en la taxa d'identificació embrionària. És important destacar que la identificació del codi dels microdispositius es va dur a terme sense la manipulació dels embrions i modificant el pla focal per simular una hipotètica lectura ràpida mitjançant un sistema automatitzat (vegeu la figura 3). Segurament, si els embrions haguessin estat manipulats per obtenir la correcta orientació del microdispositiu, les taxes d'identificació embrionària haurien arribat al 100 %.

Malgrat que no es van trobar diferències significatives entre els diferents tipus de microdispositius per a cap dels paràmetres analitzats, es va optar per seleccionar el microdispositiu de tipus *c* per continuar amb el desenvolupament d'aquest sistema de codificació, a causa de la seva fàcil lectura.

Millora de les taxes d'identificabilitat embrionària

Un cop identificat el tipus de microdispositiu òptim per a la codificació dels embrions, es va dur a terme una segona sèrie d'experiments per intentar millorar la taxa d'identificabilitat embrionària, partint de la

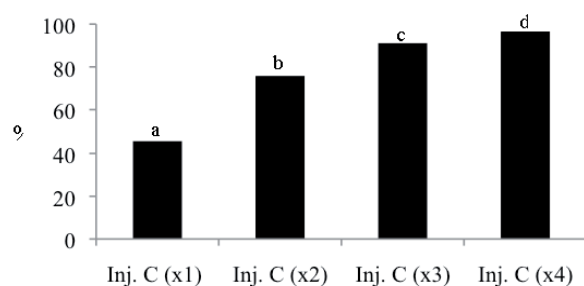


Figura 4. Taxa d'identificabilitat embrionària. Freqüència d'identificabilitat positiva del total d'embrions analitzats en diferents estadis de desenvolupament embrionari, per als embrions marcats amb diferent nombre de microdispositius de tipus *c*. Els diferents superíndexs sobre les columnes (a, b, c, d) indiquen diferències significatives ($p < 0,05$).

suposició que l'augment del nombre de microdispositius per embrió augmentaria significativament aquesta taxa. Així, per assolir l'objectiu d'una identificabilitat embrionària pràcticament total, es van plantejar grups d'embrions microinjectats fins amb quatre microdispositius del tipus *c* per embrió.

L'increment de fins a quatre microdispositius en l'espai perivitellí no va afectar el desenvolupament preimplantacional *in vitro* dels embrions portadors. Pel que fa a la retenció del microdispositiu en l'espai perivitellí, es va detectar que a partir de la introducció de dos microdispositius per embrió, la taxa disminueix significativament fins aproximadament el 83 % i es mantenia al voltant d'aquest valor en augmentar el nombre de microdispositius per embrió (vegeu la taula 2).

Pel que fa a la identificabilitat embrionària, es va comprovar que augmentava significativament en incrementar el nombre de microdispositius per embrió. Es va aconseguir una taxa d'identificabilitat quasi total, amb un 96,5 % d'identificació positiva, amb quatre microdispositius de tipus *c* per embrió (vegeu la figura 4). Així, l'augment del nombre de microdispositius presents a l'espai perivitellí incrementa significativament la probabilitat que almenys un quedi col·locat en una orientació determinada que permeti la seva lectura correcta i, conseqüentment, la bona identificació de l'embrió, sense haver de manipular-lo.

Finalment, es va valorar un factor considerat important amb vista a la possible aplicació d'aquest sistema de codificació en embrions humans: l'alliberament dels microdispositius en els embrions eclosionats. La importància d'aquesta valoració està determinada perquè l'objectiu del sistema de traçabilitat plantejat en aquest estudi és el de mantenir identificat l'embrió durant el seu cultiu *in vitro*, i que un cop sigui transferit a la pacient quedi lliure dels microdispositius. Es va observar que a mesura que augmentava el nombre de microdispositius en l'espai perivitellí dels embrions, major era el nombre d'embrions incapaços de desprendre's de la totalitat dels microdispositius introduïts (vegeu la taula 2).

Així, podem concloure que el sistema de codificació embrionària plantejat demostra la seva validesa, basant-nos en la taxa d'identificació assolida. No obstant això, actualment presenta dos punts febles, com són la baixa taxa d'alliberament dels microdispositius després de l'eclosió, i el fet que el mecanisme de marcatge per micromanipulació suposa un tractament embrionari individualitzat i laboriós. En aquests moments estem treballant en la solució d'aquests aspectes i en el desenvolupament d'altres aproximacions tecnològiques.

BIBLIOGRAFIA

- BENDER, L. (2003). «Genes, parents, and assisted reproductive technologies: ARTs, mistakes, sex, race, and law». *Columbia J. Gen. Law*, 12: 1-76.
- BIGGERS, J. D.; MCGINNIS, L. K.; RAFFIN, M. (2000). «Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium». *Biol. Reprod.*, 63: 281-293.
- LIN, W.; BENSON, K. E. (1989). *Microelectronic materials and processes*. Boston: Kluwer Academic, 1-2.
- MAGLI, M. C.; ABBEEL, E. VAN DER; LUNDIN, K.; ROYERE, D.; ELST, J. VAN DER; GIANAROLI, L.; COMMITTEE OF THE SPECIAL INTEREST GROUP ON EMBRYOLOGY (2008). «Revised guidelines for good practice in IVF laboratories». *Hum. Reprod.*, 23: 1253-1262.
- VINCE, G. (2002). «White IVF couple have twins». *New Scientist* (7 agost).

UN NOU SISTEMA DE CULTIU EN DUES FASES ÉS CAPAÇ D'INCREMENTAR LA POBLACIÓ PUTATIVA DE CÈL·LULES MARE DE LES ESPERMATOGÒNIES, SELECCIONAR-LES I MANTENIR-LES EN UN ESTAT INDIFERENCIAT

Alba Vila, Rita Vassena, Anna Veiga i Juan Carlos Izpisua

Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona.

Dr. Aiguader, 88. 08003 Barcelona. albavilacasademunt@hotmail.com.

Resum

Les cèl·lules mare de les espermatogònies (SSC, *spermatogonial stem cells*) són la població del túbul seminífer amb capacitat d'autorenovació, responsable de l'equilibri entre generació i diferenciació en el procés de formació de cèl·lules germinals durant la maduresa sexual masculina en mamífers. Les SSC mantenen l'índex d'espermatogènesi en un estat estable, mitjançant un equilibri entre generació i diferenciació, procés que es troba críticament lligat a la demanda tissular. Les SSC han estat reconegudes per la seva capacitat de repoblació de testicles estèrils després del seu trasplantament, i podrien arribar a ser utilitzades per a la recuperació de la fertilitat en nens que han superat teràpies que, de manera invasiva, han pogut afectar la seva funció reproductiva (radioteràpia i quimioteràpia). L'entrebanc més important amb el qual ens trobem és l'escassa proporció de SSC que trobem *in vivo*, i la necessitat de realitzar una biòpsia com menys invasiva millor en pacients d'aquestes característiques. Aquí es descriu el desenvolupament d'un sistema de cultiu *in vitro* que permet mantenir la població de SSC en un estat indiferenciat, que n'afavoreix la selecció respecte d'altres tipus cel·lulars i en potencia l'augment proporcional. El protocol de cultiu està compost per dues fases: un cultiu tissular inicial seguit d'un cultiu cel·lular posterior. El primer pas està basat en el cultiu de peces de teixit aprofitant la situació que, *in vivo*, ens trobem en el nínxol on resideixen les cèl·lules mare, situat al compartiment basal dels túbuls. En el segon joc d'experiments, aquest cultiu va ser detingut en un punt temporal específic per tractar les peces de teixit i obtenir-ne una suspensió cel·lular, que va ser posada en cultiu en plaques de laminina.

Paraules clau: cèl·lules mare de les espermatogònies, nínxol.

Abstract

Spermatogonial stem cells (SSCs) are the self-renewing population in the testicular stem cell niche responsible for the continuous spermatogenesis throughout postpuberal male life in mammals. SSCs keep the steady state of spermatogenesis, with a self-renewal and differentiation equilibrium which depends on the demand of the testis. SSCs have been shown to repopulate a sterile testis after a transplant in a number of mammals, and could be used for restoring fertility in children surviving therapies affecting their reproductive function (irradiation and chemotherapy). A mayor hurdle towards achieving this goal is the scarcity of SSCs *in vivo*, and the need to perform the smallest testicular biopsy possible in pediatric patients. We report here the development of an *in vitro* culture system capable to maintain SSCs in an undifferentiated state, favoring their selection against other cell types in the seminiferous tubules, and increasing their overall population. The culture protocol is formed by two subsequent steps, an initial tissue culture phase followed by a cell culture phase. The first step is based in the culture of tissue pieces of seminiferous tubules, taking advantage of the *in vivo* position of stem cell niche. The second step is based in a cell-free simple cell culture system.

Key words: spermatogonial stem cells, niche.

INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

Les cèl·lules mare de les espermatogònies (SSC, *spermatogonial stem cells*) són la població del túbul seminífer del testicle amb capacitat d'autorenovació, responsable de l'equilibri entre generació i diferenci-

ació en el procés de formació de cèl·lules germinals durant la maduresa sexual masculina en mamífers.

A escala cel·lular, l'epiteli seminífer està compost per les cèl·lules germinals (espermatogònies), que proliferen i es diferencien a espermatozoides, procés que es troba críticament lligat a la demanda tissular,

i les cèl·lules somàtiques, o de Sertoli, que sostenen les cèl·lules germinatives mitjançant les seves extensions citoplasmàtiques, englobant els diferents estadis de diferenciació en aquest procés d'espermatogènesi, i intervenint, així, en la seva nutrició i regulació. Una làmina basal separa l'epiteli seminífer del teixit connectiu circumdant. En aquest teixit és on trobem les cèl·lules de Leydig, que produeixen la testosterona.

Estructuralment, el compartiment germinal es pot dividir també en dues fraccions, depenent de la seva situació respecte a la barrera hematotesticular. Aquesta dicotomització es troba en consonància amb el nivell de diferenciació cel·lular.

La població d'espermatogònies es troba adjacent a la membrana basal, fora de la barrera hematotesticular i, per tant, sota la influència dels factors circulants. Són una població força desconeguda de la qual s'ha reconegut, en estudis anteriors en mamífers, una capacitat de repoblació de testicles estèrils després del seu trasplantament. Aquesta possibilitat podria ser utilitzada per a la recuperació de la fertilitat en nens que s'han de sotmetre a teràpies invasives, com podria ser la quimioteràpia o la radioteràpia, les quals poden arribar a afectar la seva fertilitat. Actualment, la taxa de supervivència acumulativa al càncer a Espanya en nens de 0 a 14 anys és del 65 % (font: ACCIS, Automated Childhood Cancer). D'aquesta manera, la malaltia es podria considerar una situació transitòria de l'edat infantil. Els efectes d'aquest procés, però, poden passar a ser permanents, i dificultarien, per tant una vida reproductiva normal.

L'objectiu d'aquest estudi és optimitzar el cultiu de les SSC per aconseguir una població capaç de restaurar la fertilitat en aquests casos. El principal entrebanc que apareix, però, és l'escassa proporció d'aquest tipus cel·lular entre la totalitat de les cèl·lules del testicle. Així, aquest nombre, tenint en compte la quantitat de material obtingut a partir d'una biòpsia testicular, a causa de la impossibilitat lògica de recollir, en humans, grans quantitats d'aquest teixit, seria significativament més reduït.

El nostre objectiu consisteix, d'una banda, a ampliar el nombre de cèl·lules a partir de quantitats molt limitades de material, mitjançant un protocol de cultiu *in vitro* en dues fases, potenciant l'augment proporcional d'aquest tipus cel·lular i mantenint-lo, al mateix temps, en un estat indiferenciat. D'altra banda, se'n pretén afavorir la selecció específica respecte a la resta de tipus cel·lulars.

MATERIALS, MÈTODES I RESULTATS

La primera etapa del protocol es basa en el cultiu de porcions reduïdes de teixit seminífer, intentant mantenir durant un període de temps limitat la situació en la qual es troben les SSC en condicions *in vivo*, en el microambient del seu nínxol, situat en el compartiment basal dels túbuls seminífers, potenciant-ne d'aquesta manera l'expansió.

Es van utilitzar ratolins adults de la soca C57Bl6. El teixit testicular va ser explantat, la túnica albugínia va ser retirada de manera mecànica, i els túbuls seminífers, en porcions d'aproximadament 10-20 µg, es van posar en cultiu reposant sobre una membrana estèril de niló de 70 µm. Per extreure de manera comparativa l'efecte del medi sobre el cultiu, es van testejar tres situacions. Així, es va provar el cultiu en un medi derivat del Stem Pro-34, en DMEM, i en DMEM amb factors de creixement, EGF i GDNF. El GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*), i l'EGF (*epidermal growth factor*), són secretats per les cèl·lules de Sertoli en condicions *in vivo*, i han estat assenyalats com a factors de creixement bàsics per promoure la proliferació de les espermatogònies indiferenciades, tant *in vivo* com *in vitro*.

El cultiu va ser aturat en diferents temps, i els túbuls seminífers van ser digerits per formar una suspensió cel·lular, amb la qual, mitjançant l'anàlisi per FACS (*fluorescence activated cell sorting*), es va poder extreure, de manera percentual, la població Cd90⁺ i Cd49f⁺. Aquests dos marcadors han estat considerats, en nombrosos treballs anteriors, determinants per a la caracterització d'aquesta població en ratolí. Tot que, tal i com s'ha comentat anteriorment, aquest tipus cel·lular no posseeix encara un panell de marcadors estandarditzat per a la caracterització, ja que se'n té poca informació, es va optar per utilitzar aquests dos com a base de classificació fenotípica. A més a més, en el mateix moment, se'n va fer una anàlisi de la viabilitat i de la quantitat de DNA. Aquest disseny experimental ens va permetre determinar la proporció comparativa de cada població cel·lular i la viabilitat del cultiu en el temps, i també identificar el punt en què les considerades SSC presentaven una proporció percentual més elevada. Sis dies després del començament del cultiu la proporció de cèl·lules CD90⁺, viables i diploides, era de 13 + 6,4, 22 + 12,4 i 35,2 + 6,8 en SP34, DMEM, i DMEM + EGF + GDNF, respectivament ($p < 0,05$). El dia 10 els valors eren de 10 + 3,5, 19 + 4,7 i 37 + 3,2, respectivament ($p < 0,01$). El dia 12, però, les cèl·lules van començar a perdre ràpida-

ment la viabilitat i el percentatge de cèl·lules Cd90⁺ va caure fins a un 5 % en tots els tractaments. Les SSC recollides els dies 6 i 10 eren viables i podien ser cultivades *in vitro*.

En la segona etapa del protocol, quan el punt temporal màxim de la població Cd90⁺ i Cd49f⁺ va ser determinat, les porcions tissulars van ser digerides i sotmeses a successius rentatges. Així mateix, es va sotmetre la suspensió cel·lular, mitjançant l'ús d'anticossos contra Cd49f, al MACS (*magnetic activated cell sorting*), amb el qual es va aconseguir una suspensió cel·lular més homogènia. Aquests rentatges van ser posats en cultiu en plaques amb laminina en un medi derivat del Stem Pro 34 amb factors de creixement additius.

Els resultats obtinguts mostren que és possible mantenir el compartiment basal en unes condicions correctes aproximadament durant deu dies *in vitro*. Les cèl·lules d'aquest compartiment, les SSC putatives, augmenten en percentatge entre els dies 6 i 9, però la viabilitat del cultiu a partir d'aquest punt disminueix de manera irreversible, a causa de l'estrès i de la situació d'hipòxia a la qual estan sotmeses. L'augment substancial del nombre de cèl·lules obtingudes permet plantejar la possibilitat del trasplanta-

ment per demostrar la seva capacitat de repoblar testicles estèrils en ratolí i seguir els estudis extrapolant-los a humans.

BIBLIOGRAFIA

- CONRAD, S.; RENNIGER, M.; HENNENLOTTER, J. [*et al.*] (2008). «Generation of pluripotent stem cells from adult human testis». *Nature*, 456(7220): 344-349.
- DHUP, S.; MAJUMDAR, S. S. (2008). «Transgenesis via permanent integration of genes in repopulating spermatogonial cells *in vivo*». *Nat. Methods*, 5(7): 601-603.
- JAHNUKAINEN, K.; EHMCKE, J.; NURMIO, M. [*et al.*] (2007). «Irradiation causes acute and long-term spermatogonial depletion in cultured and xenotransplanted testicular tissue from juvenile nonhuman primates». *Endocrinology*, 148(11): 5541-5548.
- NURMIO, M.; TOPPARI, J.; KALLIO, J. [*et al.*] (2009). «Functional *in vitro* model to examine cancer therapy cytotoxicity in maturing rat testis». *Reprod. Toxicol.*, 27(1): 28-34.
- OATLEY, J. M.; AVILA, D. M. DE; REEVES, J. J. [*et al.*] (2004). «Testis tissue explant culture supports survival and proliferation of bovine spermatogonial stem cells». *Biology of Reproduction*, 70(3): 625-631.

GENERACIÓN DE CÉLULAS PLURIPOTENTES ESPECÍFICAS DE PACIENTE

Ignasi Rodríguez-Pizà,¹ Ángel Raya,^{2,3,4} Alessandra Giorgetti,¹ Rita Vassena,¹ Anna Veiga^{1,5}
y Juan Carlos Izpisua^{2,6}

¹Banc de Cèl·lules mare, Centre de Medicina Regenerativa, Barcelona.

Dr. Aiguader, 88. 08003 Barcelona. irodriguez@cmrb.eu.

²Centre de Medicina Regenerativa, Barcelona.

³Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats.

⁴Networking Center of Biomedical Research in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine.

⁵Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus.

⁶Gene Expression Laboratory, Salk Institute for Biological Studies.

Resumen

La generación de células madre de pluripotencialidad inducida (iPSC) mediante la expresión ectópica de una batería definida de factores ha permitido la derivación de células pluripotentes específicas de paciente y proporciona valiosas plataformas experimentales para modelos de enfermedades humanas. Las iPSC específicas de paciente presentan un gran potencial terapéutico, a pesar de que aun no se ha demostrado una evidencia directa de este hecho.

Palabras clave: iPSC, hESC, reprogramación celular, anemia de Fanconi

Abstract

The generation of induced pluripotent stem (iPS) cells by ectopic expression of a defined set of factors has enabled the derivation of patient-specific pluripotent cells and provided valuable experimental platforms to model human disease. Patient specific iPS cells are also thought to hold great therapeutic potential, although direct evidence for this is still lacking.

Key words: iPSC, hESC, cellular reprogramming, Fanconi anaemia.

Durante los últimos años, la comunidad científica ha puesto gran esfuerzo en estudiar la biología y los mecanismos de diferenciación de las células madre embrionarias humanas (hESC), ya que éstas ofrecen una gran esperanza terapéutica para muchas enfermedades de déficit de función celular. El posible uso de estas células en terapia clínica planteaba un problema de incompatibilidad inmunitaria, así como un conflicto de ética social. Sin embargo, muy recientemente, la generación de células con pluripotencia inducida (iPSC) permite proponer la obtención de células pluripotentes específicas de paciente que solucionarían ambos problemas. Las iPSC específicas de paciente, además, ofrecen una herramienta muy valiosa para el estudio de diferentes modelos de enfermedad. En la actualidad han sido descritos numerosos métodos para la reprogramación de células somáticas a iPSC. Los primeros métodos implicaban la utilización de combinaciones de 3 ó 4 vectores vi-

rales portadores de factores de transcripción tales como Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, LIN-28 y Nanog (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007).

En nuestro laboratorio hemos puesto recientemente a punto un protocolo para la generación rápida y eficaz de iPSC a partir de queratinocitos epidérmicos humanos (Aasen *et al.*, 2008). Utilizando esta metodología, así como protocolos optimizados para la reprogramación de fibroblastos, hemos generado iPSC portadoras de enfermedades concretas tales como la anemia de Fanconi y la aciduria glutárica de tipo I. Para ello, se aislaron fibroblastos o queratinocitos de pacientes portadores de ambas enfermedades y fueron infectados con una mezcla de sobrenadantes retrovirales de OCT4, SOX2 y KLF4, con o sin c-MYC. Tras 30-45 días las colonias con morfología compatible con iPSC fueron subcultivadas y expandidas. Las líneas obtenidas mostraron silenciamiento de los transgenes retrovirales y reprogramación transcripcional y epigenética hasta un estado de pluripotencia. Asimismo, el comporta-

miento de estas líneas de iPSC específicas de paciente es esencialmente indistinguible de hESC, tanto en su capacidad de proliferación como de diferenciación *in vitro* y formación de teratomas en ratones inmunodeficientes.

La generación de líneas de iPSC específicas de pacientes portadores de enfermedades genéticas permite el estudio individualizado de las enfermedades de estos pacientes, así como su corrección *in vitro*, haciendo posible una eventual terapia celular con las propias células del paciente. De esta manera se evitaría el rechazo inmunitario, pues se trataría de células compatibles genéticamente. Además, al ser células pluripotentes, las iPSC presentan una capacidad de proliferación ilimitada y esto garantiza la aportación de material suficiente para la corrección de dichas enfermedades.

La utilización de vectores virales para la reprogramación inducida plantea problemas de seguridad biológica que hacen imposible su aplicación en terapia clínica. Estos problemas están relacionados con la integración del material genético exógeno en el genoma de las células infectadas, ya que al integrarse puede alterar el funcionamiento de genes norma-

les e inducir un riesgo de oncogénesis insercional. También existe el riesgo de la reactivación de los transgenes utilizados, algunos de ellos potentes oncogenes, con el consiguiente riesgo añadido de oncogénesis. En la actualidad, se ha conseguido la generación de iPSC murinas mediante métodos no integrativos (Okita *et al.*, 2007) y la meta actual es la obtención de iPSC humanas mediante métodos similares, permitiendo de esta manera crear células pluripotentes con un alto grado de seguridad.

BIBLIOGRAFÍA

- AASEN, T. [*et al.*] (2008). «Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes». *Nat. Biotechnol.*, 26: 1276-1284.
- OKITA, K. [*et al.*] (2007). «Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells». *Nature*, 448: 313-317.
- TAKAHASHI, K. [*et al.*] (2007). «Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors». *Cell*, 131: 861-872.
- YU, J. [*et al.*] (2007). «Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells». *Science*, 318: 1917-1920.

RESULTATS CITOGENÈTICS EN DONANTS D'OÒCITS

Ramon Batallé, Marta Solà, Raquel Romero i M. Rosa Martorell

Unitat de Reproducció Humana i Diagnòstic Genètic, Clínica Girona.

Joan Maragall, 26, 1a planta. 17002 Girona. labgen@girofv.com.

Resum

Presentem un estudi citogenètic realitzat en dones donants d'oòcits a la Unitat de Reproducció Humana i Diagnòstic Genètic de la Clínica Girona durant els anys 1997-2008. Durant aquest període s'han realitzat 3.379 cariotips de donants en mostres de sang perifèrica, dels quals 3.356 (99,3 %) eren cariotips normals i 23 presentaven anomalies cromosòmiques. S'han considerat normals tots els polimorfismes, tal com l'ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) actual, de l'any 2005, recomana. Tot i que el nombre de cariotips anòmals en donants d'oòcits és el poblacional i, per tant, baix, es recomana realitzar sempre un cariotip abans de l'ús d'aquests oòcits en les tècniques de reproducció assistida.

Paraules clau: citogenètica, donants d'oòcits, anomalies cromosòmiques.

Abstract

Here we present a cytogenetic study carried out on oocyte donors from Unitat de Reproducció Humana i Diagnòstic Genètic Clínica Girona between 1997 and 2008. During this period, we analysed 3,379 donor karyotypes from peripheral blood lymphocytes, of which 3,356 (99.3%) were normal karyotypes and 23 presented chromosomal abnormalities. We considered all the polymorphisms to be normal, as the current ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature), year 2005, advises. Although the number of abnormal karyotypes in oocyte donors is as low, as would be expected of any normal person, we nevertheless recommend performing a karyotype study before using these oocytes in assisted reproductive technologies.

Key words: cytogenetic, oocyte donors, chromosomal abnormalities.

La donació d'oòcits ha anat augmentant al llarg dels anys a mesura que les tècniques en reproducció assistida milloraven i n'augmentava la demanda. Per assegurar l'èxit dels tractaments de fertilitat s'ha de garantir un mínim de qualitat en els oòcits quan és necessària la donació. Una de les proves més comunes de realitzar en les donants d'òvuls és el cariotip. Gràcies a aquesta prova podrem disminuir els riscos d'obtenir oòcits cromosòmicament anòmals que posin en perill la viabilitat dels embrions resultants i, per tant, l'èxit del tractament de fertilitat. A la Unitat de Reproducció Humana i Diagnòstic Genètic de la Clínica Girona s'han realitzat 3.379 cariotips de do-

nants en mostres de sang perifèrica durant els anys 1997-2008. Les edats de les donants estaven compreses entre 18 i 35 anys. Del total de cariotips realitzats, uns 3.356 (99,3 %) eren normals, tal com es veu a la figura 1, i 23 cariotips presentaven anomalies cromosòmiques (vegeu-ne un exemple a la figura 2). La baixa incidència d'anomalies cromosòmiques trobada en la nostra sèrie, en comparació d'altres autors (Ravel *et al.*, 2007; Wallerstein *et al.*, 1998), podria estar relacionada amb el nombre total de cariotips estudiats. A més, en la nostra sèrie, tal com l'ISCN actual, de l'any 2005, recomana, s'han considerat normals tots els polimorfismes de les re-

Taula 1

Anomalies cromosòmiques (23)	Total (%)	Tipus d'anomalia
Numèriques	11 (47,8 %)	TX (2) +mar (1) Mosaics gonosomals (8)
Estructurals	12 (52,2 %)	Translocacions recíproques (5) Translocacions robertsonianes (4) Inversions (3)

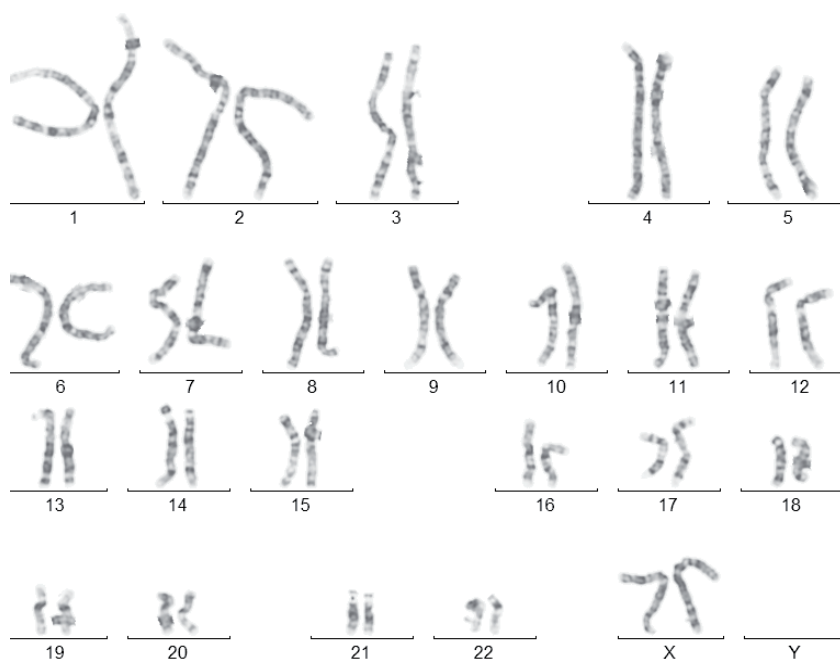


Figura 1. Cariotip normal: 46, XX.

gions heterocromàtiques dels cromosomes 1, 9, 16 i Y, així com les variacions dels satèl·lits dels cromosomes dels grups D i G. Tot i això, hem considerat oportú comptabilitzar dins del grup de cariotips normals els casos d'inversions del cromosoma 9, a causa de l'existència d'estudis que la relacionen amb infertilitat. Així, la inversió del cromosoma 9 amb diferents punts de trencament s'ha observat en 38 casos, fet que representa un 1,1 % dels casos de nor-

malitat. Aquesta dada és molt semblant a l'1,01 % observat per altres autors (Demirhan *et al.*, 2008).

Quant a anomalies cromosòmiques, s'han trobat 11 casos d'anomalies numèriques i 12 casos d'anomalies estructurals, de les quals 5 casos són translocacions recíproques, 4 casos són translocacions robertsonianes i 3 casos inversions cromosòmiques (vegeu la taula 1).

Com a conclusió podem dir que, tot i que les do-

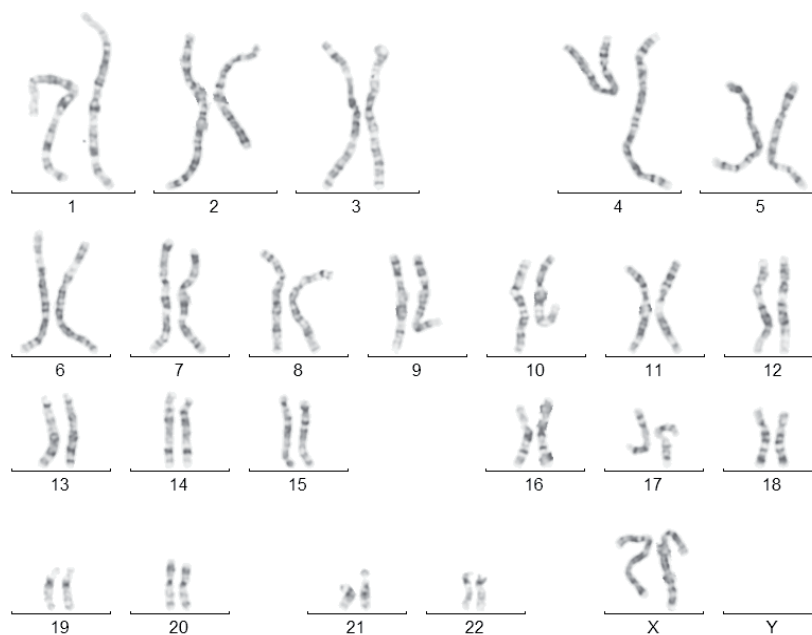


Figura 2. Exemple de cariotip anòmal: 46,XX,t(2;4)(q13;q27).

nant d'òocits són considerades fenotípicament normals i, per tant, el risc d'anomalies cromosòmiques és el poblacional, cal remarcar la rellevància d'efectuar un cariotip convencional sistemàticament.

BIBLIOGRAFIA

- DEMIRHAN, O.; PAZARBASI, A.; SULEYMANOVA-KARAHAN, D.; TANRIVERDI, N.; KILIN, Y. (2008). «Correlation of clinical phenotype with a pericentric inversion of chromosome 9 and genetic counseling». *Saudi Med. J.*, 29(7): 946-951.
- ISCN (2005). *An international system for human genetic nomenclature*. SHAFFER, L. G.; TOMMERUP, N. [ed.]. Basilea: Karger.
- RAVEL, C.; LETUR, H.; LANNOU, D. LE; BARTHÉLÉMY, C.; BRESSON, J. L.; SIFFROI, J. P.; GENETICS COMMISSION OF THE FRENCH FEDERATION OF CECOS (2007). «High incidence of chromosomal abnormalities in oocyte donors». *Fertil. Steril.*, 87(2): 439-441.
- WALERSTEIN, R.; JANSEN, V.; GRIFO, J. A.; BERKELEY, A. S.; NOYES, N.; LICKER, J.; LICCIARDI, F. (1998). «Genetic screening of prospective oocyte donors». *Fertil. Steril.*, 70(1): 52-55.

LA FERTILITAT PROVADA DE LES DONANTS D'OÒCITS ÉS UN FACTOR PREDICTIU D'EMBARÀS EN LES RECEPTORES?

Laia Echeverria,¹ Elisabet Clua,¹ Montse Boada,¹ Laura Mateo,¹ Anna Veiga^{1,2}
i Buenaventura Coroleu¹

¹Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció de l'USP Institut Universitari Dexeus.
Gran Via Carles III, 71-75. 08028 Barcelona. laiech@dexeus.com.

²Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB).

Resum

Introducció: L'ús de la donació d'oòcits i l'abast de les seves aplicacions han anat en augment en els últims anys. Per aquest motiu, s'han realitzat diferents estudis per aconseguir millorar la tècnica i obtenir millors taxes d'embaràs. **Objectiu:** Comprovar si en el programa de donació d'oòcits de l'Institut Universitari Dexeus hi ha diferències significatives entre les taxes d'embaràs de pacients receptores d'oòcits procedents de donants amb fertilitat provada (parts, avortaments espontanis o ILE) i les de receptores d'oòcits de donants nulligràvides. **Material i mètodes:** Estudi retrospectiu que inclou un total de 605 cicles sincrònics procedents de 504 donants. **Resultats:** En 294 (48,6 %) cicles es van rebre oòcits procedents de donants amb fertilitat provada i es va aconseguir embaràs en 158 (53,7 %) dels casos. Els 311 cicles restants procedien de donants nulligràvides i s'aconseguien 172 embarassos (55,3 %). **Conclusió:** En aquest estudi, la fertilitat anterior de la donant no és un factor predictiu d'embaràs per a les receptores.

Paraules clau: donació d'oòcits, fertilitat anterior, taxa d'embaràs.

Abstract

Introduction: Donor oocyte programmes have increased their activity in the last years. Some reports have been published regarding possible improvement of the results obtained with this technique. **Objective:** To determine if there are significant differences between pregnancy rates in recipients that receive oocytes from donors with proven fertility compared to the ones from nulligravid donors. **Materials and methods:** Retrospective study about 605 synchronous cycles from 504 donors. **Results:** In 294 (48.6%) cycles, oocytes from proven fertility donors gave rise to 158 pregnancies (53.7%). One hundred and seventy-two pregnancies (55.3%) were achieved in the 311 remaining cases from nulligravid donors. **Conclusion:** In our study, the proven fertility of the donor is not a predictive factor for outcome in oocyte recipients.

Key words: oocyte donation, proven fertility, pregnancy rates.

INTRODUCCIÓ

Des que el 1984, Lutjen *et al.* van descriure el primer embaràs mitjançant donació d'oòcits en una dona de 25 anys amb disfunció ovàrica prematura, l'aplicació d'aquesta tècnica s'ha estès a moltes altres indicacions. Actualment, és l'alternativa que es planteja a dones amb baixa reserva fol·licular, amb poca resposta a l'estimulació, amb desordres genètics que no es poden tractar mitjançant DGP, a dones que pateixen avortaments de repetició, pacients amb fallides de cicles de FIV o per a aquelles dones que han superat un càncer i no han preservat la fertilitat.

Entre els factors descrits que condicionen els re-

sultats d'un programa de donació es troba l'edat de la donant, l'edat de la receptora i el nombre d'oòcits. Alguns estudis veuen la fertilitat de la donant com a variable que pot afectar l'eficàcia de la donació.

L'objectiu d'aquest estudi és comprovar si en el programa de donació de l'Institut Universitari Dexeus hi ha diferències significatives entre les taxes d'embaràs de pacients que han rebut oòcits de donants amb fertilitat provada (parts, avortaments espontanis o interrupcions legals de l'embaràs (ILE)) i les que han rebut oòcits procedents de donants nulligràvides.

MATERIAL I MÈTODES

Anàlisi retrospectiva de 605 cicles de donació sincrònica procedents de 504 donants entre març de 2005 i desembre de 2007 a l'Institut Universitari Deixus (Barcelona).

Donants: Les donants incloses complien els requisits clínics i legals requerits per la llei espanyola de TRA (Llei 14/2006). Les donacions eren anònimes i l'edat de la donant podia estar entre els 18 i els 35 anys.

Tant el cribratge com el tractament d'estimulació realitzat a la donant es van fer segons els protocols del nostre centre (Martínez *et al.*, 2008).

Receptores: Tant a les dones amb disfunció ovàrica com a les que presentaven funció ovàrica se'ls va preparar l'endometri amb pauta hormonal substituïda (Martínez *et al.*, 2006).

Els oòcits es van assignar considerant les característiques immunitàries i fenotípiques de les receptores.

Després de la punció, es va realitzar FIV o ICSI en funció de la qualitat del semen de la parella de la receptora i es va dur a terme la transferència ecoguiada dels embrions (Coroleu *et al.*, 2006), en D+2 o D+3.

La determinació de la gonadotropina coriònica humana (β -hCG) en plasma o orina per a detecció de l'embaràs es realitzà 12-14 dies després de la transferència. El tractament s'aturava si el resultat era negatiu; si aquest era positiu la receptora continuava amb el tractament i es realitzava una ecografia a les 6-7 setmanes per confirmar que es tractava d'un embaràs no bioquímic mitjançant la visualització del sac embrionari amb batec cardíac.

En l'anàlisi estadística s'han comparat les variables qualitatives o ordinals amb la prova exacta de Fisher o el test χ^2 . Per comparar les mitjanes es va utilitzar la *t* de Student. Tots els tests han estat bilaterals amb un nivell de significació $\alpha = 0,05$.

RESULTATS

La mitjana d'edat de les donants fou de $27,4 \pm 4,5$ anys, mentre que la mitjana d'edat de les receptores era de $41,7 \pm 5,7$ anys. Dels 605 cicles, 294 procedien de donants amb antecedents de fertilitat provada, com ara parts, avortaments espontanis o interrupcions legals de l'embaràs (ILE) i 311 de donants nul·ligràvides. S'han obtingut 330 embarassos, fet que representa una taxa d'embaràs global del 54,5 % (53,7 % i 55,3 % per a oòcits procedents de donants

amb fertilitat provada vs. nul·ligràvides, respectivament). Les diferències entre els dos grups no són estadísticament significatives (vegeu la taula 1).

En la taula 2 s'analitzen les característiques de les donants i receptores en funció de si s'ha obtingut o no embaràs. Els resultats indiquen que no hi ha diferències significatives segons l'edat de la donant o l'edat de la receptora, la dosi de gonadotropines administrada, la concentració d'estradiol el dia de l'administració de HCG o el nombre d'oòcits recuperats en el tractament de la donant.

DISCUSSIÓ

S'han realitzat nombrosos estudis sobre quines característiques de les donants donen millor taxa d'embaràs en les receptores d'oòcits: edat, nivells hormonaals, tractaments d'estimulació realitzats, paràmetres oocitaris i embarassos anteriors, entre d'altres.

En el nostre estudi observem que no existeix significació estadística entre taxa d'embaràs i fertilitat anterior de la donant. Aquests resultats coincideixen amb les conclusions de Faber *et al.* (1997), Shulman *et al.* (1999) i Cohen *et al.* (1999), però es contradueixen amb els estudis de Darder *et al.* (1996), que conclouen que la fertilitat de la donant sí que és un factor predictiu d'embaràs, però només en els casos en què la donació d'oòcits és total i no en el cas de pacients de FIV que cedeixen els seus oòcits sobrants.

En el nostre estudi, no s'observen diferències en la taxa d'embaràs en funció de la mitjana d'edat de la donant, malgrat que altres autors informen de diferències significatives i associen una edat de la donant més avançada amb una pitjor qualitat oocitària, qualitat embrionària i majors taxes d'aneuploidies (Faber *et al.*, 1997; Cohen *et al.*, 1999).

Respecte a l'edat de les receptores, no es troben diferències significatives entre la taxa d'embaràs i l'edat de les receptores, igual com publiquen Toner *et al.* (2002), Mirkin *et al.* (2003) i Bodri *et al.* (2007), tot i que altres estudis defensen que un factor uterí podria estar relacionat amb l'edat de la pacient i podria implicar pitjors taxes d'embaràs (Shulman *et al.*, 1999; Soares *et al.*, 2005).

Segons el nostre estudi, la fertilitat prèvia de les donants no hauria de ser motiu indispensable per a l'acceptació d'una donant, ja que no observem que aquest paràmetre tingui una significança estadística pel que fa a la possibilitat d'obtenció d'embaràs.

Taula 1. Embaràs en funció de la fertilitat anterior de la donant

Embaràs	Cicles de donants gràvides (n = 294)	Cicles de donants nulligràvides (n = 311)	p-valor
Sí	158 (53,7 %)	172 (55,3 %)	n.s.
No	136 (46,3 %)	139 (44,7 %)	n.s.

Taula 2. Relació entre els diferents paràmetres estudiats segons l'embaràs

Variables	Embaràs		p-valor
	Sí (n = 330)	No (n = 275)	
\bar{x} edat de la donant	27,3 ± 4,6	27,6 ± 4,5	n.s.
\bar{x} dosi gonadotrofines (UI)	2.089,3 ± 913,5	1.996,7 ± 825,2	n.s.
\bar{x} E2 dia de HCG (pg/ml)	1.984,7 ± 1.000,2	1.941,9 ± 1.013,6	n.s.
\bar{x} d'òocits recuperats per donant	16,7 ± 7,4	15,6 ± 7,4	n.s.
\bar{x} edat de la receptora	41,8 ± 5,9	41,6 ± 5,3	n.s.
\bar{x} òocits assignats per receptora	11,9 ± 3,9	11,6 ± 3,7	n.s.

BIBLIOGRAFIA

- BODRI, D.; COLODRON, M.; VIDAL, R.; GALINDO, A.; DURBAN, M.; COLL, O. (2007). «Prognostic factors in oocyte donation: an analysis through egg-sharing recipient pairs showing a discordant outcome». *Fertil. Steril.*, 88(6): 1548-1553.
- COHEN, M. A.; LINDHEIM, S. R.; SAUER, M. V. (1999). «Donor age is paramount to success in oocyte donation». *Hum. Reprod.*, 14(11): 2755-2758.
- COROLEU, B.; BARRI, P. N.; CARRERAS, O.; BELIL, I.; BUXADERAS, R.; VEIGA, A.; BALASCH, J. (2006). «Effect of using an echogenic catheter for ultrasound-guided embryo transfer in an IVF programme: a prospective, randomized, controlled study». *Hum. Reprod.*, 21(7): 1809-1815.
- DARDER, M. C.; EPSTEIN, Y. M.; TREISER, S. L.; COMITO C. E.; ROSENBERG, H. S.; DZINGALA, L. (1996). «The effects of prior gravidity on the outcomes of ovum donor and own oocyte cycles». *Fertil. Steril.*, 65(3): 578-582.
- FABER, B. M.; MERCAN, R.; HAMACHER, P.; MUASHER, S. J.; TONER, J. P. (1997). «The impact of an egg donor's age and her prior fertility on recipient pregnancy outcome». *Fertil. Steril.*, 68(2): 370-372.
- MARTÍNEZ, F.; BOADA, M.; COROLEU, B.; CLUA, E.; PARERA, N.; RODRÍGUEZ, I.; BARRI, P. N. (2006). «A prospective trial comparing oocyte donor ovarian response and recipient pregnancy rates between suppression with gonadotrophin-releasing hormone agonist (GnRHa) alone and dual suppression with a contraceptive vaginal ring and GnRH». *Hum. Reprod.*, 28(8): 2121-2125.
- MARTÍNEZ, F.; CLUA, E.; PARERA, N.; RODRÍGUEZ, I.; BOADA, M.; COROLEU, B. (2008). «Prospective, randomized, comparative study of leuprorelin + human menopausal gonadotropins versus ganirelix + recombinant follicle-stimulating hormone in oocyte donors and pregnancy rates among the corresponding recipients». *Gynecol Endocrinol.*, 24(4): 188-193.
- MIRKIN, S.; GARCIA, T.; BOVEA, C.; STADTMAUER, L.; GIBBONS, W. E.; OEHNINGER, S. (2003). «Factors associated with an optimal pregnancy outcome in an oocyte donation program». *J. Ass. Reprod. Gen.*, 20(10): 400-408.
- SHULMAN, A.; FRENKEL, Y.; DOR, J.; LEVRAN, D.; SHIFF, E.; MASCHIACH, S. (1999). «The best donor». *Hum. Reprod.*, 14(10): 2493-2496.
- SOARES, S. R.; TRONCOSO, C.; BOSCH, E.; SERRA, V.; SIMÓN, C.; REMOHÍ, J.; PELLICER, A. (2005). «Age and uterine receptiveness: predicting the outcome of oocyte donation cycles». *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90(7): 4399-4404.
- TONER, J. P.; GRAINGER, D. A.; FRAZIER, L. M. (2002). «Clinical outcomes among recipients of donated eggs: an analysis of the US national experience, 1996-1998». *Fertil. Steril.*, 78(5): 1038-1045.

FRAGMENTACIÓ DEL DNA ESPERMÀTIC EN PORTADORS DE REORGANITZACIONS CROMOSÒMIQUES

Agustín García-Peiró,¹ Maria Oliver-Bonet,¹ Joaquina Navarro,¹ Carlos Abad,² Miriam Guitart,² Maria José Amengual² i Jordi Benet¹

¹Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra. jordi.benet@uab.es, agusti.garcia@uab.es.

²Corporació Sanitària Parc Taulí.

Resum

S'ha determinat la fragmentació del DNA espermàtic en portadors de reorganitzacions cromosòmiques ($n = 11$) i s'ha caracteritzat l'evolució de la fragmentació incubant cada mostra a 37 °C durant diferents temps (0, 1, 4, 8 i 24 hores). Els mètodes emprats van ser TUNEL, SCSA i SCDt. A temps 0 h, l'índex de fragmentació del DNA (%DFI) va ser significativament major ($p = 0,025, 0,022$ i $0,014$, respectivament) en el grup dels portadors ($24,18 \pm 9,8, 24,36 \pm 10,8$ i $24,81 \pm 12,60$) que en el grup control ($n = 8$) ($15,12 \pm 3,52, 13,75 \pm 5,80$ i $13,12 \pm 4,42$). Aquests resultats preliminars suggereixen que la fragmentació del DNA s'hauria d'avaluar per determinar l'estat de fertilitat en aquests pacients. L'evolució del dany del DNA podria estar relacionada amb la presència i característiques pròpies de cada tipus de reorganització cromosòmica. Més estudis són necessaris per aclarir les causes responsables d'aquest increment en la fragmentació del DNA espermàtic.

Paraules clau: TUNEL, SCSA, SCDt, reorganitzacions cromosòmiques, fragmentació del DNA.

Abstract

DNA integrity in the sperm has been determined in chromosomal reorganization carriers ($n = 11$) and the evolution of fragmentation in different periods of storage at 37 °C (0, 1, 4, 8 and 24 hours) has also been characterized. Methods used were TUNEL, SCSA and SCDt. At time 0 h, DNA fragmentation index (%DFI) were statistical increased ($p = 0.025, 0.022$ and 0.014 , respectively) in the carriers group ($24.18 \pm 9.8, 24.36 \pm 10.8$) respect to the control group ($n = 8$) ($15.12 \pm 3.52, 13.75 \pm 5.80$ and 13.12 ± 4.42). These preliminary results suggest that DNA fragmentation should be evaluated in reorganization carriers and it should be considered in order to establish fertility status in these patients. DNA damage evolution could be related to the presence and characteristics of each type of chromosome rearrangement. Further investigations should help to elucidate the responsible causes for the increased sperm DNA fragmentation in these patients.

Key words: TUNEL, SCSA, SCDt, chromosomal reorganizations, DNA fragmentation.

INTRODUCCIÓ

Nombrosos estudis posen de manifest que en individus infèrtils és més freqüent trobar espermatozoides amb el DNA fragmentat que no pas en els que són fèrtils (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2002). Establir un valor predictiu de fertilitat mitjançant diferents tècniques en relació als diferents tractaments de reproducció assistida ha esdevingut un objectiu en els últims anys. En aquest sentit, els treballs en relació al valor predictiu d'aquesta variable són sovint contraposats (Lewis i Agbaje, 2008; Lin *et al.*, 2008). Segons una recent metaanàlisi, els valors de fragmentació que es

relacionen amb la infertilitat estarien entre el 30-40 % (Evenson i Wixon, 2008). No obstant això, valors superiors al 20 % podrien indicar una situació anormal (Erenpreiss *et al.*, 2006). Entre els diferents mètodes utilitzats, trobem l'assaig TUNEL (*terminal transferase dUTP nick-end labelling*), el mètode ISNT (*in situ nick translation*), l'assaig SCSA (*sperm chromatin structure assay*), l'assaig Comet i, més recentment, el SCDt (*sperm chromatin dispersion test*). Encara que no existeix uniformitat de criteris sobre les diferents metodologies a l'hora de realitzar l'anàlisi, a causa de la manca de normalització en els protocols i a l'existència de diferents factors que poden influir en el resultat, (Domínguez-Fandos

et al., 2007; Muratori *et al.*, 2008) s'ha trobat, no obstant això, una bona correlació entre el TUNEL, el SCSA i el SCDt (Chohan *et al.*, 2006). Els principals mecanismes implicats en la fragmentació del DNA de l'espermatozoide són l'estrès oxidatiu, alteracions durant la transició histones-protamines i certes formes indeterminades d'apoptosi (Aitken *et al.*, 2009).

A més, l'exposició a contaminació industrial, el tabac, tenir un elevat índex de massa corporal, tenir una edat avançada o determinades infeccions urogenitals, o pertànyer a uns grups determinats de pacients, com ara pacients amb varicocele, criptorquídia, càncer i portadors de reorganitzacions cromosòmiques, pot suposar presentar un increment en el percentatge d'espermatozoides amb el DNA fragmentat (Gosálvez *et al.*, 2008).

En aquest treball s'ha volgut determinar la fragmentació del DNA d'espermatozoides en portadors de reorganitzacions cromosòmiques i comparar els valors obtinguts amb donants fèrtils. Aquest estudi s'ha realitzat amb tres mètodes diferents (TUNEL, SCSA i SCDt), per tal de comprovar si hi ha correlació entre aquestes tres metodologies.

MATERIAL I MÈTODES

S'han analitzat mostres de semen d'un total d'onze portadors de reorganitzacions cromosòmiques (dues inversions i nou translocacions recíproques). El grup control va estar integrat per mostres de vuit homes amb seminograma normal i paternitat recent. Totes les mostres van ser incubades en un bany a 37 °C i la

fragmentació del DNA es va mesurar a temps 0, 1, 4, 8 i 24 hores. El mètode TUNEL es va realitzar fent servir el *kit* de Roche (Ref. 11684795910, Roche Diagnostic, Penzberg, Alemanya). En aquesta tècnica un enzim transferasa incorpora un nucleòsid conjugat amb un compost fluorescent allà on hi ha un extrem 3' a la cadena del DNA, i la fluorescència és detectada amb citometria de flux. El SCSA es va realitzar seguint les indicacions d'Evenson *et al.* (1999). Aquest mètode utilitza un compost metacromàtic, que és el taronja d'acridina (*acridine orange*, AO). Breument, després d'un tractament àcid es tenyeixen els espermatozoides amb l'AO, el colorant s'intercala formant agregats i dona una emissió fluorescent en vermell si tenen el DNA fragmentat, i si no està fragmentat aquesta l'emissió fluorescent és verda. El percentatge vermell/verd ens dona el valor de fragmentació del DNA (%DFI). El SCDt (Halo-sperm Kit; Halotech DNA SL, Madrid; Conception Technologies, San Diego, EUA) es basa en el fet que el DNA de l'espermatozoide no pot formar un halo de dispersió de la cromatina quan té el DNA fragmentat. Breument, la mostra s'inclou en agarosa i es forma un gel sobre un portaobjectes. Tot seguit es fa un tractament de desnaturalització seguit d'una lisi proteica. Es tenyeix amb iodur de propidi (IP) i es quantifica al microscopi el percentatge d'espermatozoides que no mostren aquest halo de dispersió.

Per a l'anàlisi estadística es va fer servir el test de correlació per determinar el grau de concordança entre els diferents mètodes fent comparacions un a un. Les comparacions entre controls i pacients es van realitzar amb el test *t* de Student o *U* de Mann-With-

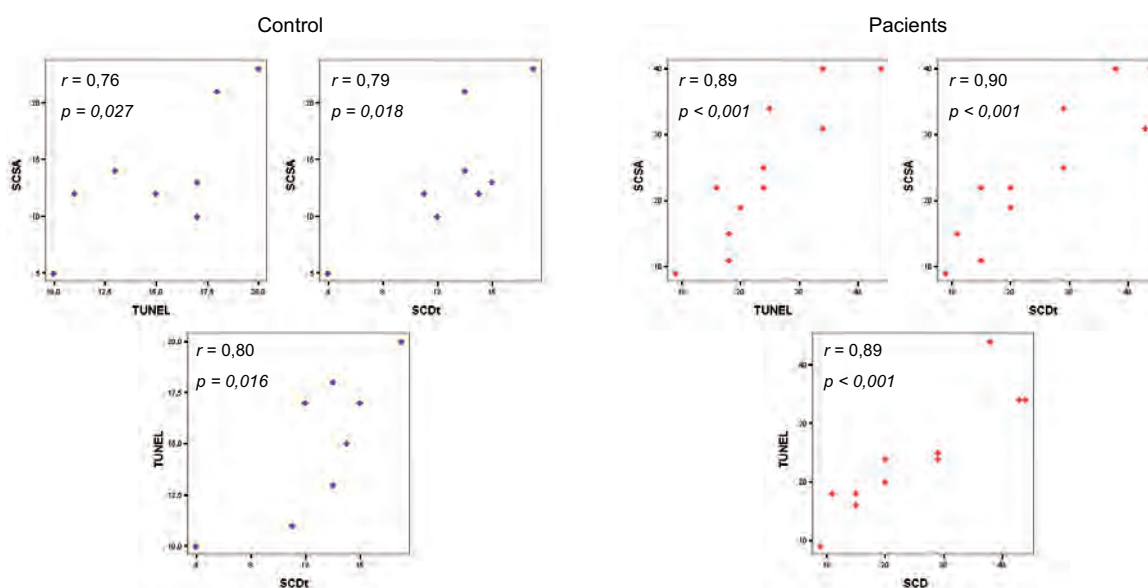


Figura 1. Diagrames de dispersió dels valors de fragmentació del DNA obtinguts amb TUNEL, SCSA i SCDt, en controls i pacients. S'indiquen els corresponents coeficients de correlació (*r*) i els valors de *p*.

Taula 1. Índex de fragmentació del DNA (mitjanes i desviacions típiques) de controls i portadors de reorganitzacions cromosòmiques amb TUNEL, SCSA i SCDt

Mètode	Controls	Portadors	Valors de <i>P</i>
TUNEL	15,12 ± 3,52	24,18 ± 9,88	0,025*
SCSA	13,75 ± 5,80	24,36 ± 10,80	0,022*
SCDt	13,12 ± 4,42	24,81 ± 12,60	0,014*

ney, segons corresponia, amb el programari SPSS 15.0 per a Windows.

RESULTATS

L'anàlisi amb tres mètodes diferents ha permès establir el grau de correlació entre les diferents tècniques utilitzades en aquest estudi. En totes les comparacions vam obtenir valors de $r > 0,75$ (vegeu la figura 1). A temps 0 h, l'índex de fragmentació del DNA va ser significativament major ($p = 0,025$, $0,022$ i $0,014$, respectivament) en el grup dels portadors ($24,18 \pm 9,8$, $24,36 \pm 10,8$ i $24,81 \pm 12,60$) que en el grup control ($n = 8$) ($15,12 \pm 3,52$, $13,75 \pm 5,80$ i $13,12 \pm 4,42$) (vegeu la taula 1 i la figura 2).

Els valors de fragmentació del DNA a diferents temps d'incubació van presentar un increment respecte als valors basals. A temps 0 h, el rang oscil·là del 4 % al 19 % en el grup control, i del 9 % al 44 % en els pacients. A les 4 hores d'incubació el 37 % de les mostres del grup control superava el 30 % de fragmentació davant un 72 % en els pacients. A les 24 hores, dues mostres del grup control presentaven

un valor de la fragmentació del DNA per sota del 30 %. En canvi, cap mostra dels pacients es va mantenir per sota d'aquest valor.

DISCUSSIÓ

S'ha analitzat la fragmentació del DNA amb tres mètodes diferents i s'ha obtingut una bona correlació amb tots tres, tant en els controls fèrtils com amb el grup de portadors. Així doncs, tant el TUNEL com l'SCSA i l'SCDt són mètodes sensibles per detectar dany en el DNA de l'espermatozoide.

La fragmentació del DNA en els diferents grups de mostres analitzades va presentar un increment significatiu respecte al grup control. Aquests valors incrementats reflecteixen un estat d'anormalitat en la integritat del DNA, que podria comprometre la fertilitat d'aquests individus. L'alta variabilitat observada en la fragmentació del DNA, així com les diferències observades en l'increment de la fragmentació per a cada mostra en els portadors de reorganitzacions cromosòmiques, suggereix que l'evolució del dany del DNA podria estar relacionada amb la presència i característiques pròpies de cada tipus de reorganització cromosòmica. Aquests resultats preliminars suggereixen que pot ser d'utilitat determinar la fragmentació del DNA en els portadors de reorganitzacions cromosòmiques amb vista a establir-ne el potencial de fertilitat.

AGRAÏMENTS

Treball realitzat amb l'ajut econòmic del FIS (PI051834 i PI080623) i SGR 0500495.

BIBLIOGRAFIA

- AITKEN, R. J.; DEIULIUS, G. N.; McLACHLAN, R. I. (2009). «Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line». *Int. J. Androl.*, 32(1): 46-56.
- CHOHAN, K. R.; GRIFFIN, J. T.; LAFROMBOISE, M.; JONGE, C. J. DE; CARRELL, D. T. (2006). «Comparis-

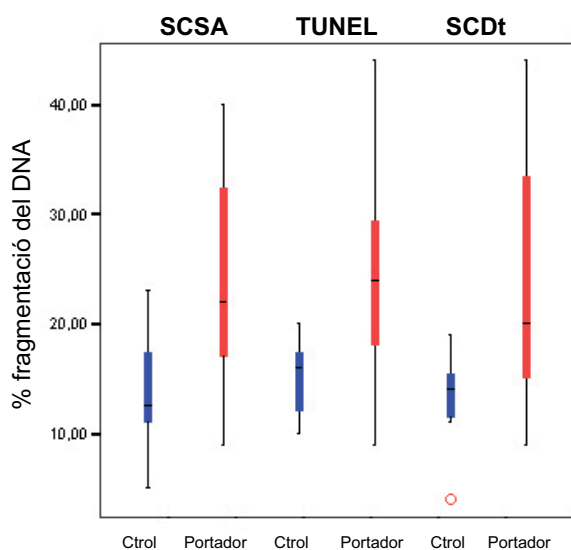


Figura 2. Percentatge de fragmentació del DNA d'espermatozoide en controls fèrtils i portadors de reorganitzacions cromosòmiques determinat per SCSA, TUNEL i SCDt.

- on of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm». *J. Androl.*, 27(1): 53-59.
- DOMÍNGUEZ-FANDOS, D.; CAMEJO, M. I.; BALLESCÀ, J. L.; OLIVA, R. (2007). «Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy». *Cytometry A.*, 71(12): 1011-1018.
- ERENPREISS, J.; SPANO, M.; ERENPREISA, J.; BUNGUM, M.; GIWERCMAN, A. (2006). «Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects». *Asian J. Androl.*, 8(1): 11-29.
- EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M. J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; ANGELIS, P. DE; CLAUSSEN, O. P. (1999). «Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic». *Hum. Reprod.*, 14(4): 1039-1049.
- EVENSON, D. P.; WIXON, R. (2008). «Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. Pregnancy outcome». *Fertil. Steril.*, 90(4): 1229-1231.
- GOSÀLVEZ, J.; CABALLERO, P.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; FERNÁNDEZ, J. L.; NÚÑEZ CALONGE, R. (2008). «Fragmentación del ADN espermático». *Rev. Int. Androl.*, 6(3): 193-209.
- LEWIS, S. E.; AGBAJE, I.; ALVAREZ, J. (2007). «Sperm DNA test as useful adjuncts to semen analysis». *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 54(3): 111-125.
- LIN, M. H.; KUO-KUANG LEE, R.; LI, S. H.; LU, C. H.; SUN, F. J.; HWU, Y. M. (2008). «Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates». *Fertil. Steril.*, 90(2): 352-359.
- MURATORI, M.; FORTI, G.; BALDI, E. (2008). «Comparing flow cytometry and fluorescence microscopy for analyzing human sperm DNA fragmentation by TUNEL labeling». *Cytometry A.*, 73(9): 785-787.
- PRACTICE COMMITTEE OF AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE (2008). «The clinical utility of sperm DNA integrity testing». *Fertil. Steril.*, 90(5, suppl.): S178-180.

INCIDÈNCIA DE DELECIONS I DUPLICACIONS DE LA REGIÓ 15q11q13 EN ESPERMATOZOIDES DE PARES AMB DESCENDÈNCIA AFECTA PER LA SÍNDROME DE PRADER-WILLI

Òscar Molina, Joan Blanco i Francesca Vidal

Unitat de Biologia Cel·lular, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona.
francesca.vidal@uab.cat.

Resum

La síndrome de Prader-Willi (SPW) és un trastorn genòmic causat majoritàriament per delecions de la regió 15q11q13 (70-80 %), i el risc de recurrència s'ha establert com a inferior al 0,5 %. S'ha observat que l'arquitectura genòmica d'aquesta regió la predispone a la recombinació al·lèlica no homòloga en la meiosi, de manera que dona lloc a delecions. L'objectiu d'aquest treball és avaluar la incidència de delecions i duplicacions de la regió 15q11q13 en espermatozoides d'individus amb descendència afectada per la SPW. S'han estudiat, mitjançant hibridació *in situ* fluorescent (FISH) amb sondes de DNA específiques, espermatozoides provinents de mostres de semen de 16 individus amb descendència afectada i 10 individus control. S'han observat diferències significatives en la freqüència de delecions i duplicacions de la regió 15q11q13 entre els pares de SPW i els controls ($P = 0,002$). Les comparacions individuals mostren un increment significatiu en 10 dels 16 individus analitzats ($P < 0,01$). No s'ha observat correlació entre l'increment de reorganitzacions en espermatozoides i l'origen genètic de la SPW. Els resultats suggereixen que l'increment de delecions i duplicacions observat és un reflex de la inestabilitat de la regió 15q11q13.

Paraules clau: delecions, duplicacions, FISH en espermatozoides, síndrome de Prader-Willi.

Abstract

Prader-Willi Syndrome (PWS) is a genomic disorder mostly caused by deletions of the 15q11q13 region (70-80%) and the recurrence risk has been established in less than 0.5%. It has been observed that the genomic architecture of this region make it prone to Non-Allelic Homologous Recombination during meiosis giving rise to deletions. The aim of this study was to assess the incidence of deletions and duplications of the 15q11q13 region in spermatozoa from fathers of PWS patient. Sperm samples from 16 PWS fathers and 10 control donors were analysed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) using specific DNA probes. Significant differences were observed in the frequency of deletions and duplications of the 15q11q13 region between PWS fathers and control donors ($P = 0.002$). Individual comparisons showed moderate increases in ten out of 16 PWS ($P < 0.01$). No correlation was observed between the frequency of reorganization in spermatozoa and the genetic origin of the syndrome. Results suggest that the frequency of deletions and duplications is a reflection of the instability of the 15q11q13 region.

Key words: deletions, duplications, Prader-Willi syndrome, sperm FISH, 15q11q13 region.

INTRODUCCIÓ

La síndrome de Prader-Willi (PWS) és un trastorn genòmic que presenta una incidència d'un de cada 15.000 naixements. La causa genètica majoritària són delecions de la regió 15q11q13 (70-80 %) (Cassidy *et al.*, 2000). La regió 15q11q13 està flanquejada per tres duplicacions segmentàries (*low copy repeats*, LCR), que es corresponen amb els punts de trencament de la majoria de delecions causants de la SPW (vegeu la figura 1). Els LCR de la regió

15q11q13 estan formats per duplicacions del gen/pseudogèn *HERC2*, i formen blocs anomenats *END-repeats*. Aquests blocs presenten una homologia superior al 98 % i actuen com a punts calents de recombinació. Aquestes característiques afavoreixen la recombinació al·lèlica no homòloga (*non allelic homologous recombination*, NAHR) entre diferents còpies dels *END-repeats*, i això produeix diferents reorganitzacions de la regió crítica (Inoue, 2002). L'orientació dels LCR és important, ja que determina l'aparellament de les regions implicades i

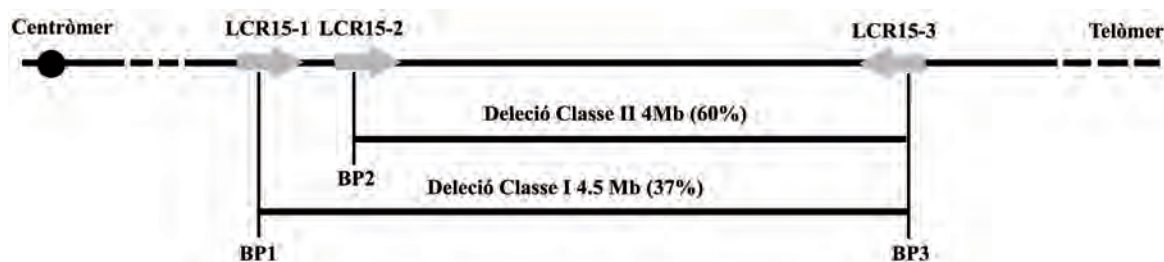


Figura 1. Esquema de la regió 15q11q13. Amb fletxes s'assenyalen els LCR que flanquegen la regió crítica de la SPW. Es mostren els dos tipus de delecions majoritàries, la seva mida i la localització dels punts de trencament (*break points*, BP).

de les reorganitzacions que en resulten (vegeu la figura 2).

Es considera que les reorganitzacions causants de la SPW, com les d'altres trastorns genòmics, són produïdes *de novo* amb un risc de recurrència similar al de la població general, establert a partir d'estudis poblacionals com a inferior al 0,5 % (Gardner i Sutherland, 2004). No obstant això, alguns autors han descrit haplotips de regions crítiques que s'han relacionat amb un increment de la predisposició a generar delecions en línia germinal (Gimelli *et al.*, 2003; Cusco *et al.*, 2008).

Els estudis en gàmetes, i molt especialment, en espermatozoides, per l'avantatge quant al nombre i la facilitat d'obtenció de les mostres, ens ofereixen una alternativa per estudiar la freqüència en què es donen aquestes reorganitzacions i estimar riscos de recurrència. Aquest treball té com a objectius avaluar la freqüència de delecions i duplicacions de la regió 15q11q13 en espermatozoides de parets d'individus amb la síndrome de Prader-Willi, per estimar el risc de recurrència de la síndrome.

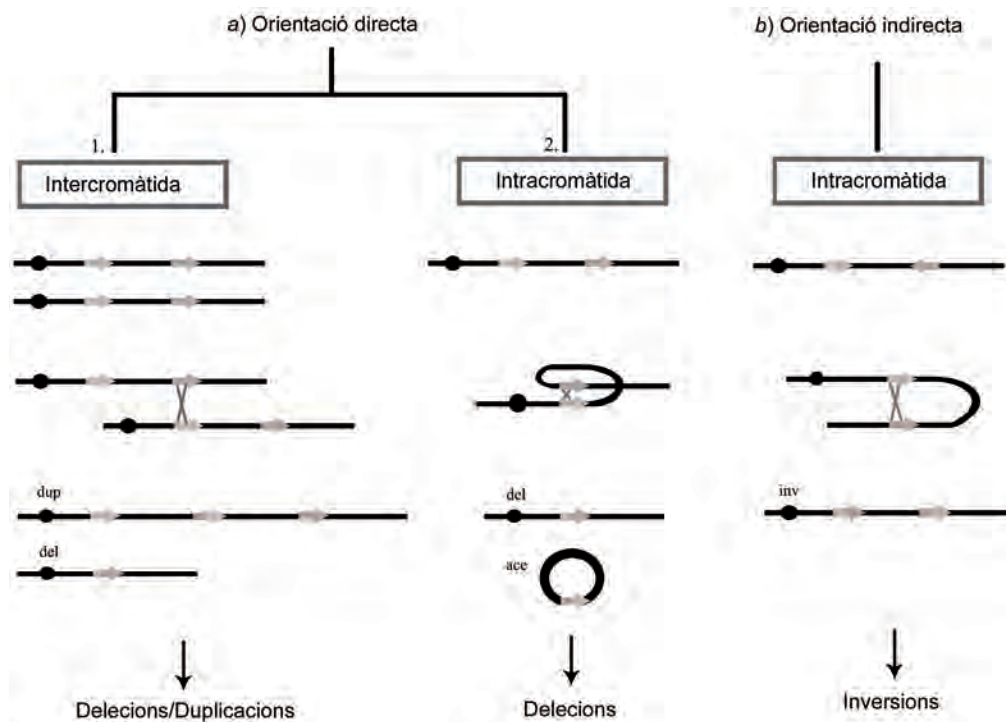


Figura 2. Recombinaçió al·lèlica no homòloga en funció de l'orientació dels LCR. a1) NAHR entre LCR directes de dues cromàtides. a2) NAHR entre LCR directes d'una cromàtida. b) NAHR entre LCR indirectes. A la part inferior de la figura s'indiquen els productes estables per a cadascuna de les possibilitats.

MATERIAL I MÈTODES

Mostres biològiques

Es van obtenir mostres de semen de 16 parets d'individus amb la SPW d'edats compreses entre 32 i 60 anys i 10 individus control entre 20 i 50 anys. Tots els individus participants van ser informats de l'estudi i van manifestar la seva voluntat de participar-hi amb la signatura del consentiment corresponent.

Hibridació in situ fluorescent (FISH)

El procediment de fixació, descondensació i hibridació de les mostres es va realitzar seguint el protocol estandarditzat al nostre laboratori.

Es va utilitzar una sonda específica de locus per a la regió 15q11q13 (LSI 15q11q13 *spectrum orange*; Vysis Inc., Downers Grove, IL, EUA), una sonda centromèrica per al cromosoma 15 (Locus D15Z4, *spectrum green*, Vysis Inc.) com a control d'hibridació, i una sonda centromèrica per al cromosoma 6 (Locus D6Z1, *spectrum aqua*, Vysis Inc.) com a control de ploïdia.

Les valoracions es van realitzar mitjançant un microscopi d'epifluorescència Olympus BX60 equipat amb un filtre de triple banda i filtres específics per a FITC, Cy3 i Aqua. La combinació de sondes utilitza-

da va permetre identificar diferents genotips, que van ser classificats en funció del nombre i distribució dels senyals d'hibridació.

Van ser analitzats un mínim de 10.000 espermatozoides per individu. L'assignació de genotips es va realitzar d'acord amb els següents criteris: *a*) espermatozoides normals: presentaven els tres senyals d'hibridació, *b*) delecions 15q11q13: espermatozoides que no presentaven el senyal específic de la regió 15q11q13 i eren portadors del senyal centromèric del cromosoma 15 i del control de ploïdia i *c*) duplicacions 15q11q13: espermatozoides que presentaven dos senyals d'hibridació de la regió 15q11q13 d'acord amb els criteris estàndard pel que fa a mida, intensitat i distància (Blanco *et al.*, 1996), i que eren portadors d'un senyal centromèric del cromosoma 15 i d'un senyal per al control de ploïdia.

L'anàlisi de FISH en espermatozoides es va realitzar a cegues respecte a l'origen genètic de la síndrome (deleció, disomia uniparental, defectes del centre d'impressió genètica), que va ser facilitat pel centre de diagnòstic UDIAT del Consorci Hospitalari Parc Taulí (Sabadell) un cop finalitzat l'estudi en gàmetes.

Anàlisi estadística

Es va dur a terme utilitzant el paquet estadístic SPSS

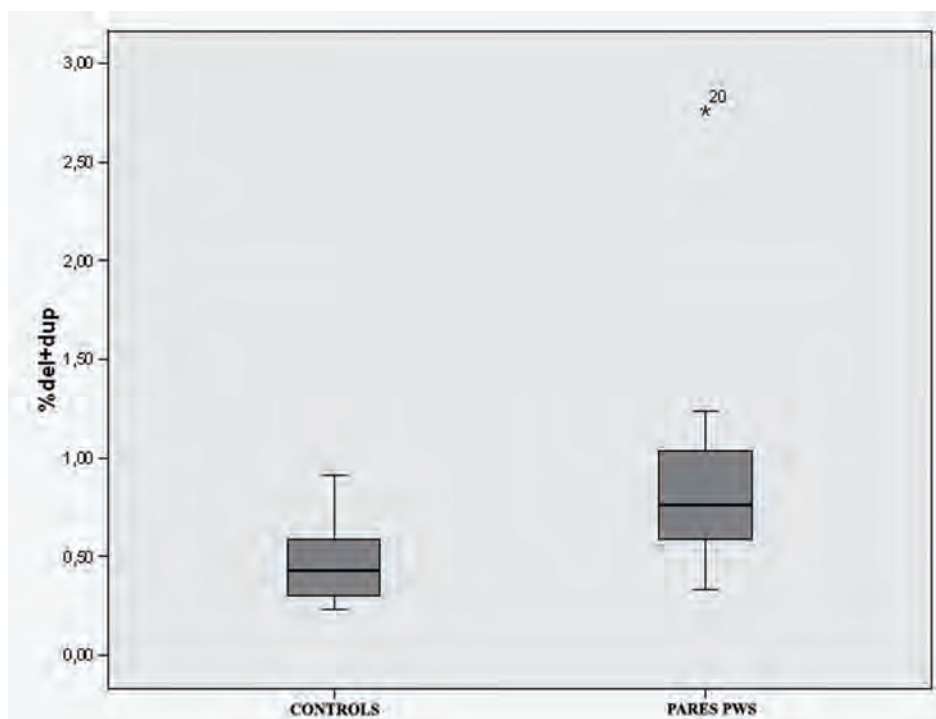


Figura 3. Diferències observades per a la freqüència de delecions i duplicacions de la regió 15q11q13 en les dues poblacions analitzades.

Taula 1. Resultats d'individus amb descendència afectada per la SPW

Casos	Normals	del15q11q13	dup15q11q13	del/dup1	Totals	Etiologia
PW-1	10.027 (98,17)	54 (0,53)	32 (0,32)	86 (0,84)*	10.214	DUP
PW-2	9.873 (98,42)	79 (0,79)	45 (0,45)	124 (1,24)*	10.032	Deleció
PW-3	10.554 (98,96)	32 (0,30)	27 (0,25)	59 (0,55)	10.665	Deleció
PW-4	10.037 (99,47)	18 (0,18)	15 (0,15)	33 (0,33)	10.090	Deleció
PW-5	9.948 (98,57)	80 (0,80)	23 (0,23)	103 (1,02)*	10.092	Deleció
PW-6	10.120 (98,77)	42 (0,41)	36 (0,35)	78 (0,76)*	10.246	Deleció
PW-7	10.061 (99,08)	43 (0,42)	28 (0,28)	71 (0,70)*	10.154	Desconegut
PW-8	10.164 (99,07)	32 (0,31)	27 (0,26)	59 (0,58)	10.259	Deleció
PW-9	10.049 (99,16)	28 (0,28)	32 (0,32)	60 (0,59)	10.134	Deleció
PW-10	9.867 (96,56)	239 (2,34)	43 (0,42)	282 (2,76)*	10.219	DUP
PW-11	10.549 (99,04)	37 (0,35)	30 (0,28)	67 (0,63)	10.651	DUP
PW-13	9.986 (98,32)	81 (0,80)	26 (0,26)	107 (1,05)*	10.157	Deleció
PW-14	10.031 (99,22)	47 (0,46)	12 (0,12)	59 (0,58)	10.130	DUP
PW-15	9.918 (98,28)	51 (0,51)	26 (0,26)	77 (0,76)*	10.092	Deleció
PW-16	10.177 (98,85)	46 (0,45)	39 (0,39)	85 (0,83)*	10.295	Deleció
PW-17	10.020 (98,12)	59 (0,58)	57 (0,56)	116 (0,14)*	10.212	Desconegut
% ± SEM	98,63 % ± 0,17	0,59 % ± 0,12	0,31 % ± 0,03	0,90 % ± 0,14		
Controls	99,17 % ± 0,07	0,22 % ± 0,03	0,24 % ± 0,04	0,47 % ± 0,07		

Es mostra l'etiologia de la SPW. Al peu de la taula es mostren els resultats obtinguts per a la població control.

* Increments significatius respecte a la població control ($P < 0,01$).

versió 14 (SPSS Inc., Wacker Drive, Chicago, IL, EUA).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Es van analitzar un total de 101.505 espermatozoides d'individus control (vegeu la taula 1) i 163.542 espermatozoides de pares amb descendència afectada per la SPW (vegeu la taula 1). En termes poblacionals, els pares d'individus amb la SPW presentaven un increment significatiu de 15q11q13del+dup (0,90 % ± 0,14) respecte a la població control (0,47 % ± 0,07) ($P = 0,002$) (vegeu la figura 3). En aquest increment poblacional hi van contribuir deu dels setze individus analitzats, els quals van mostrar, de manera individual, increments significatius (vegeu la taula 1). S'ha suggerit que variacions estructurals, com inversions de la regió crítica (Gimelli *et al.*, 2003) o variacions en el nombre de repeticions dels LCR (Cusco *et al.*, 2008) podrien ser factors que predisposin a l'aparició de delecions en la descendència. Els canvis numèrics i estructurals podrien dificultar l'aparellament homòleg durant el procés de recombinació i afavorir l'aparellament heteròleg amb segments cromosòmics propers que comparteixen un grau d'homologia molt elevat, com els LCR. Així, individus portadors de canvis d'aquest tipus podrien ser susceptibles en diferents graus a fenòmens de NAHR, amb el conseqüent increment de reorganitzacions de la regió implicada.

Pel que fa a la comparació dels resultats obtinguts en espermatozoides amb l'etiologia de la SPW en la descendència, no s'ha observat una relació entre un increment de 15q11q13del+dup i descendència afectada per la SPW causada per deleció. A més, alguns dels individus que presenten increments de 15q11q13 del+dup en espermatozoides són pares amb descendència afectada per la SPW causada per DUP materna (vegeu la figura 3). La utilització únicament de marcadors interns de la regió 15q11q13 per a l'anàlisi de l'origen genètic de la SPW va impedir diferenciar entre DUP i DUP parcials. Així doncs, els nostres resultats indiquen que la freqüència de delecions en espermatozoides és un reflex de la inestabilitat de la regió 15q11q13, que la predisposa a diferents tipus de reorganitzacions: duplicacions, inversions i probablement DUP parcials. Aquesta última reorganització cromosòmica explicaria l'increment de 15q11q13del+dup observat en els individus amb un fill afectat de la SPW causat per DUP materna, i això reforça la necessitat d'estudiar l'origen parental, tant de la regió crítica com de les regions externes del cromosoma, per discriminar DUP de DUP parcials.

Tot i que els increments observats són moderats (rang: 0,70-2,76 %), aquests individus s'haurien de considerar com a individus de risc per transmetre la SPW a la descendència. Situacions similars s'han observat en altres poblacions analitzades, en què s'han trobat increments moderats d'anomalies cromosòmiques en espermatozoides de pares amb des-

condència afecta per diferents síndromes (Blanco *et al.*, 1998; Martínez-Pasarell *et al.*, 1999; Arnedo *et al.*, 2006).

AGRAÏMENTS

Centre de diagnòstic UDIAT (Consorci Hospitalari Parc Taulí, Sabadell). Associacions Catalana i Madrilenya per a la SPW. Beca PIF2007 de la Universitat Autònoma de Barcelona.

BIBLIOGRAFIA

- ARNEDO, N.; TEMPLADO, C.; SANCHEZ-BLANQUE, Y.; RAJMIL, O.; NOGUES, C. (2006). «Sperm aneuploidy in fathers of Klinefelter's syndrome offspring assessed by multicolour fluorescent in situ hybridization using probes for chromosomes 6, 13, 18, 21, 22, X and Y». *Hum. Reprod.*, 21: 524-528.
- BLANCO, J.; EGOZCUE, J.; VIDAL, F. (1996). «Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization». *Hum. Reprod.*, 11: 722-726.
- BLANCO, J.; GABAU, E.; GOMEZ, D.; BAENA, N.; GUITART, M.; EGOZCUE, J.; VIDAL, F. (1998). «Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21, in a population with a high prevalence of Down syndrome: increased incidence in cases of paternal origin». *Am. J. Hum. Genet.*, 63: 1067-1072.
- CASSIDY, S. B.; DYKENS, E.; WILLIAMS, C. A. (2000). «Prader-Willi and Angelman syndromes: sister imprinted disorders». *Am. J. Med. Genet.*, 97: 136-146.
- CUSCO, I.; COROMINAS, R.; BAYES, M.; FLORES, R.; RIVERA-BRUGUES, N.; CAMPUZANO, V.; PEREZ-JURADO, L. A. (2008). «Copy number variation at the 7q11.23 segmental duplications is a susceptibility factor for the Williams-Beuren syndrome deletion». *Genome Res.*, 18: 683-694.
- GARDNER, R. J. M.; SUTHERLAND, G. R. (2003). *Chromosome abnormalities and genetic counselling*. Nova York: Oxford University Press.
- GIMELLI, G.; PUJANA, M. A.; PATRICELLI, M. G.; RUSSO, S.; GIARDINO, D.; LARIZZA, L.; CHEUNG, J.; ARMENGOL, L.; SCHINZEL, A.; ESTIVILL, X.; ZUFARDI, O. (2003). «Genomic inversions of human chromosome 15q11-q13 in mothers of Angelman syndrome patients with class II (BP2/3) deletions». *Hum. Mol. Genet.*, 12: 849-858.
- INOUE, K. (2002). «Molecular mechanisms for genomic disorders». *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 3: 199-242.
- MARTINEZ-PASARELL, O.; NOGUES, C.; BOSCH, M.; EGOZCUE, J.; TEMPLADO, C. (1999). «Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patients». *Hum. Genet.*, 104: 345-349.

ESTUDI D'OÒCITS EN METAFASE II AMB MICROSCÒPIA DE LLUM POLARITZADA

Oriol Oliana,¹ Gemma Arroyo,¹ Montserrat Boada,¹ María José Gómez,¹ Buenaventura Coroleu¹
i Anna Veiga^{1,2}

¹Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció de l'USP Institut Universitari Dexeus.
Gran Via Carles III, 71-75. 08028 Barcelona.

²Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona.

Resum

Antecedents: La microscòpia de llum polaritzada permet visualitzar el fus meiótic dels oòcits en metafase II abans de ser microinjectats. Aquest estudi vol avaluar si la presència i posició del fus i la birefringència de la zona pel·lúcida estan relacionats amb la fecundació, la qualitat oocitària i el desenvolupament embrionari. **Material i mètodes:** Estudi prospectiu i aleatoritzat de 149 oòcits en metafase II dividits en dos grups, un d'estudi i un altre de control. **Resultats:** En un 83,8 % del oòcits vam observar el fus meiótic. D'aquests, un 70,7 % dels oòcits que no tenien el fus desplaçat respecte al CP es van fecundar, mentre que dels oòcits amb el fus desplaçat només se'n van fecundar un 38,9 % (n.s.). No s'ha trobat correlació entre la presència de fus i la qualitat embrionària en D+2, ni entre els valors de la refringència i el gruix de la ZP en ser relacionats amb l'estat evolutiu dels embrions en D+2. **Conclusions:** Tot i que la presència de fus i la seva posició respecte al primer corpuscle polar semblen relacionats amb la fecundació, cal fer un estudi més exhaustiu per obtenir resultats més concloents respecte de la utilitat de la tecnologia de llum polaritzada en la valoració de la qualitat embrionària.

Paraules clau: ICSI, fus meiótic, microscòpia de llum polaritzada, fecundació, desenvolupament embrionari.

Abstract

Background: Polarization microscopy allows visualizing the oocytes meiotic spindle in metaphase II before they are microinjected. This study analyses whether the presence of spindle and its angle with regard to the first polar corpuscle are related with fertilisation and embryo, development and quality. **Materials and methods:** Prospective and randomized study of 149 oocytes in metaphase II divided into two groups, the study group and the control group. **Results:** Eighty-three point eight percent of MII showed the meiotic spindle. 70.7% of the oocytes without spindle displacement were fertilized; meanwhile 38.9% (n.s.) of the oocytes with the spindle displacement were fertilized. There is neither correlation between spindle presence and embryo quality at D+2, or between refringency values and ZP thickness when related with embryo development at D+2. **Conclusions:** Even though the spindle presence and its position regarding to the first polar corpuscle seems to be related with fertilisation, larger series are needed to assess the usefulness of such technique in the evaluation of embryo quality.

Key words: ICSI, meiotic spindle, polarization microscopy, fertilisation, embryo development.

INTRODUCCIÓ

S'ha demostrat que un dels factors més importants per al desenvolupament embrionari és la qualitat oocitària (Choen *et al.*, 2004; Santis *et al.*, 2005). D'altra banda, prop d'un 80 % de les aneuploïdies trobades en embrions tenen el seu origen en els oòcits (Hassol i Hunt, 2001). La dificultat resideix a predir si un oòcit en metafase II (MII) té potencial per esdevenir un embrió de qualitat (Chamayou *et al.*, 2006). Un bon indicador d'aquest potencial podria ser la

morfologia del fus meiótic (Keefe *et al.*, 2003). Sembla que una morfologia del fus meiótic alterada podria comprometre la segregació cromosòmica (Munné *et al.*, 1995), i aquest fet es traduiria en infertilitat, avortaments o malalties genètiques greus, tal com passa amb les pacients d'edat materna avançada (Battaglia *et al.*, 1996).

Durant la microinjecció espermàtica (ICSI) s'ha d'evitar necessàriament el fus. La localització d'aquest s'associa adjacentment al corpuscle polar. Els mètodes d'anàlisi utilitzats fins ara per visualitzar el

fus (microscòpia electrònica o microscòpia confocal) segueixen estratègies invasives que les fan no aptes per a l'ús clínic (Battaglia *et al.*, 1996). Actualment es pot utilitzar la llum polaritzada per observar el fus meiótic sense comprometre els oòcits (Waterman *et al.*, 1998; Lui *et al.*, 2000). Aquesta tècnica permet l'observació d'estructures altament organitzades, com és el cas del fus, ja que aquest té la capacitat de desviar i retardar el pla de vibració de la llum polaritzada, i així es dona el fenomen òptic de la birefringència (Oldenbourg *et al.*, 1999). Per tant, un sistema com l'Octax ICSI Guard® (IG), basat en la llum polaritzada, podria ajudar a reduir possibles danys durant la ICSI.

En el present estudi s'analitzen les característiques del fus meiótic: presència i posició pel que fa al primer corpuscle polar (CP) i intensitat de la birefringència de la zona pellúcida (ZP) dels oòcits i la seva correlació amb la fecundació, desenvolupament i qualitat embrionaris.

MATERIAL I MÈTODES

L'estudi prospectiu i aleatoritzat va iniciar-se l'any 2007 i aquí se'n presenten els primers resultats. Es van incloure pacients de FIV que presentaven un factor masculí moderat que requerís aplicar la tècnica d'ICSI. Es va definir com a *factor masculí moderat* aquells pacients amb oligozoospermia, oligoastenozoospermia, astenozoospermia amb un comptatge mínim de 5 M/ml espermatozoides, 10 % de mobilitat total o mobilitat progressiva 3+ del 5 %.

Vint-i-un pacients van ser seleccionades en dos grups aleatoritzats:

Grup d'estudi. Grup de pacients a les quals els vam realitzar la valoració de la birefringència de la ZP i del fus meiótic dels oòcits en el moment previ a la ICSI. Per realitzar la ICSI, una vegada localitzat el fus meiótic, l'oòcit es va posicionar situant el fus a les sis horàries, independentment de la posició del CP. S'analitzaren les taxes de fecundació (2PN), el desenvolupament i la qualitat embrionària en funció de l'alineació CP-fus. Així mateix, es va analitzar la taxa de fecundació i la qualitat embrionària, en funció de la intensitat de la birefringència de la capa interna de la ZP dels oòcits.

Grup de control. Pacients a les quals no els vam valorar la birefringència. La ICSI es realitzà sempre posicionant el CP a les sis horàries. S'analitzaren les taxes de fecundació, el desenvolupament i la qualitat embrionària.

Els embrions es van valorar seguint el sistema de

puntuació habitual en el laboratori (1-10). Es van considerar embrions evolutius aquells que es van transferir o congelar, i no evolutius els aturats en el desenvolupament, així com els molt fragmentats i multinucleats. També es va analitzar la taxa d'embaràs, que es va comparar amb els resultats obtinguts en el grup d'estudi.

Anàlisi estadística

Per comparar variables qualitatives i ordinals es va utilitzar la prova exacta de Fisher o el test de la χ^2 . Per comparar mitjanes es va utilitzar la prova *t* de Student. Tots els test han estat bilaterals amb un nivell de significació $\alpha = 0,05$.

RESULTATS

Pacients

Es van analitzar un total de 21 pacients, de les quals es van recuperar 149 oòcits MII. En 13 pacients es va utilitzar la IG i en les 9 del grup de control no. No s'ha trobat diferències estadísticament significatives entre els dos grups de pacients pel que fa a l'edat, nivell d'estradiol i nombre de fol·licles > 16 mm el dia de l'administració de hCG, oòcits recuperats, oòcits MII i nombre d'embrions transferits (vegeu la taula 1). En comparar la taxa d'embaràs aconseguida en el grup d'estudi respecte del grup control, no s'han trobat diferències significatives (30,8 % i 50 %, respectivament).

Embrions

La taxa global de fecundació en el grup IG va ser del 61,9 %, i en el grup de control del 70,5 %. Cent cinc oòcits es van analitzar amb la ICSI Guard. Tal i com s'observa a la taula 2, la presència de fus i la fecundació posterior ha estat superior quan el fus era visible (63,2 % vs. 55,6 %, n.s.). La taula 3 mostra la taxa de fecundació en funció de l'angle del fus respecte al CP. Malgrat que no s'han trobat diferències estadísticament significatives, es van fecundar un 70,7 % dels oòcits que tenien el fus adjacent al CP, mentre que dels oòcits amb el fus desplaçat, només se'n van fecundar un 48,3 %.

No s'ha pogut establir relació entre la presència del fus i la refringència de la ZP, ni amb el gruix de la ZP o la qualitat embrionària. Els valors de la refringència de la ZP i gruix de la ZP quant al desenvolupament dels embrions es mostren a la taula 4.

Taula 1. Característiques de les pacients

		Edat (anys)	E2 (pg/ml)	Fol·licles (n)	Oòcits (n)	MII (n)	Transferits (n)
ICSI Guard	No	35,95 ± 4,2	2.475,0 ± 1.314,5	9,4 ± 4,2	8,1 ± 4,2	6,9 ± 3,7	1,87 ± 1,1
	Sí	37,1 ± 4,5	2.515,7 ± 1.145,2	9,5 ± 3,5	9,3 ± 4,4	7,9 ± 4,2	1,54 ± 0,6

n = 21, n.s.

Taula 2. Taxa de fecundació i mitjana de les característiques morfològiques en funció de la presència o absència de fus

		Taxa fecundació	Score Dexeus	Refringència ZP	Gruix ZP
Presència de fus	Sí	63,2 %	5,5 ± 2,2	0,84 ± 5,1	17,4 ± 4,2
	No	55,6 %	5,4 ± 2,7	-1,96 ± 5,1	15,1 ± 7,2

n.s.

No hi ha diferències estadísticament significatives en els valors de la refringència i el gruix de la ZP entre embrions evolutius, no aptes o multinucleats.

DISCUSSIÓ

Les dades mostren que el fet de treballar amb la ICSI Guard® podria aportar una certa millora dels resultats. El percentatge de fecundació respecte a la presència de fus ha estat lleugerament superior en aquells oòcits en què la presència de fus era positiva. De la mateixa manera, la taxa de fecundació dels oòcits que no tenien el fus desplaçat ha estat un 22,4 % superior comparada amb la taxa de fecundació d'aquells que presentaven desplaçament del fus respecte al CP, encara que les diferències no són significatives. Estudis com els de Rienzi *et al.* (2003)

indiquen que els canvis en la posició d'aquest poden ser deguts a factors mecànics durant la denudació o la microinjecció. Caldria augmentar el nombre de casos per confirmar aquesta tendència.

Wang *et al.* (2001) suggereixen que la presència d'un fus birefringent és un factor de bon pronòstic, ja que s'associa a una major taxa de fecundació i desenvolupament. Els nostres resultats, encara preliminars, no confirmen aquestes dades.

Cal ampliar el nombre de casos amb vista a determinar la utilitat real de la microscòpia de llum polaritzada en la millora de la taxa de fecundació post-ICSI (Shen *et al.*, 2005) i de la refringència de la ZP en la valoració del potencial de desenvolupament embrionari (Wang *et al.*, 2001), amb augment de la taxa d'embaràs (Madaschi *et al.*, 2008).

Taula 3. Taxa de fecundació en funció de l'angle del fus respecte del corpuscle polar

n / %		Angle del fus			
		0	≠ 0		
Fecundació	Sí	41	70,7	14	48,3
	No	17	29,3	15	51,7

n.s.

Taula 4. Descripció estadística de la morfologia dels embrions tractats amb ICSI Guard

	Evolutius	No aptes	Multinucleats
Refringència ZP	-0,18 ± 5,3	3 ± 6,5	0 ± 3,9
Gruix ZP	17,77 ± 4,76	15,5 ± 5,8	17 ± 4,8

n.s.

BIBLIOGRAFIA

- BATTAGLIA, D. G.; GOODWIN, P.; KLEIN, N. A.; SOULES, M. R.; (1996). «Influence of maternal age on meiotic spindle in oocytes from naturally cycling women». *Hum. Reprod.*, 11: 2217-2222.
- CHAMAYOU, S.; RAGOLIA, C.; ALECCI, C.; STORACI, G.; MAGLIA, E.; RUSSO, E. (2006). «Meiotic spindle presence and oocyte morphology do not predict clinical ICSI outcomes: a study of 967 transferred embryos». *Repro. Biomed. Online*, 13: 661-667.
- EDWARDS, R. G.; BEARD, H. K. (1997). «Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos». *Mol. Hum. Reprod.*, 3: 863-905.
- HASSOLD, T.; HUNT, P.; (2001). «To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy». *Nature Reviews Genetics*, 2: 280-291.
- KEEFE, D.; LIU, L.; WANG, W.; SILVA, C. (2003). «Imaging meiotic spindles by polarization light microscopy: principles and applications to IVF». *Repro. Biomed. Online*, 7: 24-29.
- LUI, L.; OLDENBOURG, R.; TRIMARCHI, J. R.; KEEFE,

- D. L. (2000). «A reliable, noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes». *Nat. Biotech.*, 18: 223-225.
- MADASCHI, C.; SOUZA BONETTI, T. C. DE; ALMEIDA FERREIRA BRAGA, D. P. DE; PASQUALOTTO, F. F.; IACONELLI, A. JR.; BORGES, E. JR. (2008). «Spindle imaging: a marker for embryo development and implantation». *Fertil. Steril.*, 90: 194-198.
- MUNNE, S.; ALIKANI, M.; TOMKIN, G.; GRIFO, J.; CHOEN, J. (1995). «Embryo morphology, developmental rate and maternal age are correlated with chromosome abnormalities». *Fertil. Steril.*, 64: 382-391.
- OLDENBOURG, R. (1999). «Polarized light microscopy of spindles». *Methods Cell. Biol.*, 61: 175-208.
- RIENZI, L.; UBALDI, F.; MARTINEZ, F.; IACOBELLI, M.; MINASI, M. G.; FERRERO, S.; TESARIK, J.; GRECO, E. (2003). «Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI». *Hum. Reprod.*, 18: 1289-1293.
- SANTIS, L. DE; CINO, I.; RABELLOTTI, E.; CALZI, F.; PERSICO, P.; BORINI, A. (2005). «Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality». *Repro. Biomed. Online*, 11: 36-42.
- SHEN, Y.; STALF, T.; MEHNERT, C.; EICHENLAUB-RITTER, U.; TINNEBERG, H. R. (2005). «High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles». *Hum. Reprod.*, 20: 1596-1606.
- WANG, W. H.; MENG, L.; HACKETT, R. J.; ODENBOURG, R.; KEEFE, D. L. (2001). «The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes». *Fertil. Steril.*, 75: 348-453.
- WATERMAN-STORER, C. M. (1998). «Microtubules and microscopes: how the development of light microscopic imaging technologies has contributed to discoveries about microtubule dynamics in living cells». *Mol. Biol. Cell.*, 9: 3263-3271.

ANOMALIES CROMOSÒMIQUES EN EMBRIONS PROCEDENTS DE CICLES DE MADURACIÓ *IN VITRO*

Dolores Tuñón,¹ Mònica Parriego,¹ Gemma Arroyo,¹ Montse Boada,¹ Rosa Tur,¹ Pere N. Barri¹ i Anna Veiga^{1,2}

¹Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus.
Gran Via Carles III, 71-73. 08028 Barcelona. doltun@dexeus.com.

²Banc de Línies Cel·lulars, Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona.

Resum

Objectius: L'objectiu de l'estudi ha estat conèixer la dotació cromosòmica dels embrions descartats en cicles de maduració *in vitro* (MIV). **Material i mètodes:** Trenta embrions considerats no aptes per a la transferència o congelació procedents de cicles de MIV van ser analitzats cromosòmicament mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH). **Resultats:** Es va observar una elevada taxa d'embrions multinucleats (86,7 %). Únicament un 10 % dels embrions van resultar normals per als cromosomes analitzats. Tots els embrions anormals amb més d'una cèl·lula diagnosticada (73,3 %) van ser classificats com a mosaics caòtics. **Conclusions:** El deficient desenvolupament embrionari i la relativament baixa taxa d'implantació observada en els cicles de MIV sembla que es relaciona amb un increment de la incidència d'anomalies cromosòmiques. La utilitat del cribratge d'aneuploidies en cicles MIV per determinar l'estat cromosòmic dels embrions transferits hauria de ser valorada.

Paraules clau: maduració *in vitro*, anomalies cromosòmiques, hibridació *in situ* fluorescent, aneuploidia.

Abstract

Background: The objective of this study was to assess the chromosomal constitution of discarded embryos derived from *in vitro* maturation cycles (IVM). **Material and methods:** Thirty embryos considered as unsuitable for transfer or cryopreservation from IVM cycles were analysed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Results:** A high percentage of multinucleated embryos (86.7%) was observed. Only 10% of the embryos were normal for the chromosomes analysed. All the abnormal embryos with diagnosis in more than one cell (73.3%) were chaotic mosaics. **Conclusions:** Poor embryonic development and low implantation rates can be related to the high incidence of chromosomal abnormalities found in IVM embryos. The usefulness of aneuploidy screening (PGS) in IVM cycles should be ascertained.

Key words: *in vitro* maturation, chromosomal abnormalities, fluorescence *in situ* hybridization, aneuploidy.

INTRODUCCIÓ

La tècnica de maduració *in vitro* d'òcits es presenta actualment com una alternativa a la fecundació *in vitro* (FIV) convencional per a determinats grups de pacients, com ara dones amb risc d'hiperestimulació ovariària o en aquelles diagnosticades de síndrome d'ovari policístic (SOP) (Li *et al.*, 2006; Tur *et al.*, 2007). Tot i que els resultats quant a taxes d'implantació (8 % vs. 22 %) i embaràs (25 % vs. 50 %) obtingudes són inferiors a les de FIV convencional (Li *et al.*, 2006; Arroyo *et al.*, 2007), els avantatges amb la simplificació del tractament i la disminució del risc d'hiperestimulació per a les pacients amb SOP han fet que sigui una tècnica d'aplicació creixent.

Ja Edwards i col·laboradors van demostrar que els òcits humans en estadis immadurs podien assolir l'estadi de metafase i fora de l'ambient preovulatori (Edwards, 1965), però l'aplicació clínica de la MIV ha anat lligada al desenvolupament de medis de cultiu específics que afavoreixen la maduració dels òcits al laboratori. Per tal que els òcits immadurs assoleixin l'estadi de metafase II (MII) és essencial que es doni tant la maduració nuclear com la citoplasmàtica. Una asincronia entre els dos processos s'ha relacionat amb una disminució de la capacitat de desenvolupament i un increment de les anomalies cromosòmiques en els embrions resultants, ja sigui per defectes del fus meiótic o per alteració en la síntesi o funcionament de proteïnes citoplasmàtiques

(DeScisciolo *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2000). Tot i això, poc es coneix encara de la constitució cromosòmica dels embrions obtinguts per MIV.

En el present estudi s'ha analitzat la constitució nuclear i cromosòmica d'embrions procedents de cicles MIV no utilitzables per a transferència o criopreservació.

MATERIAL I MÈTODES

Es van incloure un total de set cicles de MIV realitzats entre març de 2008 i gener de 2009 en el nostre centre. Les pacients van seguir protocols de cicle espontani o d'estimulació mínima amb rFSH segons les seves característiques (Tur *et al.*, 2007). La punició ovariària es va dur a terme a les 36 h post hCG. Els oòcits van ser classificats al laboratori segons el seu grau de maduresa i aquells que van resultar immadurs es van cultivar *in vitro* entre 24 i 76 hores fins que van assolir l'estadi MII (Arroyo *et al.*, 2007). Només els oòcits madurs van ser inseminats per microinjecció intracitoplasmàtica (ICSI). La valoració de la fecundació i del desenvolupament embrionari es va efectuar segons protocols estandaritzats. La transferència embrionària i la congelació van realitzar-se en el tercer dia de cultiu.

Un total de 30 embrions van ser considerats no aptes i van ser inclosos en l'estudi després d'obtenir el consentiment escrit de la parella. Els motius per ser descartats van ser: retard o aturades en la divisió cel·lular, presència de multinucleació en alguna cèl·lula o bé elevat percentatge de fragmentació citoplasmàtica. Els embrions analitzats van ser tractats amb pronasa per induir la hidròlisi de la zona pel·lúcida i posteriorment els blastòmers van ser aïllats utilitzant un medi sense cations divalents (PBS sense Ca ni Mg). Cada blastòmer es va fixar de manera individualitzada en un portaobjectes prèviament desengreixat mitjançant la tècnica de Tarkovski modificada utilitzant un microscopi invertit. L'anàlisi cromosòmica es va dur a terme mitjançant FISH utilitzant un *kit* comercial que permet el diagnòstic simultani de cinc cromosomes: 13, 16, 18, 21 i 22 (MultiVysion PB Probe, Abbot®). Es van analitzar els portaobjectes hibridats mitjançant microscopi d'epifluorescència (Olympus BX61) equipat amb filtres específics.

RESULTATS

Dels 7 cicles de MIV estudiats es van recuperar un

total de 110 oòcits ($15,7 \pm 8,5$ oòcits/pacient). L'edat mitjana de les pacients era de 32,3 anys. Dos dels 110 oòcits es van recuperar en estadi de MII, mentre que 108 van resultar vesícules germinals (VG). 79 VG van madurar fins a MII (73,1 %): 49/79 van fer-ho durant les 24 primeres hores de cultiu, 29/79 durant les 48 hores i 1/79 no ho va fer fins a les 76 hores. La taxa de fecundació obtinguda en els oòcits madurats *in vitro* va ser del 69,6 %. Un total de 30 embrions van ser considerats no aptes (54,5 %).

Es van fixar un total de 122 blastòmers. D'aquests, 23 (18,9 %) van mostrar un únic nucli, 51 (41,8 %) presentaven diversos nuclis o múltiples fragments de cromatina, 38 (31,1 %) van resultar anucleats, en nou casos (7,4 %) es van obtenir cromosomes, i es va perdre un únic blastòmer (0,8 %) durant la fixació. El percentatge d'embrions amb alguna cèl·lula multinucleada va resultar del 86,7 %. Només tres embrions (10 %) van resultar cromosòmicament normals per als cromosomes estudiats. Tots tres embrions procedien d'oòcits que havien assolit l'estadi de MII després de 24 hores de cultiu. Tots els embrions amb diagnòstic anormal en més d'una cèl·lula analitzada mostraven un complement cromosòmic a l'atzar i van ser classificats com a mosaics caòtics (22/30, 73,3 %).

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

Segons les nostres dades, el percentatge d'embrions descartats en els cicles de MIV és més elevat que l'obtingut en el programa de FIV (54,5 % vs. 32,2 %, dades de l'IU Dexeus). Aquests resultats coincideixen amb els descrits per altres grups (Vlaisavljević *et al.*, 2006). En general en els cicles de MIV els embrions presenten una menor qualitat, una elevada multinucleació i un increment d'anomalies cromosòmiques (Nogueira *et al.*, 2000). S'han suggerit com a possibles causes els defectes en la divisió meiótica, tals com una alteració del fus meiótic en la metafase, que interferiria en la segregació cromosòmica alterada incrementant la taxa d'aneuploidies, encara que hi ha certa controvèrsia en els resultats (Boiso *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006).

La disminució de la qualitat embrionària pot estar relacionada amb una incorrecta maduració oocitària al citoplasma. La immaduresa citoplasmàtica implica una falta d'estructures essencials, necessàries per a un correcte desenvolupament (Combelles *et al.*, 2002).

L'origen de la multinucleació observada en els

embrions de cicles MIV pot ser molt divers. Pot ser deguda a una fragmentació parcial del nucli en la interfase, a la dissociació entre cariocinesi i citocinesi o bé a un defecte en la segregació cromosòmica durant l'anafase mitòtica (Kligman *et al.*, 1996; Staessen *et al.*, 1998). Tal i com hem vist en el nostre estudi, la presència de multinucleació es correlaciona amb l'increment d'anomalies cromosòmiques i amb un alt percentatge de cèl·lules anucleades (31,2 %).

La utilitat del cribratge d'aneuploidies en cicles MIV (Ao *et al.*, 2006) s'hauria de valorar en els casos en què hi hagués un nombre mínim d'embrions per analitzar. D'altra banda, caldria ampliar les dades sobre la constitució cromosòmica dels embrions transferits.

Cal aconseguir millorar les condicions de cultiu per MIV per tal d'assolir una maduració citoplasmàtica i nuclear adequada, que resulti en oòcits competents i embrions amb un elevat potencial de desenvolupament i implantació.

BIBLIOGRAFIA

- AO, A.; JIN, S.; RAO, D.; SON, W. Y.; CHIAN, R. C. (2006). «First successful pregnancy outcome after preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in embryos generated from natural-cycle in vitro fertilization combined with an in vitro maturation procedure». *Fertil. Steril.*, 86(5): 1510-1511.
- ARROYO, G.; BELIL, I.; MARTÍNEZ, F.; TUR, R.; CARRERAS, O.; BOADA, M.; VEIGA, A. (2007). «Primer nacimiento en España después de la transferencia de embriones procedentes de ovocitos madurados in vitro». *Rev. Iberoamer. Fertil.*, 2: 125-130.
- BOISO, I.; MÁRQUEZ, C.; VEIGA, A.; MUNNÉ, S. (1998). «Cytogenetic and fluorescent in situ hybridization analysis of in vitro matured human oocytes». *Assist. Reprod. Rev.*, 7: 160-164.
- COMBELLES, C. M.; CEKLENIAK, N. A.; RACOWSKY, C.; ALBERTINI, D. F. (2002). «Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes». *Hum. Reprod.*, 17(4): 1006-1016.
- DESCISCILO, C.; WRIGHT, D. L.; MAYER, J. F.; GIBBONS, W.; MUASHER, S. J.; LANZENDORF, S. E. (2000). «Human embryos derived from in vitro and in vivo matured oocytes: analysis for chromosomal abnormalities and nuclear morphology». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 17(5): 284-292.
- EDWARDS, R. G. (1965). «Maturation in vitro of human ovarian oocytes». *Lancet*, 2: 926-929.
- KLIGMAN, I.; BENADIVA, C.; ALIKANI, M.; MUNNE, S. (1996). «The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities». *Hum. Reprod.*, 11(7): 1492-1498.
- LI, Y.; FENG, H. L.; CAO, Y. J.; ZHENG, G. J.; YANG, Y.; MULLEN, S.; CRITSER, J. K.; CHEN, Z. J. (2006). «Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro». *Fertil. Steril.*, 85(4): 827-832.
- NOGUEIRA, D.; STAESSEN, C.; VELDE, H. VAN DER; STEIRTEGHEM, A. VAN (2000). «Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from in vitro-matured oocytes». *Fertil. Steril.*, 74(2): 295-298.
- STAESSEN, C.; STEIRTEGHEM, A. VAN (1998). «The genetic constitution of multinuclear blastomeres and their derivative daughter blastomeres». *Hum. Reprod.*, 13(6): 1625-1631.
- TUR, R.; MARTÍNEZ, F.; ARROYO, G.; CARRERAS, O.; BELIL, I.; COROLEU, B.; VEIGA, A. (2007). «Estado actual de la maduración in vitro (MIV)». *Rev. Iberoamer. Fertil.*, 2: 113-122.
- VLAISAVLJEVIĆ, V.; CIZEK-SAJKO, M.; KOVAC, V. (2006). «Multinucleation and cleavage of embryos derived from in vitro-matured oocytes». *Fertil. Steril.*, 86(2): 487-489.
- WANG, W. H.; KEEFE, D. L. (2002). «Prediction of chromosome misalignment among in vitro matured human oocytes by spindle imaging with the PolScope». *Fertil. Steril.*, 78(5): 1077-1081.

PARÀMETRES DE BON PRONÒSTIC EN CICLES DE DIAGNÒSTIC GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL

Sílvia Mateo,¹ Mònica Parriego,¹ Montserrat Boada,¹ Ventura Coroleu,¹ Pere N. Barri¹
i Anna Veiga^{1,2}

¹ Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus.
Gran Via de Carles III, 71-75. 08028 Barcelona. silmat@dexeus.com.

² Banc de Línies Cel·lulars, Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona.

Resum

L'anàlisi de les dades del cicles de fecundació *in vitro* és una font d'informació per la millora dels futurs tractaments. En el present estudi s'han avaluat 54 cicles de diagnòstic genètic preimplantacional / cribratge genètic preimplantacional (DGP/SGP), amb taxa d'implantació del 100 % per determinar quins paràmetres són indicadors del potencial d'èxit d'un cicle. En aquestes pacients es va observar una bona resposta ovàrica (valor mitjà de E₂ el dia de la hCG: 2.648,5 pg/m) i un bon desenvolupament embrionari en dia 2 (83,3 % dels embrions amb ≥ 4 cèl·lules i ≤ 25 de fragmentació citoplasmàtica), en dia 3 (79,6 % dels embrions amb ≥ 8 cèl·lules i ≤ 25 de fragmentació) i en el dia 5, en què tots els embrions transferits estaven en estadi de mòrula o blastocist. Aquests resultats mostren que una bona estimulació ovàrica i un desenvolupament embrionari adequat són essencials per obtenir bons resultats en els cicles de DGP.

Paraules clau: diagnòstic genètic preimplantacional (DGP), qualitat embrionària, implantació, estimulació hormonal.

Abstract

Data from *in vitro* fertilization treatments is an appreciate source of information to improve the future cycles. In this study we evaluated 54 cycles of preimplantation genetic diagnosis and screening (PGD-PGS) with a 100% implantation rate, to elucidate which parameters can predict the final outcome of these cycles. It was observed a good ovarian response (mean level of E₂ the day of hCG administration: 2,648.5 pg/m) and a good embryo development on day 2 (83,3% of the embryos with ≥ 4 cells and ≤ 25 of cytoplasmatic fragmentation), on day 3 (79,6% of the embryos with ≥ 8 cells and ≤ 25 of cytoplasmatic fragmentation) and on day 5, where all embryos transferred were either on morula or blastocyst stage. These results demonstrate that a good ovarian stimulation and an adequate embryo development are essential to achieve good results in PGD-PGS cycles.

Key words: preimplantation genetic diagnosis and screening (PGD-PGS), embryo quality, implantation, hormonal stimulation.

INTRODUCCIÓ

La tècnica de diagnòstic genètic preimplantacional (DGP) s'ha convertit en els darrers anys en una part important dels programes de fecundació *in vitro* (FIV).

Des dels inicis de la seva aplicació, diversos autors han buscat la relació entre el desenvolupament del embrions cultivats *in vitro* i la seva dotació cromosòmica. Sabem, gràcies a aquests estudis, que factors com el retard en la divisió cel·lular (Magli *et al.*, 2007), la presència de fragmentació citoplasmàtica (Alikani *et al.*, 1999) o de cèl·lules multinucleades (Balakier *et al.*, 1997; Munné, 2006) són factors

correlacionats amb un augment de les anomalies cromosòmiques.

L'objectiu d'aquest treball és analitzar retrospectivament les dades de 34 cicles de DGP en els quals es van obtenir el mateix nombre de sacs gestacionals que d'embrions transferits (taxa d'implantació del 100 %), per establir quines són les característiques que pronostiquen l'èxit d'un tractament.

MATERIAL I MÈTODES

Entre gener de 2002 i desembre de 2007 es van dur a terme 546 cicles de DGP en el nostre centre. Es van

incloure un total de 34 cicles en els quals es va aconseguir un embaràs de tants sacs gestacionals com embrions s'havien transferit. En aquests 34 cicles es van transferir un total de 54 embrions.

La mitjana d'edat de les pacients va ser de 32,8 anys (rang: 27-40). Les indicacions per a la inclusió en el programa de DGP/SGP van ser: factor masculí d'origen genètic ($n = 11$), reorganitzacions cromosòmiques ($n = 7$), malalties lligades al cromosoma X ($n = 6$), avortaments de repetició ($n = 4$), fallades repetides d'implantació ($n = 4$) i portadors de malalties gèniques ($n = 2$).

El protocol d'estimulació de l'ovulació, així com el cultiu de gàmetes i embrions, van ser els estàndards utilitzats en el nostre centre (Calderón *et al.*, 1995).

Els embrions es van biopsiar el tercer dia de desenvolupament mitjançant metodologia làser (Bodada *et al.*, 1998). Només els embrions amb cinc blastòmers o més i un màxim del 30 % de fragmentació citoplasmàtica van ser considerats aptes per a la biòpsia. Es van biopsiar un o dos blastòmers, tenint en compte les característiques del nucli fixat, així com el nombre de cèl·lules de l'embrió abans de la biòpsia. El mètode de fixació va ser el de Tarkowski lleugerament modificat (Santaló *et al.*, 1986) i els nuclis fixats van ser analitzats mitjançant hibridació *in situ* fluorescent (FISH). Les sondes que es van utilitzar van ser les següents: en els casos de SGP es van realitzar dues rondes d'hibridació amb sondes específiques per als cromosomes 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y, (MultiVysion PB Probe Ref. 30-111085, Vysis® / X Y 15: *homemade*); en els casos de malalties lligades al cromosoma X es van emprar sondes específiques per als cromosomes sexuals i un autosome per al control de ploïdia; per detectar possibles productes desequilibrats en els embrions de pacients amb reorganitzacions cromosòmiques es va realitzar un disseny personalitzat amb sondes específiques per als cromosomes implicats en la reorganització. La detecció de malalties gèniques es va realitzar mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) aplicant protocols específics per a cada cas.

En tots els casos la transferència dels embrions caracteritzats com a normals es va realitzar en dia +5.

La prova d'embaràs es va realitzar catorze dies després de la punció fol·licular mitjançant la quantificació de la β HCG en sang perifèrica. Dues setmanes més tard es va confirmar ecogràficament mitjançant la presència de batec cardíac.

RESULTATS

Cicles

Dels 34 cicles estudiats, el nivell mitjà d'estradiol el dia de l'administració de la hCG va ser de 2.648,5 pg/ml (rang: 840-5.862 pg/ml), i es va observar ecogràficament una mitjana de 15,9 fol·licles (rang: 6-32).

El dia de la punció fol·licular es van obtenir 15,1 oòcits madurs per pacient (rang: 3-44). La taxa de fecundació obtinguda va ser del 78,8 %.

Es va biopsiar una mitjana de 10,1 embrions per pacient (rang: 3-24), i es va obtenir com a resultat de l'anàlisi genètica que el 40,4 % dels embrions van resultar genèticament normals (mitjana de 4,1; rang: 1-10), el 47,4 % van ser anormals (mitjana: 4,8; rang: 0-12), i el 12,2 % no van tenir un diagnòstic conclouent (mitjana: 1,2; rang: 0-9).

Les transferències dels embrions diagnosticats com a normals/no afectes va realitzar-se el cinquè dia de desenvolupament, en estadi de mòrula o blastocist. Les transferències van ser selectives en un 67,6 % (24/34) dels casos, mentre que en un 32,4 % dels cicles (11/34) no es van poder seleccionar els embrions a transferir. La mitjana d'embrions transferits va ser de 1,6 per pacient.

De les 34 gestacions, 15 van resultar úniques, 18 van ser bessonades i un cicle va donar lloc a una gestació triple.

Embrions

Dels 54 embrions estudiats, el 94,4 % presentaven 2 pronuclis a les 18 hores (+2 h) postinseminació. Es va observar que si s'avaluaven els embrions a les 25 hores (+2 h), el 90 % presentava divisió primerenca (*early cleavage*, EC).

En dia 2 (48 h + 2 h) es va observar que el 83,3 % dels embrions presentaven un mínim de 4 cèl·lules (rang: 2-8) i un màxim del 25 % de fragmentació citoplasmàtica. El tercer dia de cultiu (72 h + 2 h) el 79,6 % dels embrions presentaven un mínim de 8 cèl·lules (rang: 6-16) i un màxim del 25 % de fragments citoplasmàtics (vegeu la taula 1).

El dia de la biòpsia embrionària (dia 3) només es van biopsiar els embrions amb ≥ 5 blastòmers i $\leq 30\%$ de fragments. Es va biopsiar una cèl·lula en el 31,5 % dels casos i dues en el 68,5 %. Dels 54 embrions, no es va observar cap embrió amb 6 cèl·lules en què s'hagués biopsiat més d'una cèl·lula.

El dia de la transferència embrionària (dia 5) el 88,9 % dels embrions estaven en estadi de blastocist

Taula 1. Estadi embrionari en dia 2 i 3 de desenvolupament

	< 4 blastòmers		4 blastòmers		> 4 blastòmers	
	≤ 15 % fragments	> 15 % fragments	≤ 15 % fragments	> 15 % fragments	≤ 15 % fragments	> 15 % fragments
Dia 2	1 (2 %)	1 (2 %)	39 (72 %)	6 (11 %)	6 (11 %)	1 (2 %)
	< 8 blastòmers		8 blastòmers		>8 blastòmers	
	≤ 15 % fragments	> 15 % fragments	≤ 15 % fragments	> 15 % fragments	≤ 15 % fragments	> 15 % fragments
Dia 3	8 (14,8 %)	2 (3,7 %)	28 (51,9 %)	3 (5,55 %)	10 (18,5 %)	3 (5,55 %)

Taula 2. Estadi embrionari previ a la transferència (dia 5)

	Mòrula	Blastocist inicial	Blastocist expandit	Blastocist hatching
N (%)	6 (11,1)	17 (31,5)	4 (7,4)	27 (50)

(48/54), i l'11,1 % restant en estadi de mòrula (6/54) (vegeu la taula 2).

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

Els resultats d'aquest treball posen de manifest que els cicles i els embrions estudiats són d'òptima qualitat, tant pel que fa a les característiques de les pacients com a la resposta a l'estimulació ovàrica i l'evolució embrionària. Aquests paràmetres afavoreixen la recuperació d'un nombre elevat d'òcits competents, de manera que els embrions que s'obtenen resulten de bona qualitat i amb un elevat potencial de desenvolupament.

S'ha observat que el percentatge d'embrions normals del nostre grup d'estudi és lleugerament superior al general descrit dels cicles de SGP en la literatura (35,8 %, Goossens *et al.*, 2008). El fet que la mitjana d'edat de les pacients incloses en l'estudi sigui més jove, seria l'explicació més factible. El fet de disposar d'un nombre superior d'embrions caracteritzats com a normals permet realitzar una doble selecció genètica i morfològica en el moment de la transferència, que es reflecteix en un alt percentatge d'embrions transferits en estadi de blastocist.

Aquest estudi és una aproximació preliminar per intentar dilucidar quins paràmetres poden predir l'èxit o no d'un cicle de DGP. Una bona elecció del protocol d'estimulació ovàrica, un cultiu embrionari optimitzat i una bona selecció embrionària en el moment de la transferència poden millorar els resultats dels cicles de DGP.

BIBLIOGRAFIA

- BOADA, M.; CARRERA, M.; IGLESIA, C. DE LA; SANDALINAS, M.; BARRI, P. N.; VEIGA, A. (1998). «Successful use of laser for human embryo biopsy in preimplantational genetic diagnosis: report of two cases». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 15: 302-307.
- CALDERÓN, G.; BELIL, I.; ARAN, B.; VEIGA, A.; GIL, Y.; BOADA, M.; MARTÍNEZ, F.; PARERA, N.; COROLEU, B.; PENELLA, J.; BARRI, P. N. (1995). «Intracytoplasmatic sperm injection versus conventional in-vitro fertilization: first results». *Hum. Reprod.*, 10: 2835-2839.
- GOOSSENS, V.; HARTON, G.; MOUTOU, C.; SCRIVEN, P. N.; TRAEGER-SYNODINOS, J.; SERMON, K.; HARPER, J. C. (2008). «ESHRE PGD Consortium data collection VIII: cycles from January to December 2005 with pregnancy follow-up to October 2006». *Hum. Reprod.*, 23: 2629-2645.
- MAGLI, M. C.; GIANAROLI, L.; FERRARETTI, A. P.; LAPPI, M.; RUBERTI, A.; FARFALLI, V. (2007). «Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement». *Fertil. Steril.*, 87: 534-541.
- MUNNÉ, S. (2006). «Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos». *RBM Online*, 12: 234-253.
- SANTALÓ, J.; ESTOP, A. M.; EGOZCUE, J. (1986) «The chromosome complement of first cleavage mouse embryos after in vitro fertilization». *J. Vitro Fertil. embryo Transfer.*, 3: 99-105.

CRIBRATGE GENÈTIC PREIMPLANTACIONAL PER A FACTOR MASCULÍ D'ORIGEN GENÈTIC

Anna Bujarrabal,¹ Natàlia Rives,¹ Mònica Parriego,¹ Josep M. Vendrell,¹ Montserrat Boada,¹
Francesca Vidal² i Anna Veiga^{1,3}

¹Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus, Barcelona.
ambuj@dexeus.com, natriv@dexeus.com.

²Unitat de Biologia Cel·lular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.

³Banc de Línies Cel·lulars, Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona.

Resum

L'objectiu del present estudi ha estat analitzar els resultats dels cicles de cribratge genètic preimplantacional (PGS, *preimplantation genetic screening*) per a factor masculí d'origen genètic. S'han analitzat 857 embrions procedents de 106 cicles de PGS per a aquesta indicació. Han estat avaluats els resultats finals dels cicles, així com la incidència i el tipus de les anomalies cromosòmiques presents en els embrions.

Paraules clau: anomalies cromosòmiques, espermatozoides, hibridació *in situ* fluorescent (FISH), meiosi, cribratge genètic preimplantacional (PGS).

Abstract

The aim of the present study was to analyze the results of preimplantation genetic screening (PGS) cycles due to a genetic male factor. 857 embryos from 106 PGS cycles have been studied. The final outcome as well as the incidence and type of the chromosomal abnormalities observed have been evaluated.

Key words: chromosome abnormalities, fluorescent *in situ* hybridization (FISH), meiosis, preimplantation genetic screening (PGS), spermatozoa.

INTRODUCCIÓ

El cribratge genètic preimplantacional (PGS) consisteix en un cribratge cromosòmic d'embrions obtinguts per fecundació *in vitro* (FIV) abans de transferir-los a l'úter matern. La seva finalitat és reduir el risc de concepcions trisòmiques i d'avortament, així com millorar les taxes d'implantació mitjançant la selecció per a la transferència d'exclusivament embrions caracteritzats com a normals per als cromosomes analitzats. Aquesta tècnica està indicada per a parelles estèrils o infèrtils que es considera que produeixen un percentatge d'embrions cromosòmicament anormals superior a la població general: parelles amb avortaments de repetició, amb fallades repetides de FIV, dones d'edat avançada (Thornhill *et al.*, 2005). Des dels inicis de la seva aplicació, el nombre de casos de SGP ha augmentat considerablement (Goossens *et al.*, 2008). Un altre grup que s'ha incorporat més recentment entre els candidats a beneficiar-se del PGS són les parelles amb factor mas-

culí d'origen genètic (Aran *et al.*, 2004). El diagnòstic d'aquest factor pot veure's mitjançant estudis meiótics en teixit testicular o bé d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH) en espermatozoides. Les anomalies meiótiques repercutiran en la producció d'espermatozoides (Egozcue *et al.*, 2005; Sarrate *et al.*, 2009) i els espermatozoides cromosòmicament anormals donaran com a conseqüència un augment del nombre d'embrions amb anomalies cromosòmiques en aquestes parelles.

L'objectiu del present estudi ha estat avaluar la incidència i el tipus de les anomalies cromosòmiques presents en els embrions procedents de cicles de PGS per a factor masculí d'origen genètic. S'ha intentat establir la possible correlació entre el resultat de l'estudi meiótic o de la FISH espermàtica i les anomalies cromosòmiques dels embrions.

Taula 1. Diagnòstic dels embrions segons la indicació de PGS per a factor masculí

Indicació	Nre. cicles	Embrions biopsiats	Embrions diagnosticats	Embrions normals	Embrions anormals
FISH anormal	15	107	95	28 (29,5 %)	67 (70,5 %)
Anomalies sinàptiques	77	628	588	211 (35,9 %)	377 (64,1 %)
Bloqueig meiótic	14	122	109	38 (34,9 %)	71 (65,1 %)
Totals	106	857	792	277/792 (35 %)	515/792 (65 %)

Taula 2. Tipus d'anomalies observades segons la indicació de PGS per a factor masculí

Indicació	Embrions anormals	Simplex	Complexes	Haploides	Poliploides
FISH anormal	67	15 (22,4 %)	29 (43,3 %)	11 (16,4 %)	12 (17,9 %)
Anomalies sinàptiques	377	151 (40,1 %)	151 (40,1 %)	41 (10,9 %)	34 (9,0 %)
Bloqueig meiótic	71	37 (52,1 %)	26 (36,6 %)	2 (2,8 %)	6 (8,5 %)
Totals	515	203 (39,4 %)	206 (40,0 %)	54 (10,5 %)	52 (10,1 %)

Taula 3. Cromosomes afectats en els embrions amb anomalies simples

	13	15	16	18	21	22	Sexuals
Nre. embrions	24	30	47	22	24	40	17
%	11,8	14,8	23,2	10,8	11,8	19,7	8,4

MATERIAL I MÈTODES

S'han analitzat retrospectivament els resultats obtinguts de 106 cicles de FIV-ICSI-PGS per al factor masculí de causa genètica realitzats en el nostre centre entre gener de 2004 i desembre de 2008.

En tots els casos es va realitzar prèviament un cariotip en sang perifèrica d'ambdós membres de la parella per descartar la presència d'anomalies cromosòmiques.

Les biòpsies testiculars es van realitzar amb anestèsia local i es van processar i analitzar segons es descriu a Egozcue *et al.* (1983). Els estudis de FISH en espermatozoides es van dur a terme d'acord amb el que es descriu prèviament a Vidal *et al.* (1993) i Blanco *et al.* (1996), i es van avaluar els cromosomes 13, 18, 21, X i Y.

Els protocols d'estimulació ovàrica, així com els de cultiu de gàmetes i embrions, van ser els utilitzats habitualment en el nostre centre (Barri *et al.*, 1993; Calderón *et al.*, 1995). La biòpsia embrionària, la fixació dels blastòmers i l'estudi citogenètic dels nuclis va realitzar-se segons procediments estandaritzats al nostre laboratori (Boada *et al.*, 1998). Van avaluar-se els cromosomes 13, 15, 16, 18, 21, 22, X i Y mitjançant FISH.

Al cinquè dia de desenvolupament els embrions diagnosticats com a normals per als cromosomes analitzats i amb bona morfologia es van transferir o congelar. Van transferir-se un màxim de tres embri-

ons tenint en compte les característiques de la pacient i del cicle.

L'anàlisi estadística va realitzar-se mitjançant el programa SPSS. Es van aplicar els tests de Games-Howell i de *t*-Student per avaluar l'existència de diferències entre grups. La significació va establir-se en $p < 0,05$.

RESULTATS

Dels 106 cicles inclosos a l'estudi es van biopsiar un total de 857 embrions (mitjana de 8,1 embrions per cicle). Van ser diagnosticats 792 embrions (92,4 %): 277 van resultar cromosòmicament normals (35 %) i 515 foren anormals (65 %). De 65 embrions no es va poder obtenir un diagnòstic conclouent (7,6 %) (vegeu la taula 1). El 40 % dels embrions anormals (206/515) presentava anomalies numèriques complexes en què dos o més cromosomes es trobaven afectats, mentre que un 39,4 % (203/515) mostrava una aneuploidia simple. La resta d'embrions anormals van resultar haploides (54/515, 10,5 %) i poliploides (52/515, 10,1 %) (vegeu la taula 2). En les aneuploidies simples el cromosoma que es trobava afectat en un major percentatge de casos era el 16 (23,2 %), seguit del 22 (19,7 %) (vegeu la taula 3).

Segons el diagnòstic genètic del factor masculí es van establir tres grups: FISH en espermatozoides alterat (15 cicles, 14,2 %), anomalies sinàptiques (77

cicles, 72,6 %) i bloqueig meiótic (14 cicles, 13,2 %). La mitjana d'edat de les pacients va ser de 34 anys (rang: 21-45) i resultava comparable entre els tres grups. El percentatge d'embrions normals i anormals entre els diferents grups estudiats no va mostrar diferències estadísticament significatives (vegeu la taula 1). Tampoc no es van observar diferències significatives en el tipus d'anomalia observada en funció del grup (vegeu la taula 2).

Noranta-quatre dels 106 cicles van arribar a transferència (88,7 %). Es van transferir un total de 170 embrions ($\bar{x} = 1,8$), que van donar lloc a 30 embarassos (taxa d'embaràs per transferència: 31,9 %). La taxa d'implantació va ser del 21,8 % (37 sacs gestacionals/170 embrions transferits). La taxa d'embaràs múltiple va resultar del 20 % i la d'avortament del 16,7 %. No van trobar-se diferències estadísticament significatives entre els diferents grups d'estudi.

DISCUSSIÓ

Tot i que, segons les últimes dades publicades pel PGD Consortium de l'ESHRE, el factor masculí sever (FMS) és una indicació de pes per a la realització de PGS (~11 % dels casos de PGS, Goossens *et al.*, 2008), són poques les publicacions que aporten resultats detallats per a aquest grup de pacients i la comparació de les dades és difícil.

Els percentatges de normalitat cromosòmica de la nostra sèrie resulten lleugerament inferiors (35 % *vs.* 39,5 %) als del grup de FMS del Consortium (Goossens *et al.*, 2008). Això podria explicar-se per diferències en el nombre de cromosomes analitzats i també per l'heterogeneïtat dels pacients que probablement formen part del recull de l'ESHRE. El percentatge de cicles que arriba a transferència resulta superior en la nostra sèrie (88,7 % *vs.* 82,7 %). Això s'explicaria pel fet que en els nostres cicles es biopsia un nombre superior d'embrions (8,1 *vs.* 6,6). Els resultats pel que fa a taxes d'embaràs per cicle i per transferència (28,3 % i 31,9 % IU Dexeus *vs.* 26 % i 32 % Goossens *et al.*, 2008) resulten comparables, així com les taxes d'implantació (21,8 % *vs.* 23 %).

El percentatge d'anomalies complexes dels embrions de la nostra sèrie resulta superior al descrit en altres treballs en què s'analitzen embrions anormals de cicles de PGS (Abdelhadi *et al.*, 2003). Cal tenir en compte que una bona part dels nostres embrions possiblement haurien estat categoritzats com a mosaics si s'haguessin analitzat totes les cèl·lules, i això podria explicar aquestes diferències. Per altra banda,

no podem descartar que siguin degudes a un comportament peculiar dels casos de factor masculí d'origen genètic. S'ha trobat concordança amb les dades publicades pel que fa als cromosomes més implicats en la generació d'aneuploidia. En el nostre treball no s'han detectat diferències de comportament entre els tres grups de diagnòstic masculí. Tot i això, i a causa del baix nombre relatiu de casos inclosos en cada grup, caldria ampliar la sèrie per corroborar aquests resultats.

BIBLIOGRAFIA

- ABDELHADI, I.; COLLS, P.; SANDALINAS, M.; ESCUDERO, T.; MUNNÉ, S. (2003). «Preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes». *Reprod. Biomed. Online*, 6(2): 226-231.
- ARAN, B.; VEIGA, A.; VIDAL, F.; PARRIEGO, M.; VENDRELL, J. M.; SANTALO, J.; EGOZCUE, J.; BARRI, P. N. (2004). «Preimplantation genetic diagnosis in patients with male meiotic abnormalities». *Reprod. Biomed. Online*, 8(4): 470-476.
- BARRI, P. N. (1993). *Respuesta anómala a la estimulación de la maduración folicular en fecundación in vitro*. [Tesi doctoral]
- BLANCO, J.; EGOZCUE, J.; VIDAL, F. (1996). «Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization». *Hum. Reprod.*, 11: 722-726.
- CALDERON, G.; BELIL, I.; ARAN, B.; VEIGA, A.; GIL, Y.; BOADA, M.; MARTINEZ, F.; PARERA, N.; COROLEU, B.; PENELLA, J. (1995). «Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in-vitro fertilization: first results». *Hum. Reprod.*, 10: 2835-2839.
- EGOZCUE, J.; SARRATE, Z.; CODINA-PASCUAL, M.; EGOZCUE, S.; OLIVER-BONET, M.; BLANCO, J.; NAVARRO, J.; BENET, J.; VIDAL, F. (2005). «Meiotic abnormalities in infertile males». *Cytogenetic and Genome Research*, 111: 337-342.
- EGOZCUE, J.; TEMPLADO, C.; VIDAL, F.; NAVARRO, J.; MORER-FARGAS, F.; MARINA, S. (1983). «Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males». *Hum. Genet.*, 65: 185-188.
- GOOSSENS, V.; HARTON, G.; MOUTOU, C.; SCRIVEN, P. N.; TRAEGER-SYNODINOS, J.; SERMON, K.; HARPER, J. C. (2008). «ESHRE PGD Consortium data collection VIII: cycles from January to December 2005 with pregnancy follow-up to October 2006». *Hum. Reprod.*, 23(12): 2629-2645.
- SARRATE, Z.; VIDAL, F.; BLANCO, J. (2009). «Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance». *Fertil. Steril.* [En premsa]
- THORNHILL, A. R.; DE DIE-SMULDERS, C. E.; GERAEDETS, J. P.; HARPER, J. C.; HARTON, G. L.; LAVERY, S. A.; MOUTOU, C.; ROBINSON, M. D.; SCHMUTZLER, A. G.; SCRIVEN, P. N.; SERMON, K. D.; WILTON, L. (2005). «ESHRE PGD Consortium 'Best

- practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum. Reprod.*, 20: 35-48.
- VIDAL, F.; MORAGAS, M.; CATALÀ, V.; TORELLO, M. J.; SANTALO, J.; CALDERON, G.; GIMENEZ, C.; BARRI, P. N.; EGOZCUE, J.; VEIGA, A. (1993). «Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study». *Hum. Reprod.*, 8: 1740-1743.

TRANSFERÈNCIA D'EMBRIONS EN DIA 2 VERSUS DIA 3 EN CICLES DE FIV

Xavier Orriols,¹ Gemma Arroyo,¹ Montse Boada,¹ María José Gómez,¹ Pere N. Barri¹
i Anna Veiga^{1,2}

¹ Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus.

Av. Carles III, 175. 08028 Barcelona. xavorr@dexeus.com.

² Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona.

Resum

Objectiu: Avaluar si existeixen diferències entre la transferència embrionària en dia 2 i en dia 3 i determinar si en dia 3 és possible fer una millor selecció dels embrions a transferir. **Material i mètodes:** Estudi prospectiu aleatoritzat que compara qualitat embrionària, taxa d'embaràs, d'avortament i de «nen a casa» en dia 2 i dia 3. **Resultats:** Un 58,4 % dels embrions amb una puntuació òptima en dia 2 la mantenien en dia 3. Un 44,7 % dels embrions amb puntuació < 5 en dia 2 va millorar-la en dia 3. Les taxes d'embaràs i de «nen a casa», malgrat que les diferències no van ser significatives, van ser superiors en les transferències realitzades en dia 3. La taxa d'avortament va ser inferior en dia 3. **Discussió:** Malgrat el reduït nombre de casos del qual es disposa actualment, els resultats indiquen una major taxa d'embaràs i menor d'avortament en les transferències realitzades en dia 3.

Paraules clau: dia de transferència, qualitat embrionària, taxa d'embaràs, taxa d'avortament.

Abstract

Purpose: Evaluate if there are differences between day 2 and day 3 embryo transfers and determine if day 3 is better than day 2 to select the best embryos for transfer. **Material and Methods:** Prospective randomized study that compared embryo quality, pregnancy, miscarriage and take-home baby rates on day 2 and day 3. **Results:** 58.4% of embryos that had an optimum score at day 2, were also optimal quality on day 3. 44.7% of embryos presenting a score < 5 on day 2 improved it on day 3. Pregnancy and take-home baby rates, although differences were not statistically significant, were higher on day 3 transfers, whereas miscarriage rate was lower on day 3. **Discussion:** Although preliminary, our results indicate that pregnancy rates are higher and miscarriage rates are lower in transfers performed on day 3.

Key words: transfer day, embryo quality, pregnancy rate, miscarriage rate.

INTRODUCCIÓ

Obtenir taxes d'embaràs més elevades sense augmentar els embarassos múltiples és, sens dubte, un dels principals objectius d'un cicle de fecundació *in vitro*. Per seleccionar els embrions amb un major potencial de desenvolupament, els embriòlegs ens basem en paràmetres morfològics tals com el nombre i la simetria dels blastòmers, el percentatge de fragmentació i la multinucleació, entre d'altres. Malgrat això, encara hi ha molts aspectes que no són clars, com per exemple la influència del dia de transferència (dia 2 o dia 3 després de la punció fol·licular) en el resultat final.

En el nostre centre, habitualment la transferència es realitza el dia 2 després de la punció fol·licular. Alguns autors suggereixen que retardant la transfe-

rència al dia 3 és possible realitzar una millor selecció de l'embrió a transferir, i s'obtenen així millors taxes d'embaràs (Dawson *et al.* 1995).

Atès que no existeix un consens generalitzat en aquest punt, ens hem proposat avaluar si existeixen diferències en les taxes d'embaràs segons el dia de la transferència embrionària i si la transferència en dia 3 permet una millor selecció dels embrions a transferir.

Taula 1. Puntuació embrionària de l'IU Dexeus (la puntuació final de l'embrió s'obté de la suma dels diferents apartats)

Blastòmers	Dia 2	Dia 3	Puntuació
Nombre	≥ 4	≥ 6	6
	< 4	> 6	2
Mida i forma	Simètrics i regulars		1
	Lleugerament asimètrics o irregulars		0
	Asimètrics o irregulars		-1
Fragmentació (%)	< 10		3
	≥ 10-20		2
	≥ 20-30		1
	≥ 30-50		0
	≥ 50		-1
Multinucleació*			2

*Si l'embrió presenta multinucleació se li assignarà un 2 sense tenir en compte cap altre paràmetre.

Taula 2. Característiques de les pacients en els grups de transferència en dia 2 i dia 3

	D+2	D+3
Pacients (<i>n</i>)	46	39
Edat (anys, $\bar{x} \pm SD$)	35,9 ± 0,9	35,6 ± 0,9
Estradiol en sang (picograms, $\bar{x} \pm SD$)	2.985,2 ± 1.605,5	2.438,2 ± 1.334,1
Nre. fol·licles/cicle ($\bar{x} \pm SD$)	10,6 ± 5,9	9,95 ± 5,1
Nre. oòcits/cicle ($\bar{x} \pm SD$)	11,8 ± 6,1	11,4 ± 7,5
Nre. oòcits madurs (MII)/cicle ($\bar{x} \pm SD$)	9,4 ± 5,6	8,8 ± 5,9
Oòcits inseminats per FIV ($\bar{x} \pm SD$)	3,2 ± 4,4	1,7 ± 3,2
Oòcits inseminats per ICSI ($\bar{x} \pm SD$)	6,6 ± 5,7	7,5 ± 5,1
Nre. d'embrions transferits/cicle ($\bar{x} \pm SD$)	1,9 ± 0,6	1,9 ± 0,5

Les diferències entre ambdós grups no eren significatives per a cap de les variables mostrades.

MATERIALS I MÈTODES

Pacients

L'estudi prospectiu aleatoritzat inclou 85 pacients que es van sotmetre a un cicle de fecundació *in vitro* al Servei de Medicina de la Reproducció de l'Institut Universitari Dexeus. La recollida de dades va començar el novembre de 2007 i finalitzarà un cop s'hagin recollit el nombre de casos necessaris per a la realització de l'estudi ($n = 400$). L'aleatorització de les pacients, amb assignació de la transferència dels embrions en dia 2 (D+2; grup *a*) o dia 3 (D+3; grup *b*) després de la punció, es va dur a terme el dia de la punció fol·licular. S'hi van incloure totes les pacients d'edat compresa entre els 35 i 37 anys. Segons el sistema de puntuació d'embaràs múltiple (*score* d'embaràs múltiple, SEM) del nostre centre, a les pacients d'aquest rang d'edat els corresponia la transferència de 2 embrions (Barri, 2005).

L'estudi va ser aprovat pel Comitè d'Ètica del centre.

Estimulació i recuperació dels oòcits

L'estimulació de les pacients i la manipulació dels oòcits i dels embrions es va realitzar segons els protocols estàndard del nostre centre (Calderón *et al.* 1995).

Qualitat embrionària

La qualitat dels embrions va ser avaluada d'acord amb la puntuació Dexeus a les 46 ± 2 hores (dia 2) i a les 68 ± 2 hores (dia 3) després de la inseminació. Breument, la puntuació Dexeus classifica els embrions de l'1 al 10. Els paràmetres que té en compte són el nombre de blastòmers, la mida i la simetria, el percentatge de fragmentació i la multinucleació (vegeu la taula 1). S'estableixen tres grups de qualitat embrionària: qualitat òptima (puntuació ≥ 8), qualitat intermèdia (5-7) i mala qualitat (< 5).

Taula 3. Distribució dels embrions segons l'evolució de la puntuació en dia 2 i en dia 3

	Puntuació en D+2	Puntuació en D+3		
		< 5	5-7	8-10
	< 5	55,3 %	28,7 %	16,0 %
	5-7	22,1 %	56,4 %	21,4 %
	8-10	10,1 %	31,5 %	58,4 %

Taula 4. Distribució dels embrions segons la puntuació en dia 2 i l'aturada en el desenvolupament en dia 3

Puntuació D+2		Aturada en D+3	
		No	Sí
< 5		94,5 %	5,5 %
5-7		91,9 %	8,1 %
8-10		99,3 %	0,7 %

Les diferències entre grups no eren significatives.

Anàlisi estadística

Per a l'anàlisi estadística de les variables qualitatives es va emprar el test de χ^2 de Pearson i la prova exacta de Fisher. Per a les variables quantitatives es va usar el test de *t*-Student.

RESULTATS

Perfil de les pacients

Les pacients ($n = 85$) van ser distribuïdes en dos

grups: 46 pacients del grup *a* (transferència embrionària el dia 2 després de la punció) i 39 pacients del grup *b* (transferència el dia 3 després de la punció). No es van observar diferències estadísticament significatives en l'edat de les pacients, en els valors d'estradiol ni en el nombre de fol·licles el dia d'administració de la hCG ni en el nombre d'embrions transferits per cicle (vegeu la taula 2).

Taxa de fecundació i qualitat embrionària

Es van recuperar 815 oòcits, dels quals 745 (91,4 %) van ser aptes per a la inseminació posterior. La taxa de fecundació va ser del 74,1 %.

Pel que a fa a la distribució dels embrions quant a la qualitat embrionària (vegeu la figura 1) no s'observen diferències significatives entre D+2 i D+3. S'han trobat diferències estadísticament significatives quant al percentatge dels embrions multinucleats (12,2 % en D+2 vs. 4,9 % en D+3).

Analitzant l'evolució dels embrions, es va observar que un 58,4 % dels embrions que presentaven una puntuació òptima en D+2 mantenien una qualitat òptima en D+3, mentre que un 31,5 % van passar a qualitat intermèdia i un 10,1 % van convertir-se en embrions de mala qualitat. D'altra banda, dels embrions que en D+2 presentaven una puntuació < 5, un 44,7 % va millorar la seva qualitat en D+3 (vegeu la taula 3).

Finalment, s'ha pogut observar que els embrions òptims en D+2 que es mantenien en cultiu fins a D+3 tenien una menor probabilitat d'aturar el seu

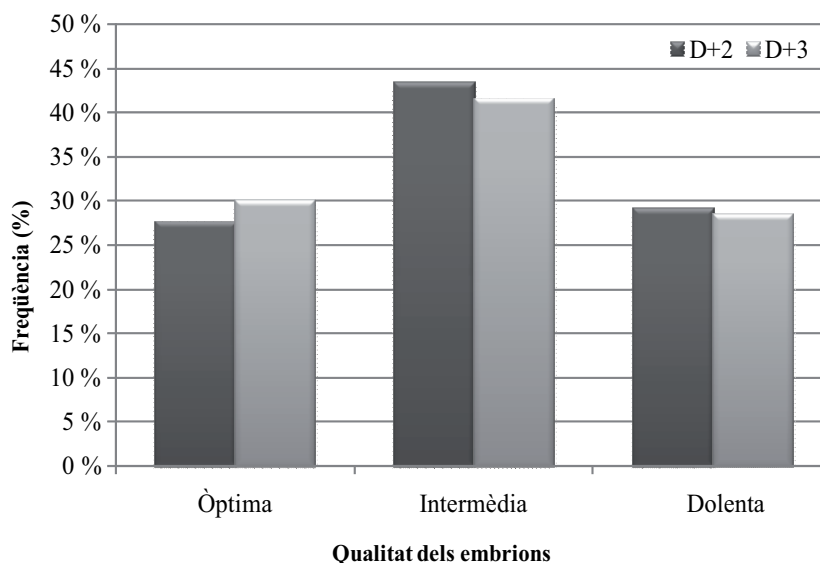


Figura 1. Distribució dels embrions segons la qualitat i el dia de cultiu. No s'observen diferències estadísticament significatives en les dades presentades.

desenvolupament quan es comparen amb la resta de categories, malgrat que les diferències no són significatives (vegeu la taula 4).

Taxes d'embaràs, de «nen a casa» i d'avortament

Malgrat que la taxa d'embaràs per cicle i la taxa de «nen a casa» va ser superior en les pacients del grup *b* (D+3: 41,1 % i 23,3 %, respectivament) respecte a les del grup *a* (D+2: 35,6 % i 15,8 %), aquestes no eren estadísticament significatives.

La taxa d'avortament va ser superior en aquelles pacients en què es va realitzar la transferència en D+2 (37,5 %) davant les pacients en què es va dur a terme en D+3 (18,8 %), tot i que les diferències no són significatives.

DISCUSSIÓ

Els nostres resultats mostren que la transferència en D+3 comporta una taxa d'embaràs i de «nen a casa» superior a la transferència en D+2, malgrat que les diferències no són significatives. En aquest mateix sentit, la taxa d'avortament és més baixa en D+3 que en D+2.

Encara que el nombre de casos analitzats és encara insuficient, els resultats no difereixen d'altres estudis similars publicats amb anterioritat.

Diversos autors (Os *et al.*, 1989; Dawson *et al.*, 1995; Carrillo *et al.*, 1998) van mostrar indicis que la transferència en D+3 podria comportar millores en la taxa d'implantació i d'embaràs en permetre una millor selecció embrionària. En canvi, altres estudis (Huisman *et al.*, 1994; Ertzeid *et al.*, 1999; Laverge *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003; Blake *et al.*, 2009) no han trobat diferències significatives que permetin afirmar que la transferència en D+3 comporta una taxa d'embaràs i de «nen a casa» superior. Alguns autors afirmen fins i tot que la transferència en dia 2 estaria indicada en casos de pitjor pronòstic (Scott *et al.*, 2007; Blake *et al.*, 2009), ja que els embrions de mala qualitat podrien aturar el seu desenvolupament en condicions de cultiu *in vitro*. D'altra banda, la transferència en dia 2 no permet observar l'aturada dels embrions que en dia 3 no aconsegueixen activar el seu genoma. És per això que caldria transferir un nombre superior d'embrions, amb el consegüent perill d'embaràs múltiple (Ménézo i Dale, 1995).

Un cop l'estudi es completi, l'augment mostrat podria proporcionar significança als primers resultats descrits, els quals sembla que indiquen que realitzar la transferència en D+3 permet obtenir una ta-

xa d'embaràs i de «nen a casa» superior. Caldria també analitzar si es tractaria d'un protocol aplicable a totes les parelles o si bé existiria un grup determinat de pacients que se'n podria beneficiar. Sospitem que la resposta de les pacients i el fet de poder realitzar una transferència selectiva serien els factors més importants a l'hora de poder oferir a les pacients la transferència embrionària en dia 3.

BIBLIOGRAFIA

- BARRI, P. N. (2005). «Multiple pregnancies: a plea for informed caution». *Human Reproduction Update*, 11(1): 1-2.
- BLAKE, D.; FARQUHAR, C.; JOHNSON, N.; PROCTOR, M. (2007). «Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception (Cochrane Database System Review)». *The Cochrane Library*, 4: CD002118, 1-122.
- 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». *Human Reproduction*, 10(11): 2835-2839.
- CARRILLO, A. J.; LANE, B.; PRIDMAN, D. D.; RISCH, P. P.; POOL, T. B.; SILVERMAN, I. H.; COOK, C. L. (1998). «Improved clinical outcomes for in vitro fertilization with delay of embryo transfer from 48 to 72 hours after oocyte retrieval: use of glucose- and phosphate-free media». *Fertility and Sterility*, 69(2): 329-334.
- DAWSON, K. J.; CONAGHAN, J.; OSTERA, G. R.; WINSTON, R. M. L.; HARDY, K. (1995). «Delaying transfer to the third day post-insemination, to select non-arrested embryos, increases development to the fetal heart stage». *Human Reproduction*, 10(1): 177-182.
- ERTZEID, G.; DALE, P. O.; TANBO, T.; STORENG, R.; KJEKSHUS, E.; ABYHOLM, T. (1999). «Clinical outcome of day 2 versus day 3 embryo transfer using serum-free culture media: a prospective randomized study». *Journal of Assisted Reproduction and Genetic*, 16(10): 529-534.
- HUISMAN, G. J.; ALBERDA, A. T.; LEERENTVELD, R. A.; VERHOEFF, A.; ZEILMAKER, G. H. (1994). «A comparison of in vitro fertilization results after embryo transfer after 2, 3, and 4 days of embryo culture». *Fertility and Sterility*, 61(5): 970-971.
- LAVERGE, H.; SUTTER, P. DE; ELST, J. VAN DER; M. DHONT. (2001). «A prospective, randomized study comparing day 2 and day 3 embryo transfer in human IVF». *Human Reproduction*, 16(3): 476-480.
- MÉNÉZO, Y.; DALE, B. (1995). «Paternal contribution to successful embryogenesis». *Human Reproduction*, 10(6): 1326-1328.
- OS, H. C. VAN; ALBERDA, A. T.; JANSSEN-CASPER, H. A.; LEERENTVELD, R. A.; SCHOLTES, M. C.; ZEILMAKER, G. H. (1989). «The influence of the interval

- between in vitro fertilization and embryo transfer and some other variables on treatment outcome». *Fertility and Sterility*, 51(2): 360-362.
- SANTOS, M. J. DE LOS; MERCADER, A.; GALÁN, A.; ALBERT, C.; ROMERO, J. L.; PELLICER, A. (2003). «Implantation rates after two, three, or five days of embryo culture». *Placenta*, 24: S13-S19.
- SCOTT, L.; FINN, A.; O'LEARY, T.; MCLELLAN, S.; HILL, J. (2007). «Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates». *Human Reproduction*, 22(1): 230-240.

FLUX DE PACIENTS D'ALTRES PAÏSOS PER A TRA: MOTIVACIONS I CARACTERÍSTIQUES

Oriol Oliana,¹ Laia Echeverria,¹ Montserrat Boada,¹ Buenaventura Coroleu,¹ Anna Veiga^{1,2}
i Pere N. Barri¹

¹ Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció de l'USP Institut Universitari Dexeus.
Gran Via Carles III, 71-75. 08028 Barcelona. monboa@dexeus.com.

² Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona.

Resum

La legislació que regula les tècniques de reproducció humana assistida varia molt entre països. Aquest fet, juntament amb el caràcter permissiu de la legislació espanyola, ha propiciat un gran flux de pacients internacionals cap al nostre país per rebre els tractaments que necessiten. El present estudi analitza les característiques de les pacients rebudes a l'Institut Universitari Dexeus durant el període d'un mes, a través d'un qüestionari anònim de caire personal i mèdic. Els resultats posen de manifest que el 91,7 % de les parelles eren d'origen italià, casades o que vivien en parella, i que el motiu principal del viatge va ser rebre un tractament de més qualitat o bé el fet que al seu país la legislació no permetia determinades tècniques (47,6 % i 33,8 %, respectivament). Pel que fa al tractament, es van desplaçar majoritàriament per a la donació de gàmetes i embrions (61,1 % de les pacients). L'elecció del centre va ser per assessorament mèdic (47,2 %) o per consell d'amics i familiars (36,1 %) en la majoria dels casos. Els resultats mostren que les lleis restrictives tenen com a conseqüència el desplaçament de les parelles a altres països, i fan necessari instaurar un mecanisme de control per garantir la qualitat i la seguretat dels tractaments.

Paraules clau: flux reproductiu de pacients, legislació, internacional.

Abstract

Legislation that regulates human assisted reproduction techniques varies between countries. This fact, in addition to the permissive nature of Spanish legislation, had brought a huge flux of international patients to our country, looking for the treatment needed. The present study analyses the characteristics of the patients admitted in the Institut Universitari Dexeus for one month, through a personal and medical anonymous questionnaire. The results highlight that 91,7% of the couples were from Italy, married or living as a couple, and that the main causes for travelling were to receive a higher quality treatment or due to the prohibition of some techniques in their country (47.6% and 33.8%, respectively). With regard to treatment, they travel mainly for gamet and embryo donation (61.1% of the patients). The centre choice was due to medical support (47.2%) or relatives and friends advice (36.1%) in most cases. The results show that restrictive laws result in couples travelling to other countries, making necessary to create a control mechanism to guarantee treatment quality and safety.

Key words: cross border reproductive care, legislation, international.

INTRODUCCIÓ

En els últims anys s'ha observat un augment de parelles estrangeres que vénen al nostre país per rebre tractaments de reproducció assistida. Majoritàriament això respon a les diferències existents en les legislacions sobre les tècniques de reproducció assistida (TRA). La proximitat de països amb legislacions més permissives, així com la facilitat actual de moviment entre aquests, ha propiciat aquest augment de parelles estrangeres que, de manera general es co-

neix com a «turisme reproductiu» o *cross-border reproductive care* (ESHRE, European Society of Human Reproduction and Embryology). Aquest fenomen no és exclusiu de l'Estat espanyol, sinó que també s'ha observat en molts altres països europeus amb legislacions permissives com Dinamarca, Suècia, Eslovènia, la República Txeca, Bèlgica i el Regne Unit, i també en països no europeus com els Estats Units, on determinats estats gaudeixen d'una normativa molt liberal (IFFS Surveillance, 2007).

Els països europeus amb lleis més restrictives són

Itàlia i Alemanya, països en els quals s'ha registrat una davallada significativa en el nombre de cicles que es duen a terme (Nyboe *et al.*, 2008; Brown, 2007). La llei italiana (Llei 40/2004) és un clar exemple de legislació restrictiva, i ha tingut com a conseqüència un augment dels embarassos múltiples en dones joves i una disminució de les taxes d'embaràs (Benagiano *et al.*, 2004), així com l'increment del nombre de cicles d'estimulació ovàrica i punció folicular (Brown, 2007).

Aquest flux de pacients no és la millor opció, tot i que s'ha convertit en una solució per evitar conflictes morals (Pennings, 2004). Ens trobem davant d'una realitat que sembla difícil de canviar. Les recomanacions del grup d'interès de l'ESHRE sobre aquest tema (*Task force on ethics and law*) estan en el sentit d'intentar mitigar les diferències legislatives entre països i d'introduir un sistema de control que garanteixi seguretat i efectivitat en els tractaments (Pennings, 2004; Pennings *et al.*, 2008). La preocupació que ha generat aquest fenomen ha conduït a la posada en marxa de diferents estudis per avaluar-ne l'impacte. Diverses societats de reproducció assistida s'han organitzat per compartir experiències i arribar a un consens entre països, i assegurar així qualitat en els tractaments (*Cross-border reproductive care study*, ESHRE, en premsa; First Internacional Forum on Cross-Border Reproductive Care, 2009).

L'estudi de l'ESHRE ha conduït a la recollida de dades per part de diferents països receptors massius de pacients estrangeres per poder avaluar les característiques d'aquestes, els motius del desplaçament i les condicions en què realitzen les TRA en el país d'acollida. En el present estudi s'exposen les dades obtingudes per l'Institut Universitari Dexeus després de passar el qüestionari elaborat per l'ESHRE a totes les pacients estrangeres rebudes al llarg del mes de novembre de 2008.

MATERIAL I MÈTODES

La recollida de dades es va fer mitjançant un qüestionari anònim que contenia preguntes de caire personal i mèdic. El qüestionari es va facilitar a través del servei d'atenció al pacient internacional (SA-PI) a totes les parelles estrangeres que van rebre tractaments de fertilitat en el nostre centre durant el mes de novembre de 2008. El qüestionari estava traduït als idiomes italià, francès, anglès i alemany.

Constava de dues parts diferenciades. Una part era de preguntes personals: edat, país de residència, estat civil, orientació sexual, nivell d'estudis i si es

va rebre la informació en el seu idioma. L'altra part de preguntes estava relacionada amb el tractament i podia tenir múltiples respostes: motius del viatge, quin tractament venia a rebre, si va rebre informació econòmica prèviament, si el preu incloïa la medicació, si rebria algun reemborsament del cost del tractament al seu país, com va escollir el centre i si rebria ajuda del seu metge al seu país.

RESULTATS

S'han analitzat un total de 72 qüestionaris, el resultat dels quals es presenta a continuació.

Nacionalitat

La majoria de les parelles estrangeres rebudes en aquest mes provenien d'Itàlia (66/72, 91,7 %). La resta de parelles eren dues franceses, una marroquina, una sueca, una anglesa i una russa.

Edat

De les 72 pacients, la majoria tenien entre 36 i 45 anys (51/72, 70,8 %), i únicament 15 tenien menys de 36 anys (20,8 %). La mitjana d'edat de les pacients rebudes era de $39 \pm 4,6$ anys i la distribució d'edat de les pacients en rangs de 5 anys era la següent: < 30 (3/72, 4,2 %), 31-35 (12/72, 16,7 %), 36-40 (30/72, 41,7 %), 41-45 (21/72, 29,2 %), 46-50 (6/72, 8,3 %).

Estat civil

La majoria de les pacients estudiades estaven casades (53/72, 73,6 %), mentre que un 26,4 % (19/72) referien viure en parella sense especificar el sexe. Cap d'elles era soltera.

Orientació sexual

Totes les parelles que contestaren manifestaven ser heterossexuals (56/72, 77,8 %) a excepció de dos casos; una homosexual (1,4 %) i una bisexual (1,4 %). Cal ressaltar que 14 casos (19,4 %) no contestaren aquesta pregunta.

Nivell d'estudis

Els resultats estan especificats a la figura 1.

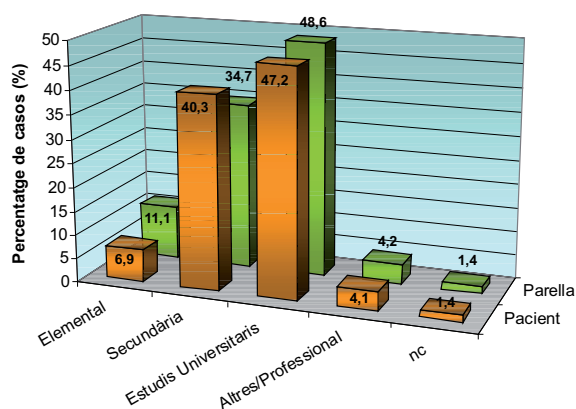


Figura 1. Nivell d'estudis de la pacient i la parella.

Informació del tractament en la llengua pròpia

De les 66 parelles italianes, dues van contestar que no havien rebut satisfactòriament el qüestionari en la seva llengua i dues no van contestar la pregunta. Pel que fa a les parelles franceses, angleses i sueques, totes van contestar satisfactòriament, mentre que la parella marroquina i la russa no ho van fer, ja que no es disposava de qüestionaris en la seva llengua.

Motiu del viatge

Vint-i-dues de les 72 parelles (30,6 %) només van marcar una única resposta: 10 van venir perquè el tractament era il·legal al seu país, 9 per obtenir millor qualitat en el tractament, 1 per tractaments anteriors

no satisfactoris, 1 per causes legals i 1 per altres motius. Les 50 parelles restants (69,4 %) marcaven resposta múltiple (vegeu la figura 2).

Tractament que ve a rebre

La TRA per la qual manifestaren acudir majoritàriament eren els cicles de FIV o ICSI, (39/72, 54 %), seguit dels cicles de donació de gàmetes i embrions (27/72, 37,5 %): 22 per a donació d'òocits, 3 per a donació de semen i 2 per a donació d'embrions.

Informació prèvia del preu del tractament

En un 97 % dels casos contestaren haver rebut informació satisfactòria sobre els preus dels tractaments abans de començar el cicle.

Reemborsament del tractament al país d'origen

Cinquanta-sis (84,8 %) de les 66 parelles italianes manifestaren no rebre cap tipus de reemborsament al seu país d'origen, mentre que 8 contestaren que rebrien un reemborsament parcial del cost del tractament i 2 no responien la pregunta. Pel que fa a les parelles d'altres països, cap de les 6 no manifestaren rebre cap tipus de reemborsament.

Elecció del centre

L'elecció del centre havia estat per consell del seu metge propi en 34 dels 72 casos (47,2 %), 26 per re-

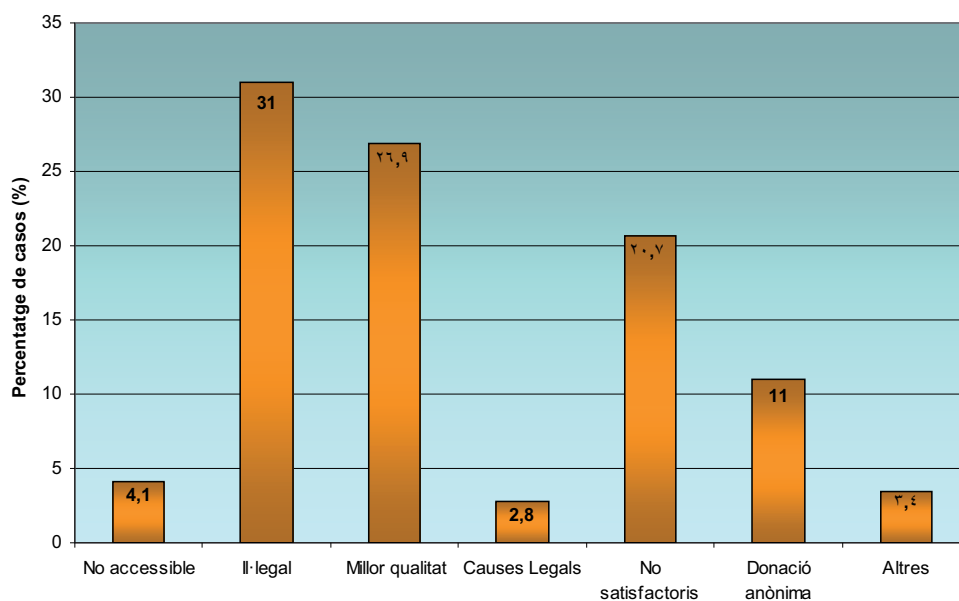


Figura 2. Motiu pel qual les pacients es desplacen per fer el tractament a l'estranger.

comanacions d'amics o familiars (36,1 %) i 7 (9,7 %) l'havien trobat a través d'Internet (vegeu la figura 3).

Ajuda del metge del país propi

A la figura 4 es representen les dades obtingudes.

DISCUSSIÓ

Aquest estudi s'ha realitzat d'acord amb els 72 qüestionaris obtinguts. A causa del perfil de parelles estrangeres que rep l'Institut Universitari Dexeus, aquestes són majoritàriament d'origen italià. El fet que pràcticament el 50 % de les pacients tinguessin un nivell d'estudis universitaris i una edat mitjana de $39 \pm 4,6$ anys pot indicar que el nivell tant intel·lectual com socioeconòmic d'aquestes és de grau mitjà-alt, cosa que indicaria un poder adquisitiu també mitjà-alt.

L'elevada manca de resposta a la pregunta sobre orientació sexual, un 19,4 %, posa de manifest que encara es tracta d'un tema tabú. Podria indicar de manera encoberta que algunes d'aquestes pacients havien estat excloses dels tractaments de reproducció per aquesta raó, i es veien obligades a desplaçar-se per aquest motiu. Dels dos casos que vingueren per inseminació amb esperma de donant, només una va manifestar-se com a homosexual, i en tots dos casos convivia en parella, encara que no s'especificava si masculina o femenina.

Pel que fa a les raons per les quals les parelles han vingut al nostre centre, els resultats d'aquest es-

tudi indiquen com a primera opció la cerca d'una millor qualitat i bons resultats (47,6 %), fins i tot abans que els motius legals (33,8 %). Totes les respostes de parelles italianes que han manifestat no estar satisfetes amb el tractament rebut al seu país (41,6 %) s'han considerat com a motius legals, ja que la limitació d'inseminar únicament tres oòcits fa que les probabilitats d'èxit disminueixin considerablement. En menor percentatge trobem donació de gàmetes anònima i que el tractament no era accessible al seu país (11 % i 4,1 %, respectivament). La valoració de la informació rebuda ha estat majoritàriament satisfactòria, ja que el centre disposa d'un servei d'atenció a la pacient internacional que permet oferir un tracte personalitzat en l'idioma d'origen. La implementació d'aquest tipus de serveis en els centres que acullen parelles estrangeres ha proliferat en els últims anys, i és del tot indispensable per donar una atenció acurada i coherent amb la realitat d'aquestes pacients.

Respecte de la possibilitat de reemborsament del cost econòmic del tractament, s'observa que en la major part dels casos aquest fet no es produeix (86,1 %).

És evident que per als països amb legislacions més permissives, el flux de pacients de TRA ha suposat una important font d'ingressos i ha propiciat la creació o ampliació de molts centres de TRA, però, tal com indiquen les recomanacions de l'ESHRE, és molt important establir mecanismes que permetin controlar la qualitat i la seguretat dels tractaments rebuts. En aquest sentit, els esforços haurien d'anar orientats a potenciar, d'una banda, la monitorització per part del metge del país d'origen (actualment no-

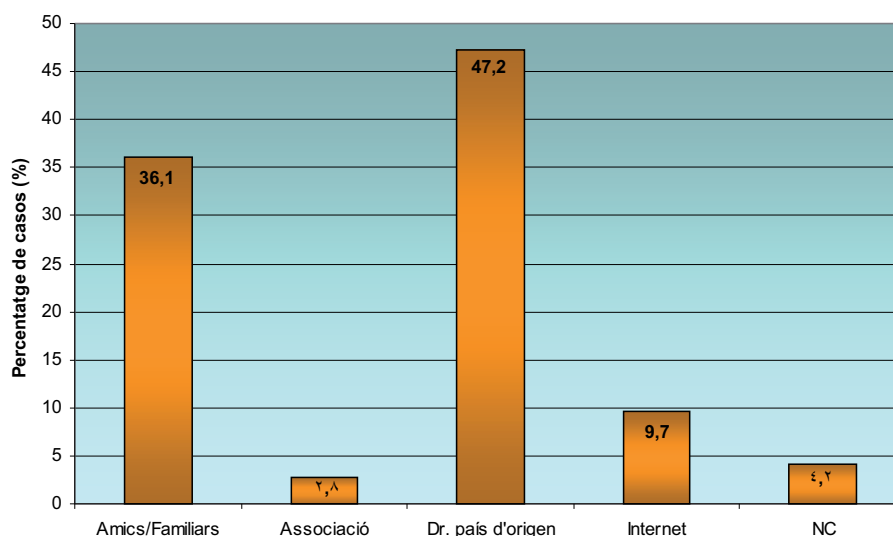


Figura 3. Motiu de l'elecció del centre.

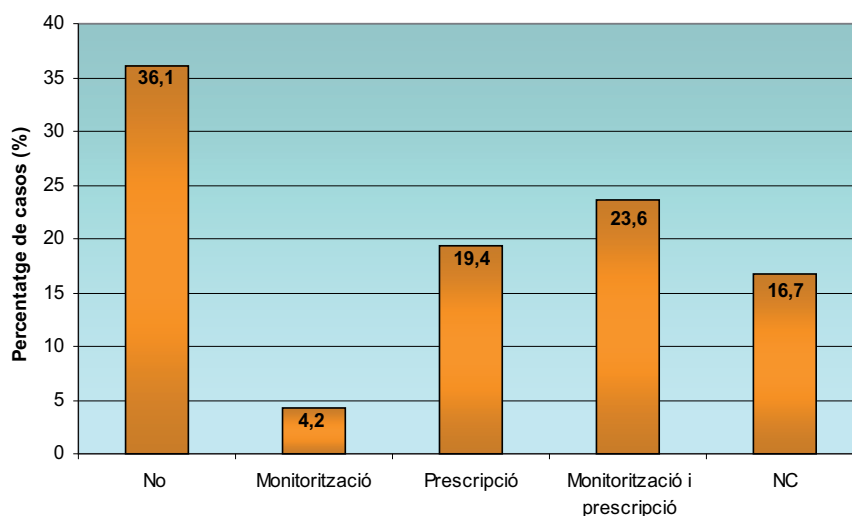


Figura 4. Seguiment del tractament per part d'un metge del país propi.

més ocorre en el 27,8 % dels casos), de manera que es redueixi així el període de temps a l'estranger, i de l'altra, a promoure l'assessorament psicològic mentre estiguin al país on realitzen la TRA per tal de minimitzar les conseqüències.

Els resultats d'estudis com aquest ajudaran a aportar dades sobre la dimensió d'aquestes pràctiques. Creiem que aquests estudis són molt importants per disposar de la informació necessària per garantir un tractament adequat d'aquestes pacients respectant la seguretat, bona praxi i valors ètics. Els aspectes relacionats amb la situació laboral de la pacient i com aquesta es veu afectada, així com preguntes relacionades amb la religió i les seves creences, haurien de ser incloses en futurs estudis. La instauració d'algun mecanisme de control per part d'organismes o societats qualificades garantiria el correcte seguiment d'aquests casos i podria orientar

envers una actuació més adient per a aquest nou fenomen.

BIBLIOGRAFIA

- BENAGIANO, G.; GIANAROLI, L. (2004). «The new italian IVF legislation». *RBM Online*, 9: 117-125.
- BROWN, S. (2007). «Italy: Living with Law 40». *Focus on Reprod., ESHRE*, gener: 26-30.
- JONES, W.; COHEN, J. (2007). «IFFS Surveillance 07». *Fertil. Steril.*, 87(4), Supl. 1.
- PENNING, G. (2004). «Legal harmonization and reproductive tourism in Europe». *Hum. Reprod.*, 19(12): 2689-2694.
- PENNINGS, G.; WERT, G. DE; SHENFIELD, F.; COHEN, J.; TARLATZIS, B.; DEVROEY, P. (2008). «ESHRE task force on ethics and law 15: cross-border reproductive care». *Hum. Reprod.*, 23(10): 2182-2184.

DESTÍ DELS EMBRIONS DONATS: LA NOSTRA EXPERIÈNCIA

Mariona Hugas,¹ Maria Fernandez,¹ Lídia Julià,¹ Begoña Aran,² Anna Veiga² i Joan Sarquella¹

¹Unitat de Reproducció Humana i Diagnòstic Genètic, Clínica Girona.

labfiv@girofiv.com.

²Banc de Línies Cèl·lulars, Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB).

Resum

L'aprovació de la Llei 45/2003 i de la seva successora 14/2006 ha comportat un canvi molt important, ja que ha permès la recerca amb embrions supernumeraris procedents de tractaments de fecundació *in vitro*. Els objectius d'aquest estudi retrospectiu, de 87 pacients ($n = 285$ embrions) des de gener de 2004 fins al febrer de 2009, són: analitzar si diferents paràmetres influeixen a l'hora de prendre la decisió sobre el destí final d'aquests embrions, fer un seguiment d'aquells que s'han donat per a recerca i valorar l'estat actual del nostre banc. La tendència ha estat donar-los per a recerca, i això representa un 64,37 %, davant un 35,63 % que els donen per a altres parelles amb finalitats reproductives. Cap parella ha optat per la descongelació sense cap finalitat. S'han observat diferències significatives quant a la mitjana d'embrions criopreservats per pacient. A més nombre d'embrions per pacient, més tendència a donar-los per a altres parelles ($p \leq 0,05$). El mateix passa si augmenta l'edat de la pacient ($p \leq 0,05$). Dels embrions donats per a recerca ($n = 111$), els descongelats fins ara han donat una taxa de supervivència del 87,8 % i s'ha aconseguit una línia cel·lular. Si bé valorem positivament l'efecte de la nova Llei 14/2006, atès que ha donat sortida a embrions que fins ara no en tenien, l'efecte no és tan positiu quan es tracta de pacients acollides al programa de donació d'embrions amb finalitats reproductives. Els bons resultats en la descongelació i el cultiu d'aquests embrions donats per a recerca animen a continuar col·laborant en propers projectes.

Paraules clau: criopreservació, donació d'embrions, recerca.

Abstract

The approval of the Law 45/2003 and then Law 14/2006 brought an important change, allowing to donate surplus frozen embryos for stem-cell research. The aims of this retrospective study of 87 patients ($n = 285$ embryos), between 2004 to February 2009 are: to study if different parameters have influenced patient choices for embryo disposition, do the follow-up of the embryos donated for research to CMRB and value our current embryo's bank. The majority of patients (64.37%) designated their embryos for a research purpose and the rest of patients (35.63%) designated theirs to other infertile patients. No patients decided to discard their embryos. Age is significantly higher in those patients who designated their embryos for other infertile patient ($p \leq 0.05$). We can observe the same in the group with more cryopreserved embryos ($p \leq 0.05$). The survival rate of these embryos designated for research purpose was 87.8%. One cellular line have been achieved. The positive aspect of the new regulation (Law 45/2003) is that it gives an opportunity to the embryos without any, but is not so positive for these patients who are waiting for donated embryos. Good results in thawing and culturing research embryos encourage us to continue the collaboration in new projects.

Key words: cryopreservation, embryo donation, research.

INTRODUCCIÓ

Fins l'entrada en vigor de la Llei 45/2003, aquelles parelles que volien deixar de mantenir els seus embrions criopreservats, tan sols podien recórrer a l'opció de donar-los a altres parelles per destinar-los a finalitats reproductives.

En els casos en què les parelles no es mostraven d'acord amb l'esmentada opció, el nostre centre hi

perdia el contacte, amb els inconvenients que això comportava: l'augment del nombre d'embrions criopreservats i la impossibilitat de donar-los sortida.

L'aprovació de la Llei 45/2003 i de la seva successora 14/2006 ha comportat un ventall més ampli d'opcions. Tant és així que es permet la utilització d'aquests embrions supernumeraris per destinar-los a ús propi, per a finalitats reproductives d'altres parelles, per a recerca, o bé es poden destruir.

El present estudi se centra en aquelles pacients que, un cop acabat el seu projecte reproductiu, han de decidir sobre quina sortida volen donar als embrions sobrants. És així que s'ha analitzat si els següents paràmetres: *a*) temps que fa que els embrions són criopreservats, *b*) nombre d'embrions congelats per pacient, *c*) tenir o no descendència i *d*) l'edat de la pacient en el moment que es van criopreservar, han influït a l'hora de decidir donar els embrions a altres parelles amb finalitats reproductives, destinar-los a recerca, o bé optar per la destrucció.

Des del primer moment el nostre equip ha cregut fermament en la importància de la recerca biomèdica amb embrions humans. Tant és així que ha estat molt gratificant ser un dels primers centres a signar el conveni de col·laboració amb el Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB). Per tant, un segon objectiu de l'estudi és fer un seguiment d'aquells embrions que s'han donat per a recerca.

El tercer i darrer objectiu és fer una valoració de l'estat actual del banc d'embrions del nostre centre.

MATERIAL I MÈTODES

Estudi retrospectiu des de gener de 2004 fins al febrer del 2009 d'un total de 87 pacients amb embrions supernumeraris criopreservats procedents de tractaments de fecundació *in vitro* (FIV) que entren dins el programa de donació d'embrions del centre.

Es va informar del nou àmbit legal a totes les parelles amb embrions criopreservats i tot seguit els vam demanar que escollissin una de les opcions anotades. En aquells casos en què el centre havia perdut el contacte amb els pacients, la primera opció va ser connectar-hi per via telefònica, i quan això no va ser possible, es va procedir a la remissió de cartes certificades. Tanmateix, el centre no ha obtingut cap resposta d'aquells pacients informats per correu.

Centrant-nos en els pacients que van decidir donar els seus embrions per a recerca, aquests es van

comprometre a la signatura del consentiment preceptiu amb el projecte de recerca concret, tan bon punt aquest fos una realitat. Aquesta realitat va arribar amb la signatura, el febrer de 2008, del conveni de col·laboració amb el Banc de Línees Cel·lulars del CMRB per al projecte «Derivació de línees de cèl·lules madre embrionàries en condicions lliures de xenobiòtics y caracterización *in vivo* de su pluripotencialidad». Actualment el nostre Centre està a l'espera d'un nou projecte.

Els resultats s'han analitzat estadísticament amb el test de la χ^2 i el paquet estadístic SPSS 11.5 de comparació de mitjanes. Els valors amb $p \leq 0,05$ s'han considerat estadísticament significatius.

RESULTATS

De les 87 pacients que han donat els seus embrions ($n = 285$), un 35,63 % ($n = 118$) ho han fet a favor d'altres parelles per a finalitats reproductives i el 64,37 % ($n = 167$) restant s'ha decantat per la donació per a recerca. Aquests resultats es poden comparar amb els de Burton *et al.*, 2004.

La mitjana d'embrions criopreservats per pacient en el grup de donació a favor d'altres parelles és de 3,8, i en el de donació per a recerca és de 2,98. El valor estadístic de $p = 0,029$ ens indica que hi ha diferències significatives entre aquests dos grups (vegeu la taula 1).

Pel que fa a la mitjana d'edat de les pacients, en el grup de donació a favor d'altres parelles és de 37,13 i en el de recerca, de 34,89, de manera que s'observen diferències estadísticament significatives amb $p = 0,05$ (vegeu la taula 1).

En el paràmetre «tenir o no descendència» no s'observen diferències significatives en els dos grups: en el d'altres parelles és d'un 87,09 % i en el de recerca del 80,37 %.

Finalment, el paràmetre «anys que fa que els embrions estan congelats» en els intervals $< 2, 2-5$ i > 5

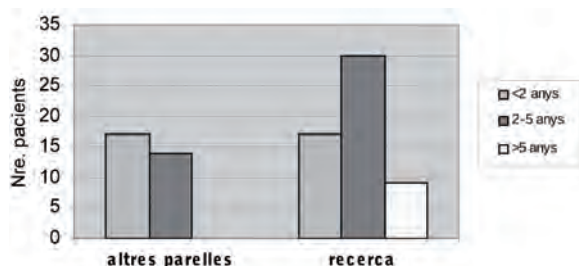


Figura 1. Preferències de les parelles en funció dels anys de criopreservació.

Taula 1. Resultats

	Altres parelles	Recerca	Total
Nre. pacients	31 (35,63 %)	56 (64,37 %)	87
Nre. embrions	118	167	285
\bar{x} embrions/pac.	3,8*	2,98*	3,27
\bar{x} edat	37,13*	34,89*	35,69
Amb descendència	87,09 %	80,37 %	82,75 %

* $p \leq 0,05$

Taula 2. Resultats de descongelacions i derivacions (CMRB)

	D+2	D+3	Total
Nre. embrions descongelats	16	53	69
Nre. embrions que no es troben a la palleta		3	3
Nre. supervivents	15 (93,7 %)	43 (86 %)	58 (87,8 %)
Supervivència del 100 %	11 (73,3 %)	22 (51,2 %)	33 (56,9 %)
Nre. blasts	3 (20 %)	10 (23,2 %)	13 (22,4 %)
Sembrats	3	8	11
Inici del creixement	3	2	5
Línies		1	1

anys ($p = 0,1393$) tampoc no influeix en les parelles a l'hora de donar els embrions per a altres parelles o per a recerca (vegeu la figura 1).

Els embrions donats per a recerca van ser traslladats al CMRB en dos enviaments. Un el juliol i l'altre el desembre de 2008, amb un total de 111 embrions provinents de 38 pacients. Tal i com reflecteix la taula 2, en els embrions descongelats fins al moment, la taxa de supervivència va ser del 87,8 % i s'ha aconseguit una línia cel·lular. La línia cel·lular obtinguda és l'ES[7] i actualment està en passada 5.

Actualment, en el nostre banc, tenim un total de 591 embrions, dels quals 490 són per a ús propi, 11 per a altres parelles i 56 per a recerca. Resten 34 embrions procedents de 9 pacients amb els quals el centre ha perdut el contacte.

DISCUSSIÓ

De tots els paràmetres valorats observem diferències estadísticament significatives quan comparem els diferents grups segons el nombre d'embrions criopreservats per pacient i l'edat de les pacients. Així podem concloure que el grup de pacients amb un nombre d'embrions criopreservats més elevat tendeixen a donar-los a altres parelles i no per a recerca. Així mateix, les parelles amb més edat també es decanten per aquesta opció.

Es pot observar que la majoria de parelles opten per donar els embrions preferentment per a la recerca (Luna *et al.*, 2007; Hammarberg *et al.*, 2006).

Un fet rellevant és que cap parella no hagi demanat l'opció de la destrucció. Aquest fet es podria atribuir, potser, a una influència indirecta a l'hora d'informar (Heng, 2006; Fuscaldo *et al.*, 2007). O potser, al fet que el grup estudiat presenta un nombre de pacients reduït.

Actualment al nostre banc tenim molts més embrions destinats a recerca que a la donació a favor d'altres parelles. Per tant, el temps d'espera per a una transferència d'embrions donats ha augmentat molt en els últims dos anys.

Si bé valorem positivament l'efecte de la nova Llei 14/2006, atès que ha donat sortida a embrions que fins ara no en tenien, l'efecte no és tan positiu quan es tracta de pacients acollides al programa de donació d'embrions amb finalitats reproductives.

Els bons resultats en la descongelació i el cultiu d'aquests embrions donats al CMRB animen a continuar col·laborant en propers projectes.

BIBLIOGRAFIA

- BURTON, P. J.; SANDERS, K. (2004). «Patient attitudes to donation of embryos for research in Western Australia». *Med. J. Aust.*, 180: 11.
- FUSCALDO, G.; RUSSELL, S.; GILLAM, L. (2007). «How to facilitate decisions about surplus embryos: patients' views». *Human Reproduction*, 12: 3129-3138.
- 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.
- HENG, B. C. (2006). «Donation of surplus frozen embryos for stem cell research or fertility treatment-should medical professionals and healthcare institutions be allowed of their former patients?». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 23: 9-10.
- Llei 45/2003 del 21 de novembre, per la qual es modifica la Llei 35/1988, del 22 de novembre, sobre Tècniques de Reproducció Assistida. BOE, 280.
- Llei 14/2006, del 26 de maig, sobre Tècniques de Reproducció Assistida. BOE, 126.
- LUNA, M.; BOADA, M.; ARAN, B.; COROLEU, V.; VEIGA, A.; BARRI P. N. (2007). «Donació d'embrions viables per a recerca al nostre país: resposta de les pacients». *Biologia de la Reproducció*, 10: 133-136.

RELACIÓ D'INSCRITS

Anton Martorell, Ester	Universitat Autònoma de Barcelona
Aran Corbella, Begoña	Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Azpiazu Gutiérrez, Rubén	Hospital Clínic, UB
Bárcena Uribarri, Pablo	Universitat Autònoma de Barcelona
Batallé Perez, Ramón	Clínica Girona
Bonet Martí, Raquel	Llicenciada en biologia
Bonet Pujol, Marta	Universitat de Girona
Bujarrabal Llopis, Anna	Institut Universitari Dexeus
Bussalleu Muntada, Eva	Universitat de Girona
Camprubí, Cristina	Universitat Autònoma de Barcelona
Casas Roqueta, Isabel	Universitat de Girona
Castillo Corullón, Judit	Hospital Clínic, UB
Català Cahís, Vicenç	Prenatal Genetics SL
Cedillo García Lascurain, Luciano	Institut Universitari Dexeus
Colmenero Ginés, Ana	CSIC
Costa-Borges, Nuno Luis	Universitat Autònoma de Barcelona
De Mateo López, Sara	Hospital Clínic, UB
Delgado García, Anna	Universitat Pompeu Fabra
Díaz Blanco, Noelia	Institut de Ciències del Mar
Durfort Coll, Mercè	Universitat de Barcelona
Echeverria Bel, Laia	Institut Universitari Dexeus
Fabre Folch, Aïda	Estudiant Universitat de Girona
Fernandez De Arcaya Redondo, Ulla	Institut de Ciències del Mar
Fernández Reig, Maria	Clínica Girona
Fernández Rosas, Elisabet	Universitat Autònoma de Barcelona
Gallardo, Xavier	Universitat de Girona
Garcia Bonavila, Estela	Universitat de Girona
García Quevedo, Lydia	Universitat Autònoma de Barcelona
González Garrido, Sheyla	Universitat Autònoma de Barcelona
Hugas Mulà, Mariona	Clínica Girona
Ibáñez De Sans, Elena	Universitat Autònoma de Barcelona
Jodar Bifet, Meritxell	Hospital Clínic, UB
Julià Andrés, Lúdia	Clínica Girona
Luppino, Maria Cristina	Hospital Clínic, UB
Mallol Dominguez, Anna	Universitat Autònoma de Barcelona
Martin Recio, Susana	General Lab
Martorell Riera, Maria Rosa	Unitat de Reproducció Humana i Diagnòstic Genètic
Mechaly, Alejandro	Institut de Ciències del Mar
Mestre Aleyxandri, Gemma	Universitat de Barcelona
Miguel Escalada, Irene	Universidad Autònoma de Barcelona
Milovanov, Cornelia	Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Molina Campoy, Òscar	Universitat Autònoma de Barcelona
Novo Bruña, Sergio	Universitat Autònoma de Barcelona
Oliana Membrado, Oriol	Institut Universitari Dexeus
Oliva Virgili, Rafael	Hospital Clínic, UB
Oriola, Josep	Hospital Clínic, UB
Orriols Brunetti, Xavier	Institut Universitari Dexeus
Ortega Garcia, Sergio	Institut Universitari Dexeus
Palau Florensa, Núria	General Lab
Piferrer Circuns, Francesc	Institut de Ciències del Mar

Pladevall Sierra, Marta	Universitat Autònoma de Barcelona
Rives Enedàguila, Natàlia	Institut Universitari Dexeus
Sanmartin Cabrejas, Paula	Institut Universitari Dexeus
Santaló Pedro, Josep	Universitat Autònoma de Barcelona
Sarquella Ventura, Joan	Clínica Girona
Sarrate Navas, Zaida	Universitat Autònoma de Barcelona
Sureda Planet, Mònica	Universitat de Barcelona
Torner Bosch, Eva	Universitat de Girona
Tresanchez Pares, Marta	Institut Universitari Dexeus
Veiga Lluch, Anna	Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Vidal Domínguez, Francesca	Universitat Autònoma de Barcelona
Vila Casademunt, Alba	Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona
Viñas De Puig, Jordi	Universitat de Girona
Yeste Oliveras, Marc	Universitat de Girona

Amb la col·laboració de:



GIROFIV
*UNITAT DE REPRODUCCIÓ
HUMANA I DIAGNÒSTIC GENÈTIC.
CLÍNICA GIRONA.*



Amb el patrocini de:

