

BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ

VOLUM 15 • 2017

XV JORNADA DE
BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ



Societat Catalana de
BIOLOGIA

BARCELONA, 2017

ACTES DE LA XV JORNADA
DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ

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

BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ
ACTES DE LA XV JORNADA DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓ

Editors

Rafael Oliva i Enric Ribes

Amb la col·laboració de:

Institut d'Estudis Catalans
Unitat de Genètica, Departament de Biomedicina, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut,
Universitat de Barcelona
Unitat de Biologia Cel·lular, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia,
Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS
BARCELONA
21 DE JUNY DE 2017

Il·lustració de la coberta: Imatge de microscòpia electrònica de rastreig de l'espermatozoide biflagel·lat del peix *Lampanyctus crocodilus* (Myctophiliformes, Myctophidae). Fotografia cedida per Enric Ribes.

Editors: Rafael Oliva i Enric Ribes.

Coordinadors de la Jornada:

Rafael Oliva (Unitat de Genètica, Departament de Biomedicina, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, IDIBAPS, i Hospital Clínic de Barcelona).

Enric Ribes (Unitat de Biologia Cel·lular, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona).

Secretaria de la Jornada: M. Àngels Gallego i Maite Sánchez (Societat Catalana de Biologia).

Organitza: Secció de Biologia de la Reproducció de la Societat Catalana de Biologia.

Els editors no es responsabilitzen de l'opinió ni dels continguts dels articles signats.

© dels autors de les ponències

Editat per Ediciones Gráficas Rey, S.L.

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: 2017

Tiratge: 75 exemplars

Imprès a Ediciones Gráficas Rey, S.L.

Dipòsit legal: DLT. 803-2017

ISBN: 978-84-697-3767-5

El text de les ponències ha estat reproduït tal com va ser lliurat pels autors.

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
La distribució de l'hermafroditisme en la família Serranidae segons variables ambientals SUSANNA PLA, FRANCESC PIFERRER	9
Descripció del transcriptoma gonadal del llobarro (<i>Dicentrarchus Labrax</i>) al llarg de diferents estadis del desenvolupament..... NÚRIA SÁNCHEZ-BAIZÁN, LAIA RIBAS, FRANCESC PIFERRER	13
Proteïnes espermàtiques bàsiques i patró de condensació de la cromatina de l'espermatozoide biflagel·lat dels peixos mictòfids..... NÚRIA SAPERAS, JOAN AUSIÓ, ENRIC RIBES	19
Posible paper de H4K5bu en la transició nucleohistona-nucleoprotamina de la espermatogenesis humana y su desregulación en diferentes patologías testicular ALBERTO DE LA IGLESIA, FERRAN BARRACHINA, AFSANEH GOUDARZI, SOPHIE ROUSSEAU, SAADI KHOCHBIN, CARME MALLOFRÉ, LEONARDO RODRIGUEZ-CARUNCHIO, JOSEP LLUÍS BALLESCÀ, RAFAEL OLIVA	25
Base molecular de la funció de l'espermatozoide de peixos: el paper de les acuaporines JOAN CERDÀ, FRANÇOIS CHAUVIGNÉ, ALBA FERRÉ, RODERICK NIGEL FINN	31
Relación de las acuaporinas 3, 7, y 11 con la criotolerancia en el espermatozoide equino..... SEBASTIÁN BONILLA-CORREAL, FEDERICO NOTO, ESTELA GARCIA-BONAVILA, JOAN E. RODRIGUEZ-GIL, MARC YESTE, JORDI MIRO	37
Implicació del canal aniónic dependent de voltatge (VDAC2) en la capacitació <i>in vitro</i> i la reacció acrosòmica induïda amb progesterona de l'espermatozoide de porcí..... SANDRA MARTÍNEZ-ABAD, BEATRICE GADANI, JOAN E. RODRÍGUEZ-GIL, SERGI BONET, MARC YESTE	43
Efectes del pèptid antimicrobià protegrina 1 (PG1) sobre la viabilitat i la càrrega bacteriana de semen de porcí..... EVA BUSSALLEU, SÍLVIA SANCHO, M. DOLORS BRIZ, MARC YESTE, SERGI BONET	49
Múltiple caracterització de la fragmentació de l'ADN espermàtic de cadena senzilla i doble en espermatozoides seleccionats per a ICSI SANDRA LARA CERRILLO, MARIA GRACIA CATALÁ, JORDI BENET CATALÀ, JORDI RIBAS MAYNOU, AGUSTÍN GARCÍA PEIRÓ	55
Anàlisi de fragmentació del DNA espermàtic mitjançant l'assaig comet alcalí i neutre: aplicació d'un software d'anàlisi computeritzada SERGIO GARCIA-SEGURA, JORDI RIBAS-MAYNOU, AGUSTÍ GARCIA-PEIRÓ, JORDI BENET	61
Anàlisi del percentatge d'espermatozoides mòbils progressius pre i post-criopreservació/descongelació i supervivència espermàtica en pacients normozoospermics..... CARLA SELVA VIÑALS, MARK GROSSMANN I CAMPS, ANNA RABANAL ANGLADA, CRISTINA GUIX GALCERÁN, OLGA SERRA ORTIZ, RAÚL OLIVARES VELA, LUIS ZAMORA CORZO	67

Noves perspectives en l'estudi de la territorialitat cromosòmica de cèl·lules germinals masculines: estudis tridimensionals.....	73
MIREIA SOLÉ, JOAN BLANCO, DEBORA GIL, GOTHAMI FONSEKA, RICHARD FRODSHAM, OLIVER VALERO, FRANCESCA VIDAL, ZAIDA SARRATE	
L'estudi del plasma seminal mitjançant proteòmica d'alt rendiment suggereix una comunicació bidireccional entre l'espermatozoide i el tracte reproductor masculí.....	79
FERRAN BARRACHINA, MERITXELL JODAR, ADA SOLER-VENTURA, JOSEP MARIA ESTANYOL, JUAN MANUEL CORRAL, JOSEP LLUÍS BALLESCÀ, RAFAEL OLIVA	
Efecte de la fotoestimulació d'òcits porcins en la maduració, la fecundació i el desenvolupament embrionari.....	85
ANDREA BARCELÓ, MARC YESTE, SERGI BONET, MIRIAM CASTILLO-MARTÍN	
Segona biòpsia d'embrions amb resultats de PGS no concloents.....	91
MARINA SUMARROCA, MÒNICA PARRIEGO, LLUC COLL, MONTSERRAT BOADA, SÍLVIA MATEO, BONAVENTURA COROLEU, MARTA DEVEESA, ANNA VEIGA	
Efectes de la fusió cel·lular i la divisió directa en el desenvolupament embrionari	95
QUERA ROLDÁN, MARIONA; FLORENSA BARGALLÓ, MIREIA; ESBERT ALGAM, MARGA	

PRESENTACIÓ

Aquest volum recull les comunicacions presentades a la XV Jornada de Biologia de la Reproducció que té lloc el 21 de juny de 2017 a l'Institut d'Estudis Catalans. L'objectiu d'aquesta jornada, que s'organitza amb una periodicitat bianual, és reunir als investigadors que treballen en biologia de la reproducció, difondre les diverses línies de treball, compartir coneixements i poder establir noves col·laboracions. La jornada ofereix també una excel·lent oportunitat per a la participació dels investigadors més joves. Les comunicacions presentades a aquesta edició inclouen tan contribucions fonamentals com aplicades a la reproducció en una diversitat d'espècies.

Voldríem agrair a l' Institut d'Estudis Catalans i a la Societat Catalana de Biologia pels ajusts que han fet possible l' edició d' aquest llibre i cobrir la resta de despeses associades a la jornada.

ELS ORGANITZADORS

TAULA

Presentació	7
La distribució de l'hermafroditisme en la família Serranidae segons variables ambientals SUSANNA PLA, FRANCESC PIFERRER	9
Descripció del transcriptoma gonadal del llobarro (<i>Dicentrarchus Labrax</i>) al llarg de diferents estadis del desenvolupament..... NÚRIA SÁNCHEZ-BAIZÁN, LAIA RIBAS, FRANCESC PIFERRER	13
Proteïnes espermàtiques bàsiques i patró de condensació de la cromatina de l'espermatozoide biflagel·lat dels peixos mictòfids..... NÚRIA SAPERAS, JOAN AUSIÓ, ENRIC RIBES	19
Posible paper de H4K5bu en la transició nucleohistona-nucleoprotamina de la espermatogenesis humana y su desregulación en diferentes patologías testicular ALBERTO DE LA IGLESIA, FERRAN BARRACHINA, AFSANEH GOUDARZI, SOPHIE ROUSSEAU, SAADI KHOCHBIN, CARME MALLOFRÉ, LEONARDO RODRIGUEZ-CARUNCHIO, JOSEP LLUÍS BALLESCÀ, RAFAEL OLIVA	25
Base molecular de la funció de l'espermatozoide de peixos: el paper de les acuaporines JOAN CERDÀ, FRANÇOIS CHAUVIGNÉ, ALBA FERRÉ, RODERICK NIGEL FINN	31
Relación de las acuaporinas 3, 7, y 11 con la criotolerancia en el espermatozoide equino..... SEBASTIÁN BONILLA-CORREAL, FEDERICO NOTO, ESTELA GARCIA-BONAVILA, JOAN E. RODRIGUEZ-GIL, MARC YESTE, JORDI MIRO	37
Implicació del canal aniónic dependent de voltatge (VDAC2) en la capacitació <i>in vitro</i> i la reacció acrosòmica induïda amb progesterona de l'espermatozoide de porcí..... SANDRA MARTÍNEZ-ABADI, BEATRICE GADANI, JOAN E. RODRÍGUEZ-GIL, SERGI BONET, MARC YESTE	43
Efectes del pèptid antimicrobià protegrina 1 (PG1) sobre la viabilitat i la càrrega bacteriana de semen de porcí..... EVA BUSSALLEU, SÍLVIA SANCHO, M. DOLORS BRIZ, MARC YESTE, SERGI BONET	49
Múltiple caracterització de la fragmentació de l'ADN espermàtic de cadena senzilla i doble en espermatozoides seleccionats per a ICSI SANDRA LARA CERRILLO, MARIA GRACIA CATALÁ, JORDI BENET CATALÀ, JORDI RIBAS MAYNOU, AGUSTÍN GARCÍA PEIRÓ	55
Anàlisi de fragmentació del DNA espermàtic mitjançant l'assaig comet alcalí i neutre: aplicació d'un software d'anàlisi computeritzada SERGIO GARCIA-SEGURA, JORDI RIBAS-MAYNOU, AGUSTÍ GARCIA-PEIRÓ, JORDI BENET	61
Anàlisi del percentatge d'espermatozoides mòbils progressius pre i post-criopreservació/descongelació i supervivència espermàtica en pacients normozoospermics..... CARLA SELVA VIÑALS, MARK GROSSMANN I CAMPS, ANNA RABANAL ANGLADA, CRISTINA GUIX GALCERÁN, OLGA SERRA ORTIZ, RAÚL OLIVARES VELA, LUIS ZAMORA CORZO	67

Noves perspectives en l'estudi de la territorialitat cromosòmica de cèl·lules germinals masculines: estudis tridimensionals.....	73
MIREIA SOLÉ, JOAN BLANCO, DEBORA GIL, GOTHAMI FONSEKA, RICHARD FRODSHAM, OLIVER VALERO, FRANCESCA VIDAL, ZAIDA SARRATE	
L'estudi del plasma seminal mitjançant proteòmica d'alt rendiment suggereix una comunicació bidireccional entre l'espermatozoide i el tracte reproductor masculí.....	79
FERRAN BARRACHINA, MERITXELL JODAR, ADA SOLER-VENTURA, JOSEP MARIA ESTANYOL, JUAN MANUEL CORRAL, JOSEP LLUÍS BALLESCÀ, RAFAEL OLIVA	
Efecte de la fotoestimulació d'òcits porcs en la maduració, la fecundació i el desenvolupament embrionari.....	85
ANDREA BARCELÓ, MARC YESTE, SERGI BONET, MIRIAM CASTILLO-MARTÍN	
Estudi mutacional del gen <i>spag16</i> en pacients estèrils i en controls	77
RUBÉN AZPIAZU, MERITXELL JODAR, JOSEP ORIOLA, JOSÉ LUÍS BALLESCÀ I RAFAEL OLIVA	
Segona biòpsia d'embrions amb resultats de PGS no concloents.....	91
MARINA SUMARROCA, MÒNICA PARRIEGO, LLUC COLL, MONTSERRAT BOADA, SÍLVIA MATEO, BONAVENTURA COROLEU, MARTA DEVEGA, ANNA VEIGA	
Efectes de la fusió cel·lular i la divisió directa en el desenvolupament embrionari	95
QUERA ROLDÁN, MARIONA; FLORENSA BARGALLÓ, MIREIA; ESBERT ALGAM, MARGA	

PRESENTACIÓ

Aquest volum recull les comunicacions presentades a la XV Jornada de Biologia de la Reproducció que té lloc el 21 de juny de 2017 a l'Institut d'Estudis Catalans. L'objectiu d'aquesta jornada, que s'organitza amb una periodicitat bianual, és reunir als investigadors que treballen en biologia de la reproducció, difondre les diverses línies de treball, compartir coneixements i poder establir noves col·laboracions. La jornada ofereix també una excel·lent oportunitat per a la participació dels investigadors més joves. Les comunicacions presentades a aquesta edició inclouen tan contribucions fonamentals com aplicades a la reproducció en una diversitat d'espècies.

Voldríem agrair a l' Institut d'Estudis Catalans i a la Societat Catalana de Biologia pels ajusts que han fet possible l' edició d' aquest llibre i cobrir la resta de despeses associades a la jornada.

ELS ORGANITZADORS

LA DISTRIBUCCIÓ DE L'HERMAFRODITISME EN LA FAMÍLIA SERRANIDAE SEGONS VARIABLES AMBIENTALS

Susanna Pla i Francesc Piferrer*

Institut de Ciències del Mar, Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC), Barcelona.

*Correspondència: Dr. Francesc Piferrer, Institut de Ciències del Mar, Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC), Passeig Marítim, 37-49, 08003 Barcelona. Tel. +34-932 309 567; fax +34-932 309 555; e-mail: piferrer@icm.csic.es

Resum

Les estratègies en els sistemes socials i d'aparellament que causen un increment en l'èxit reproductiu són les que actualment intenten explicar la distribució en l'hermafroditisme i les seves avantatges als peixos. Tot i així, hi ha factors ambientals que poden també influir en la distribució l'hermafroditisme, als que se'ls hi ha de sumar condicionants filogenètics i fisiològics, però com tot plegat afavoreix la presència d'hermafroditisme no està gens clar. En aquest estudi es fa unes anàlisis de diverses variables ecològiques per determinar la seva possible influència en l'hermafroditisme dels Serrànids enfront el gonocorisme. Comparem també dins de l'hermafroditisme els seqüencials versus els simultanis.

Paraules clau: hermafroditisme; Serrànids; latitud.

Abstract

The mating and social system strategies that cause an increase in reproductive success currently attempt to explain the distribution of hermaphroditism and their advantages in fish. However, environmental factors can influence the distribution of hermaphroditism. Nevertheless, how these factors, along with phylogenetic and physiological constraints, favor its presence is still poorly understood. In this study, we analyzed some ecological variables to determine their possible influence on the appearance of hermaphroditism versus gonochorism in the Serranidae family. We also compared, within hermaphrodites, sequential versus simultaneous hermaphrodites.

Key words: hermaphroditism; Serranidae; latitude.

INTRODUCCIÓ

Els peixos constitueixen el grup més divers de vertebrats, amb unes 30.000 espècies que ocupen diferents hàbitats del món (Nelson, 2006). Aquesta diversitat també es reflecteix a nivell reproductiu, atesa la presència de tots els tipus de reproducció coneguts en vertebrats: gonocorisme, hermafroditisme i unisexualitat (Prince, 1984). Els peixos hermafrodites són els únics vertebrats que presenten el canvi de sexe.

En la família de Serrànids, es troben tres tipus reproductius (Erisman et al., 2013). Els gonocoristes, que es reproduïen exclusivament com mascle o com a femella durant la seva vida; els hermafrodites simultanis, que es reproduïen com a mascles i com a femelles alhora o en un període curt de temps; i els hermafrodites seqüencials, els quals primer maduren com a un sexe i després com a l'oposat, que en el cas dels Serrànids només són del tipus protoginis (primer maduren

com femelles, canvien de sexe i després maduren com a mascles).

Smith (1975) va postular que no hi havia cap relació entre diferents tipus d'hàbitat i la distribució de les espècies hermafrodites, atesa la seva àmplia distribució. Tot i així, Sadovy i Liu (2008) realitzaren un estudi dels teleostis per a esbrinar la incidència de l'hermafroditisme a nivell taxonòmic i van suggerir que, a part del fort component conductual dels sistemes socials i d'aparellament com a estratègia per augmentar el valor reproductiu i ser la causa que explica l'avantatge de ser hermafrodita (Warner 1988, Munday et al., 2006), les variables abiòtiques o factors ambientals eren poc conegudes i podien també influir en la distribució de l'hermafroditisme.

Diversos estudis han relacionat la influència de variables demogràfiques com la talla, el pes i, el creixement amb la latitud. En latituds altes, els peixos creixen més lentament però acaben sent més grans (Kozłowski et al., 2004). Ben mirat, doncs, la mida del peix és un factor

rellevant a nivell dels sistemes socials i d'aparellament reproductiu (Ghiselin, 1969).

Tot i així, els condicionants ambientals que poden afavorir la presència d'hermafroditisme estan encara escassament determinats.

Per tant, l'objectiu d'aquest treball fou l'estudi de la distribució de l'hermafroditisme en la família de Serrànids, considerant variables ambientals i comparant-les entre gonocoristes i hermafrodites i, dins de l'hermafroditisme, entre els simultanis envers els seqüencials.

MATERIALS I MÈTODES

En primer lloc es va crear una base de dades extraient la informació de les espècies de Serrànids i les variables ambientals a través de la base de dades pública FishBase (www.fishbase.org) i es va crear una taula en format MS Excel.

En segon lloc, es va fer els comptatges de les espècies amb informació del tipus de reproducció coneguda. A continuació es va analitzar estadísticament les variables ambientals; *Latitud*, *Àrees* i *Regions* dels Serrànids segons el tipus de reproducció: G vs. H, gonocoristes versus Hermafrodites; i SQ vs. SM, Seqüencials versus Simultanis mitjançant Xi-quadrats ja que són variables categòriques. També es va comparar la longitud màxima de l'espècie segons la latitud mitjançant la prova *t* de Student, transformant prèviament els valors a logaritme amb base 10. Els anàlisis i les gràfiques es van realitzar mitjançant el software R (versió 3.3.2).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

De les 537 espècies totals en la família dels Serrànids presents a FishBase, es trobà informació sobre el tipus de reproducció d'unes 235 espècies, de les quals el 81% són hermafrodites corresponents, a 173 seqüencials i 18 simultànies (Taula 1). La resta són gonocoristes amb 44 espècies.

Taula 1. Distribució a nivell taxonòmic indicant números absoluts de gèneres i espècies amb els percentatges dels tipus reproductius.

	NT	G	SQ	SM
Gèneres	41 (55%)	16 (39%)	26 (63%)	4 (10%)
Espècie	235	44 (19%)	173 (74%)	18(7%)

Abreviacions: NT, Número total existents en Fishbase amb informació de reproducció coneguda; G, gonocoristes; SQ,

seqüencials; SM, simultanis. Nota: els percentatges de gènere sumen més de 100 perquè hi ha gèneres que contenen tant espècies gonocoristes com hermafrodites.

La variable *latitud* ens mostra com els Serrànids gonocoristes (n=40) estan presents en les zones més fredes i temperades (69%). En canvi, les hermafrodites (n=185) predominen en latituds més càlides com la tropical (89%) i la subtropical (77%) (Taula 2). Els Serrànids hermafrodites trobats en latituds temperades són únicament seqüencials. Els quals també predominen en les latituds tropicals i subtropicals (92% i 87%, respectivament) degut a que hi ha més espècies seqüencials (n=168) que simultanis (n=17), tot i així on hi ha més espècies simultanis és en la latitud subtropical (13%).

Taula 2: Distribució reproductiva segons la latitud.

Latitud	G	H	SQ	SM
Temperat	69%	31%	100%	0%
Subtropical	23%	77%	87%	13%
Tropical	11%	89%	92%	8%

Abreviacions: H, hermafrodita; Les dues primeres i les dues últimes columnes sumen 100%.

La variable *Àrees* ens indica com els Serrànids hermafrodites (n=191) predominen significativament ($X=35.96$; $df=4$; $p<0.0001$) en esculls de corall (69%) i en les zones demersals (26%). En canvi, els gonocoristes (n=44) estan també presents, encara que en una menor quantitat i més uniformement distribuïts, en totes les àrees (Fig. 1).

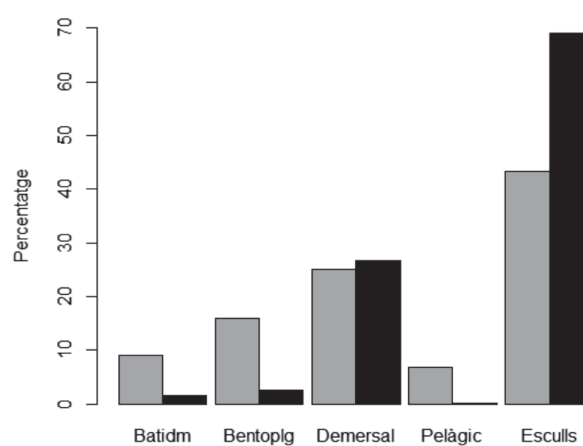


Figura 1. Presència de Serrànids en les diverses àrees en percentatges segons el tipus reproductiu (gris, espècies gonocoristes, n=44; negre, espècies hermafrodites, n=191). Abreviacions: Batidm, batidemersal; bentopl, bentopelàgic.

D'altra banda, dins de l'hermafroditisme (Fig. 2) no es mostra cap diferència significativa d'acord amb les àrees ($X=0.99$; $df=3$; $p>0.05$).

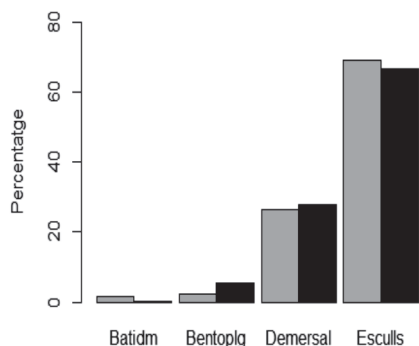


Figura 2. Presència de Serrànids en les diverses àrees en percentatges segons el tipus d'hermafroditisme (gris, espècies seqüencials, $n=173$; negre, espècies simultànies, $n=18$). Abreviacions: Batidm, batidemersal; Bentopl, bentopelàgic.

Les espècies de Serrànids es distribueixen significativament en diverses regions tant si es tracta de les gonocoristes envers hermafrodites ($X=35.70$; $df=6$; $p<0.0001$) com de les hermafrodites seqüencials envers les simultànies ($X=44.25$; $df=6$; $p<0.0001$) (Fig. 3).

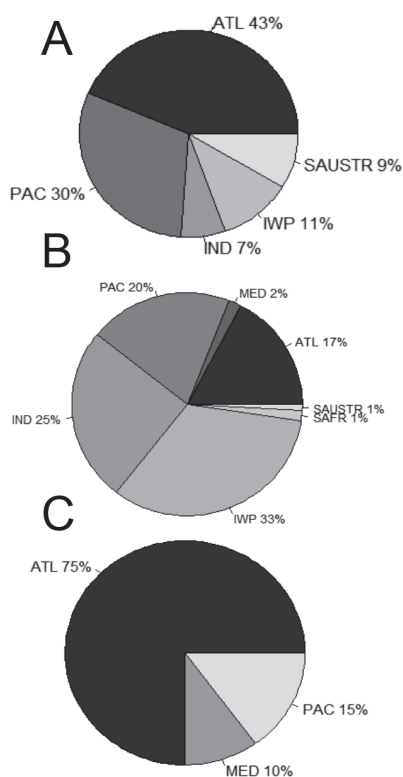


Figura 3. Distribució dels Serrànids segons el seu tipus de reproducció. A, gonocoristes, $n=44$; B, seqüencials, $n=173$; C,

simultànies, $n=18$. Abreviacions: MED, Mediterrani; ATL, Atlàntic; PAC, Pacífic; IND, Oceà Índic; IWP, Oest Pacífic-Oceà Índic, SAFR, Sud Àfrica; SAUSTR, Sud d'Austràlia.

Els Serrànids gonocoristes estan presents principalment a l'Atlàntic (43%) i al Pacífic (30%), així com al Sud-Est Asiàtic i Oceania; l'Oest Pacífic - Est de l'Oceà Índic (11%), al sud d'Austràlia (9%) i l'Oceà Índic (7%). Els seqüencials, però, es troben més àmpliament distribuïdes, a l'Est de l'Oceà Índic (33%), a l'Oceà Índic (25%) però també s'hi troben amb un 25% al Pacífic, 17% a l'Atlàntic, 2% al Mediterrani, 1% Sud d'Àfrica i amb un 1% Sud d'Austràlia. En canvi, els Serrànids amb reproducció simultània estan presents únicament a l'Atlàntic (75%), al Pacífic (15%) i al Mediterrani (10%). Així doncs, tots els Serrànids que hi ha al Mediterrani són hermafrodites.

Finalment els Serrànids que habiten en latituds baixes (entre 30° Nord i 30° Sud) presenten una mida significativament menor en comparació als de les latituds mitjanes (entre 30°-60° Nord i Sud) ($t=-3.71$; $df=74.64$; $p<0.001$). Malgrat no s'ha observat la presència de Serrànids en latituds altes, es pot afirmar que hi ha una relació d'increment de mida del cos segons més lluny es trobin de l'Equador.

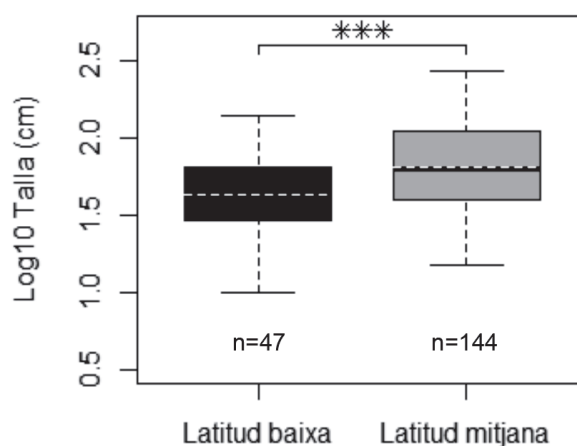


Figura 4. Relació de la mida del cos (longitud màxima en centímetres) en funció de la latitud. Abreviació: n, nombre de individus.

Les espècies de Serrànids estan àmpliament distribuïdes. Els resultats d'aquest estudi indiquen que els Serrànids hermafrodites mostren unes preferències per latituds tropicals i subtropicals i pels esculls de corall i àrees demersals enfront dels seus relatius gonocoristes. L'argument de la mida del cos amb la latitud recorda a la regla de 'Bergmann'. Aquests resultats poden ser la base per futurs estudis comparatius d'espècies hermafrodites.

BIBLIOGRAFIA

- Erisman, B. E.; Hastings, P. A i R.R. Warner. (2013). «Phylogenetic Perspectives on the Evolution of Functional Hermaphroditism in Teleost Fishes». *Integrative and Comparative Biology*, vol. 53, núm. 4, p. 736-754.
- Froese, R.; Pauly, D. (2017). FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org.
- Ghiselin, M.T. (1969). «The Evolution of Hermaphroditism Among Animals». *The Quarterly Review of Biology*, vol. 44, p. 189-208.
- Kozłowski, J., Czarnoleski, M. and Danko, M. (2004). «Can optimal resource allocation models explain why ectotherms grow larger in cold?». *Integrative and Comparative Biology*, vol. 44, p. 480-493.
- Munday, P.L., Buston, P.M. and Warner, R.R. (2006). «Diversity and flexibility of sex-change strategies in animals». *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 21, p. 89-95.
- Price, D. J. (1984). «Genetics of sex determination in fishes: a brief review, in Fishes reproduction: Strategies and tactics». A: Potts, G. W.; Wootton, R. J. [ed] London: Academic Press, p. 77-89.
- Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the World*. New Jersey: Wiley.
- Sadovy, Y.; Liu, M. (2008). «Functional hermaphroditism in teleosts». *Fish Fisher*, vol. 9, p. 1-43.
- Smith, C. L. (1975). The evolution of hermaphroditism in fishes. In: *Intersexuality in the animal kingdom*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 295-310.
- Warner, R.R. (1988). «Sex change in fishes: hypotheses, evidence, and objections». *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 22, p. 81-90.

DESCRIPCIÓ DEL TRANSCRIPTOMA GONADAL DEL LLOBARRO (*Dicentrarchus labrax*) AL LLARG DE DIFFERENTS ESTADIS DEL DESENVOLUPAMENT

Núria Sánchez-Baizán, Laia Ribas, Francesc Piferrer*

*Correspondència: Dr Francesc Piferrer, Institut de Ciències del Mar, Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC), Barcelona Passeig Marítim de la Barceloneta, 37-49, 08003, Barcelona. Tel. +34-932 309 567. piferrer@icm.csic.es

Resum

El llobarro (*Dicentrarchus labrax*) és una espècie de peix produïda en països de la conca Mediterrània, econòmicament important i del qual la demanda està augmentant ràpidament. No obstant, sota condicions de captivitat, encara s'obtenen poblacions amb major proporció de mascles. En aquesta espècie la proporció de sexes depèn d'uns quants loci i és influïble per factors mediambientals com la temperatura. Aquestes proporcions actuen en detriment de la producció, ja que les femelles creixen un ~30% més que els mascles. Per tal de comprendre millor els processos de determinació i diferenciació del sexe del llobarro, es va realitzar un estudi exhaustiu del transcriptoma gonadal a tres estadis diferents del desenvolupament: a 110, 250 i 350 dies després de la fecundació (dpf) mitjançant un microarray dissenyat específicament per aquesta espècie. Els resultats foren validats per PCR a temps real (qPCR). Es van obtenir un total de ~44.000 sondes. L'anàlisi de Significació Estadística de Microarrays (SAM), determinà 113 gens comuns diferencialment expressats (DE) quan es comparaven ovaris contra testicles al llarg de les tres etapes de desenvolupament, 98 gens DE comuns a 110 i 250 dpf, i 1.496 a 250 i 350 dpf. A més, es van identificar un conjunt de gens DE entre els ovaris i els testicles i que canvien significativament al llarg del desenvolupament gonadal. El perfil d'expressió de 16 gens canònics importants per a la reproducció i la diferenciació sexual en peixos va ser estudiada, així com el de les vies metabòliques relacionades. La proporció de factors de transcripció expressats (TFs) també es va comparar entre les gònades masculines i femenines. Aquesta llista proporciona informació de gens candidats per futures investigacions.

Paraules clau: Desenvolupament gonadal, llobarro, genòmica, reproducció, aqüicultura.

Abstract

The European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) is an economically important farmed species around the Mediterranean for which the demand is rapidly increasing. Nevertheless, under captivity male-biased populations still occur. In this species, since the sex ratio is determined by several loci and influenced by environmental factors such as temperature. Such bias in favour of males negatively affects production because females outgrow males by ~30% in weight. In order to better understand the sex determination and differentiation processes of the European sea bass we conducted a comprehensive study on the gonadal transcriptome at three different stages of development: at 110, 250 and 350 days post fertilization (dpf), using a custom-made microarray for the target species. Microarray results were validated by real time PCR (qPCR). A total of ~44.000 probes were obtained. The statistical Significance Analysis of Microarrays (SAM) test determined 113 common differentially expressed (DE) genes when comparing ovaries with testis along the three stages of gonadal development, 98 genes DE between 110 and 250 dpf, and 1,496 DE genes between 250 and 350 dpf. The expression profile of 16 canonical genes important for reproduction and sex differentiation in fish was studied as well as pathways known to be related with male or female gonad differentiation. The proportion of expressed transcription factors (TFs) was also compared between gonads along development. Furthermore, a set of genes were identified to be DE between ovaries and testis that significantly changed throughout development, providing a list of candidate genes enrichment for further investigation.

Key words: gonadal differentiation; European sea bass, genomics, reproduction, aquaculture.

INTRODUCCIÓ

La reproducció és un fenomen molt divers entre les espècies de peixos, en part, degut a l'especificitat dels processos de determinació i diferenciació del sexe. La determinació del sexe és el procés mitjançant el qual

factors genètics i/o ambientals estableixen el sexe de l'organisme i, en última instància modula la proporció de sexes, un paràmetre demogràfic clau per a la viabilitat de les poblacions i la viabilitat de espècies (Penman i Piferrer, 2008). La determinació del sexe és seguida per la diferenciació sexual, consistent en la transforma-

ció d'una gònada indiferenciada en un testicle o en un ovari (Devlin i Nagahama, 2002; Piferrer i Guiguen, 2008). La complexitat dels mecanismes moleculars i l'àmplia varietat de sistemes entre espècies de teleostis ha fet que el procés de determinació i diferenciació del sexe sigui un tema de debat durant dècades (Liew et al., 2012). Depenent de l'espècie, doncs, la determinació del sexe en teleostis és controlada per diferents factors genètics i/o ambientals que tenen una contribució relativa variable (Piferrer et al., 2012).

Tot i que existeix una àmplia diversitat entre els processos de determinació i diferenciació dels teleostis, se sospita que els gens principals involucrats són conservats al llarg de l'evolució. Alguns dels gens clau han estat identificats (Martínez et al., 2014), com per exemple el SRY-Box 9 (*sox9*) i el Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 1 (*dmrt1*), que codifiquen per proteïnes que desencadenen el desenvolupament testicular en l'esturió siberià (*Acipenser baerii*; Berbejillo et al., 2013). Tanmateix, el gen responsable de la síntesi de l'hormona anti-mülleriana (*amh*) té un paper crític per a la diferenciació testicular del pejerrey (*Odontesthes bonariensis*; Fernandino et al., 2008). Altres gens són coneguts per la seva importància en el desenvolupament d'ovari, com el Citocrom P450, família 19, subfamília A, polipèptid 1a (*cyp19a1a*) que codifica l'enzim de l'aromatasa, o factors de transcripció com el forkhead box L2 (*foxl2*) i el factor esteroïdogenètic 1 (*sf-1*) (Navarro-Martín et al., 2011). Aquests factors de transcripció expressats en les gònades regulen la síntesi d'enzims que controlen la proporció d'hormones esteroïdes: d'andrògens (11-ketotestosterona) i estrògens (estradiol-17 β ; Martínez et al., 2014).

El llobarro (*Dicentrarchus labrax*) pertany al grup més abundant dels peixos teleostis, els Perciformes. Per tant, no només per el valor econòmic de la seva producció en l'aqüicultura sinó que també per la seva posició filogenètica, ha estat utilitzat com a espècie model en la recerca. El llobarro és una espècie gonocorista tipus diferenciada amb una determinació del sexe que inclou l'efecte tant de factors genètics com d'ambientals, com la temperatura (Piferrer et al., 2005; Vandeputte et al., 2007). El llobarro mostra un cicle anual de reproducció, fressant durant la temporada d'hivern, del gener al març al Mediterrani occidental.

En el llobarro, l'activitat androgènica sexual està regulada pels receptors nuclears sbDAX1 (*nr0b1*) i *sf-1*, que actuen com a repressors i inductors de diversos gens expressats en les gònades (proteïna reguladora aguda esteroïdogenètica; *star*, citocrom P450, família 11, subfamília A, polipèptid 1; *cyp11a1*, citocrom P450, família 17, subfamília A, membre 1; *cyp17*, els receptors d'estrògens alfa i beta, i receptor d'andrògens). L'expressió d'aquests gens regula la biosíntesi d'enzims es-

teroidogènics que al seu torn controlen la proporció i concentració d'esteroïdes sexuals en les gònades (Martins et al., 2007). Durant el desenvolupament primerenc, les gònades es diferencien en testicles o ovaris a causa de la relació endocrina, d'andrògens a estrògens. Aquesta relació es controla i es manté per l'enzim de l'aromatasa (CYP19A), traduït i transcrit a partir del gen *cyp19a1a* (Navarro-Martín et al., 2011).

Tot i que alguns gens clau per la determinació i la diferenciació gonadal ja estan identificats, en aquest estudi es pretén fer una descripció el més complert possible del transcriptoma gonadal del llobarro al llarg del desenvolupament a 110, 250 i 350 dpf, per tal d'elucidar patrons d'expressió gènica relacionats amb la diferenciació sexual pròpia de cada sexe.

MATERIALS I MÈTODES

Animals i disseny del microarray

Per tal d'estudiar el transcriptoma al llarg del desenvolupament, es van mostrejar teixits gonadals de peixos de diferents edats: a 110 (4 femelles i 6 mascles), 250 (6 femelles i 6 mascles) i 350 dpf (9 femelles i 9 mascles). Mentre que a 110 dpf la distinció del sexe dels individus a partir del fenotip encara no és possible, a 350 dpf les gònades ja són diferenciades. La longitud total mitjana és de 18 i 17 cm en les femelles i els mascles, respectivament (Piferrer et al., 2012). Es van recollir un total de 40 mostres de llobarro d'un conjunt de famílies no relacionades i establades a l'Institut de Ciències Mar (Barcelona).

L'anàlisi del transcriptoma gonadal del llobarro es va poder realitzar a partir de la base de dades obtingudes d'un experiment de pirosequenciació del qual va sorgir el disseny d'un oligo-microarray enriquit per a la reproducció, és a dir construït a mida i amb un nombre més elevat de sondes híbrides amb gens relacionats amb processos de reproducció (Ribas et al., en preparació). Les sondes (43.802 transcrits) utilitzades per construir l'experiment del microarray es van basar en el format de disseny 4 x 44k d'Agilent (GPL13443). Donat que diverses sondes del microarray imprimeixen l'expressió per un mateix gen, les 43.802 sondes es van agrupar en un total de 20.977 gens, dels quals 20.028 són representats per 2 còpies i la resta per entre 3 i 6 còpies de les sondes. L'experiment va ser validat mitjançant qPCR en 4 gens de mostres a les 3 edats.

Anàlisi estadística

La base de dades analitzada consisteix en un conjunt de valors d'intensitats de les sondes per cada mostra, nor-

malitzades mitjançant el paquet Limma de R (models lineals per a dades de microarrays, www.R-project.org). La taxa de falsos descobriments (FDR) es va controlar aplicant un filtre estadístic amb $p < 0.05$. El potencial efecte biològic causat per la combinació de lots es va eliminar amb la correcció ComBat. Aquestes dades es van introduir al programa informàtic TIGR Multiexperiment Viewer (TMeV), en la versió v.4.9 (Saeed et al., 2003). Aquest programa especialitzat proporciona diverses eines dissenyades per a l'anàlisi de dades de microarrays. En primer lloc es va poder visualitzar el conjunt de dades a través de l'Anàlisi de Components Principals (PCA), en el qual s'aplica la fórmula de correlació de Pearson per determinar la correlació lineal entre vectors de gens o mostres (Fryer et al., 2002). Arrossegant el conjunt de dades dins del programari de visualització va ser possible observar les dades des de diferents perspectives i així identificar clústers i possibles valors atípics (dues mostres van ser identificades com a valors atípics i excloses per a posteriors anàlisis: M10 i F9). Per determinar el nombre de gens diferencialment expressats entre les gònades dels mascles i femelles en cada punt del desenvolupament de la gònada es va aplicar l'anàlisi de Significació Estadística de Microarrays (SAM) que permet calcular el nivell d'expressió ($\text{Log}_2 \text{ Fold Change}$) i el nivell de significació (p -valor).

El llistat de gens canònics i vies metabòliques estudiades en detall van ser seleccionats a partir d'estudis previs similars en altres espècies: de rèmol (*Scophthalmus maximus*; Ribas et al., 2016) i de peix zebra (*Danio rerio*; Ribas et al., 2017).

RESULTATS

Expressió gènica diferencial entre les gònades femenines i masculines

L'anàlisi estadístic del microarray comparant les gònades masculines amb les femenines al llarg del desenvolupament va revelar un increment constant del nombre gens DE en gònades de femelles durant tot el temps estudiat. En canvi, durant el desenvolupament testicular s'observa un increment de gens DE entre 110 i 250 dpf, seguit d'una disminució de gens DE entre 250 i 350 dpf, en el qual una gran proporció de gens s'inhibeixen en mascles. Així, quan les gònades ja són diferenciades a 350 dpf, un 95,62% dels gens DE es sobre expressen en ovaris i només un 4,38% dels gens DE ho fan per als testicles (Figura 1). Entre aquests gens DE hi ha 113 gens que es mantenen així durant tot el període estudiat, i 98 gens DE són comuns entre individus a 110 i 250 dpf. Es van identificar fins a 1.496 gens DE en comú entre

les mostres de 250 i 350 dpf (Figura 2) comparant femelles contra mascles.

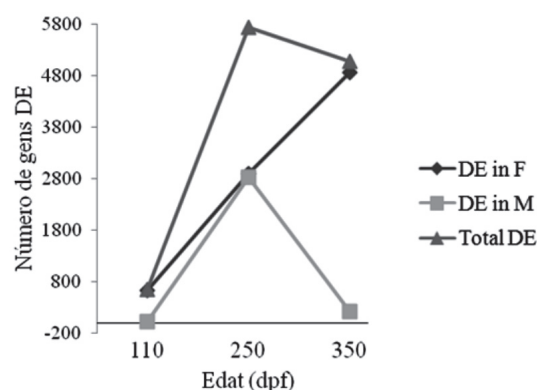


Figura 1. Gens diferencialment expressats en les gònades de llobarro comparant ovaris contra testicles al llarg del desenvolupament, amb límit de significació $p < 0.001$.

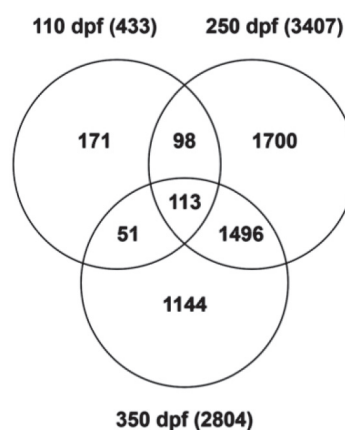


Figura 2. Gens diferencialment expressats i en comú al llarg dels tres estadis de desenvolupament de les gònades comparant ovaris contra testicles amb límit de significació $p < 0.001$.

També cal destacar que hi ha un grup de gens en comú (51 gens) en el primer punt i l'últim del procés. Una raó que podria explicar aquest fet és que, com és conegut, existeixen gens importants en el desenvolupament que segons el context i el moment en el que s'expressen participen en diferents funcions al llarg del desenvolupament (Gilbert, 2003).

Gens relacionats amb la reproducció

Entre els 16 gens seleccionats per la seva relació amb la diferenciació de la gònada se'n trobaren 8 que pertanyen a la via esteroidogènica i 8 factors de transcripció. En la majoria, comparant mascles i femelles, es va observar un patró similar al prèviament documentat en altres espècies o estudis en la mateixa espècie d'un sol

gen. Tal com mostra la Figura 3, es pot observar com el citocrom 11-beta hidroxilasa (*cyp11b*, A) augmenta significativament al llarg del temps en que es formen els testicles; i l'expressió de 17 β -hidroxiesteroid deshidrogenasa (17 β -*hsd*) és més elevada al llarg de la formació d'ovaris.

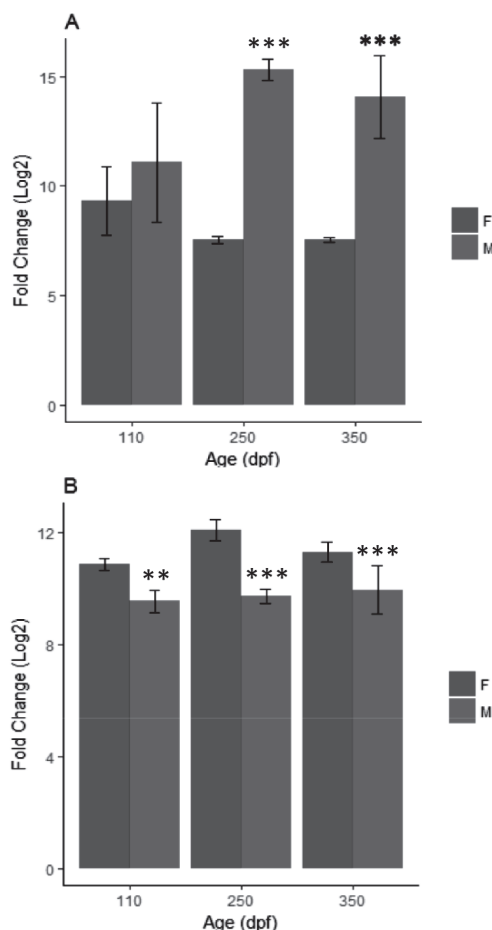


Figura 3. Expressió gènica diferencial entre mascles i femelles dels gens andrògens: A) *cyp11b* B) *17β-hsd*, amb els corresponents nivells de significació entre F i M en el mateix punt del desenvolupament: ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$. F: femelles, M: mascles.

Quan es va comparar la proporció de factors de transcripció sobreexpressats en mascles i en femelles entre els gens DE durant tot el desenvolupament, es va calcular que en mascles n'hi ha més amb una significació del p -valor < 0.01 . D'acord amb un estudi recent de Pérez-Lluch *et al.*, (2015), els factors de transcripció podrien tenir un paper important, inclús més que les marques epigenètiques, en els processos de desenvolupament atesa la seva capacitat per facilitar canvis d'expressió en un termini de temps curt. Per tant, el conjunt de gens expressats identificats en un moment rellevant

de la diferenciació testicular, aporten informació per a futures investigacions. Tanmateix, el conjunt de gens DE que significativament canvien al llarg del procés i que són únics en la formació de l'ovari o testicle de llobarro es presenten per primera vegada amb aquest estudi. La identificació de gens candidats podria contribuir a la comprensió dels processos de determinació i diferenciació gonadal en peixos i a millorar protocols de producció aquícola.

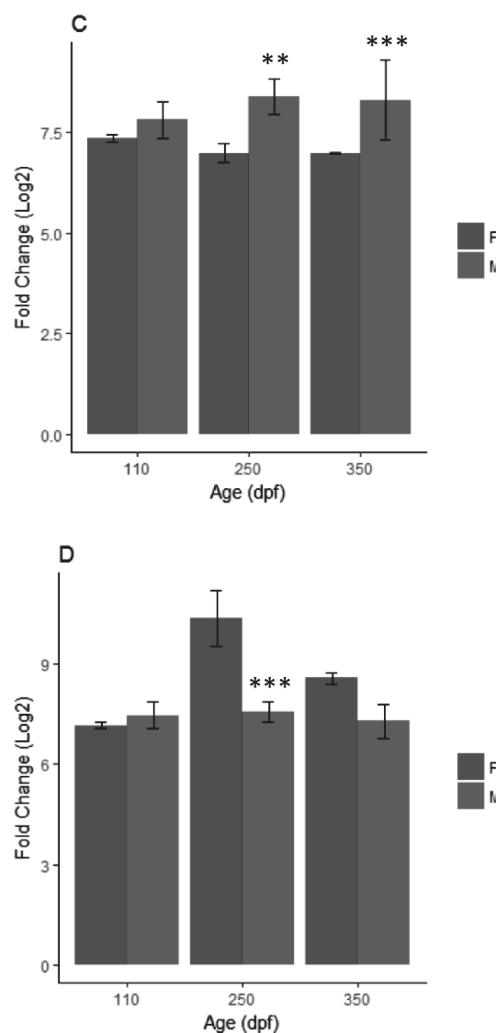


Figura 4. Expressió gènica diferencial entre mascles i femelles dels factors de transcripció: A) *sox9* B) *foxl2*, amb els corresponents nivells de significació entre F i M en el mateix punt del desenvolupament: ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$. F: femelles, M: mascles.

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat finançat pel projecte "Aquagenomics", Consolider-Ingenio 2010 (ref. CDS2007-0002) concedida FP.

REFERÈNCIES

- Berbejillo, J., Martínez-Bengochea, A., Bedó, G., Viziano-Cantonnet, D., (2013). «Expression of *dmrt1* and *sox9* during gonadal development in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) ». *Fish Physiol. Biochem.* 39, 91–4.
- Devlin, R.H., Nagahama, Y., (2002). «Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences». *Aquaculture* 208, 191– 364.
- Fernandino, J.I., Hattori, R.S., Kimura, H., Strüssmann, C.A., Somoza, G.M., (2008). «Expression profile and estrogenic regulation of anti-Müllerian hormone during gonadal development in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a teleost fish with strong temperature-dependent sex determination». *Dev. Dyn.* 237, 3192–9.
- Fryer, R.M., Randall, J., Yoshida, T., Hsiao, L.-L., Blumenstock, J., Jensen, K.E., Dimofte, T., Jensen, R. V., Gullans, S.R., (2002). «Global analysis of gene expression: methods, interpretation, and pitfalls». *Exp. Nephrol.* 10, 64–74.
- Gilbert, S. (2003). «Developmental biology». 10th ed. Sunderland, Mass. *Sinauer Associates*.
- Liew, W.C., Bartfai, R., Lim, Z., Sreenivasan, R., Siegfried, K.R., Orban, L., (2012). «Polygenic sex determination system in zebrafish». *PLoS One* 7, e34397.
- Martínez, P., Viñas, A.M., Sánchez, L., Díaz, N., Ribas, L., Piferrer, F., (2014). «Genetic architecture of sex determination in fish: applications to sex ratio control in aquaculture». *Front. Genet.* 5, 340.
- Martins, R.S.T., Deloffre, L. a M., Mylonas, C.C., Power, D.M., Canário, A.V.M., (2007). «Developmental expression of DAX1 in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*: lack of evidence for sexual dimorphism during sex differentiation». *Reprod. Biol. Endocrinol.* 5, 19.
- Navarro-Martín, L., Viñas, J., Ribas, L., Díaz, N., Gutiérrez, A., Di Croce, L., & Piferrer, F. (2011). «DNA methylation of the gonadal aromatase (*cyp19a*) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass». *PLoS Genetics*, vol. 7, p. e1002447.
- Penman DJ, Piferrer F. (2008). «Fish gonadogenesis. Part I: genetic and environmental mechanisms of sex determination». *Rev Fish Sci.* 16(S1):16–34.
- Pérez-Lluch, S., Blanco, E., Tilgner, H., Curado, J., Ruiz-Romero, M., Corominas, M. and Guigó, R. (2015). «Absence of canonical marks of active chromatin in developmentally regulated genes». *Nature Genetics*, 47(10), pp.1158-1167.
- Piferrer F, Blázquez M, Navarro L, Gonzalez A. (2005). «Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) ». *Gen Comp Endocrinol.* 142:102–110.
- Piferrer F, Guiguen Y. (2008). «Fish gonadogenesis. Part II: molecular biology and genomics of sex differentiation». *Rev Fish Sci.* 2008;16(S1):35–55.
- Piferrer, F., Ribas, L., Díaz, N., (2012). «Genomic approaches to study genetic and environmental influences on fish sex determination and differentiation». *Mar. Biotechnol.* (NY). 14, 591–604.
- Ribas, L., Robledo, D., Gómez-Tato, A., Viñas, A., Martínez, P., & Piferrer, F. (2016). «Comprehensive transcriptomic analysis of the process of gonadal sex differentiation in the turbot (*Scophthalmus maximus*)». *Molecular and Cellular Endocrinology*, 422, 132–149.
- Ribas, L., Liew, W. C., Díaz, N., Sreenivasan, R., Orbán, L., & Piferrer, F. (2017). «Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (8), 201609411.
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J. (2003). «TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis». *Biotechniques.* 34(2):374-8.
- Vandeputte M, Dupont-Nivet M, Chavanne H, Chatain B. (2007). «A polygenic hypothesis for sex determination in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*». *Genetics.* 176:1049–1057.

PROTEÏNES ESPERMÀTIQUES BÀSIQUES I PATRÓ DE CONDENSACIÓ DE LA CROMATINA DE L'ESPERMATOZOIDE BIFLAGEL·LAT DELS PEIXOS MICTÒFIDS

Núria Saperas¹, Joan Ausió², Enric Ribes³

¹D1Departament d'Enginyeria Química, EEBE, Universitat Politècnica de Catalunya, Eduard Maristany, 10-14, 08019 Barcelona, Spain - nuria.saperas@upc.edu

²Department of Biochemistry and Microbiology, University of Victoria, Victoria, BC V8W 3P6, Canada

³Unitat de Biologia Cel·lular, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain - eribes@ub.edu

Resumen

Les proteïnes espermàtiques bàsiques (PEB) associades al nucli de les espermàtides madures i espermatozoides de *Lampanyctus crocodilus* presenten un patró complex on coexisteixen histones juntament amb dos grups de proteïnes més bàsiques: un primer grup amb mobilitat electroforètica similar a les histones i un segon grup majoritari de proteïnes (P1, P2 i P3) amb una mobilitat que es troba entre la de les histones i l'habitual en protamines de peixos. La caracterització parcial de les proteïnes d'aquest segon grup mostra un contingut d'aminoàcids bàsics propers al 50%, corresponent majoritàriament a arginina, com és habitual en protamines. No obstant això, les masses moleculars determinades per espectrometria de masses (9484, 9770 i 10211 per P1, P2 i P3, respectivament) són molt més grans del que és habitual en les protamines dels peixos, essent les més grans descrites fins al moment. El patró general de PEB trobat en dues espècies més de mictòfids (*Symbolophorus veranyi* i *Notoscopelus elongatus*) es correspon amb el de *L. crocodilus*. La morfologia general de l'espermatozoide i la condensació de la cromatina de *S. veranyi* es corresponen amb les descrites per *L. crocodilus*. La cromatina es condensa progressivament en forma d'estructures fibrogranulars amb grànuls de mida creixent (25, 50, 150 nm) que finalment es fusionen donant lloc a una cromatina altament electrodensa.

Palabras clave: proteïnes nuclears espermàtiques bàsiques, protamines, espermiogènesi, cromatina espermàtica, Myctophiformes.

Abstract

The sperm nuclear basic proteins (SNBPs) of *Lampanyctus crocodilus* present a complex pattern where histones coexist with two groups of more basic proteins: one formed by proteins with an electrophoretic mobility in the same region as histones, and a second major group of proteins (P1, P2 and P3) with a mobility intermediate between histones and that of the canonical fish protamines. The partial characterization of the proteins of this second group shows that they have a high content of basic amino acids (~50%) mainly constituted by arginine, as it is usual in protamines. However, mass spectrometry analyses show that their molecular weights (9484, 9770 and 10211 for P1, P2 and P3, respectively) are much higher than usual in fish, making them the largest protamines found in this group. This SNBP pattern has also been found in two more Myctophidae species (*Symbolophorus veranyi* and *Notoscopelus elongatus*). Also, both the general morphology of the spermatozoon and the chromatin condensation in *S. veranyi* are very similar to those of *L. crocodilus*. Chromatin condenses from a fibrogranular structure with granules that grow progressively in diameter (25, 50, 150 nm) and which finally coalesce to give a very electron-dense chromatin.

Key words: sperm nuclear basic proteins (SNBPs), protamines, spermiogenesis, sperm chromatin, Myctophiformes.

INTRODUCCIÓ

Els mictòfids són un grup de peixos marins de fondària capaços de produir bioluminiscència degut als fotòfors que presenten distribuïts al llarg del cos (Hulley, 1984).

L'any 1976, Mattei i Mattei van descriure per primer cop l'espermatozoide d'un mictòfid a partir d'un exem-

plar de *Lampanyctus* sp. conservat en formol. Aquest estudi mostrava que es tractava d'un espermatozoide biflagel·lat i amb un patró axonemal atípica (9+0). Aquestes dues característiques van ser trobades també per Hara (2007) a *Notoscopelus* sp. i a *Symbolophorus californiensis*. En canvi, Hara i Okiyama (1989) descriuen un espermatozoide uniflagel·lat i amb un patró axonemal 9+2 a *Lampanyctus jordani*.

L'estudi ultraestructural de l'espermatozoide i l'espermioigènesi de l'espècie *Lampanyctus crocodilus* dut a terme recentment pel nostre grup (Ribes *et al.*, 2015; Saperas i Ribes, 2015) concorda amb la descripció de Mattei i Mattei (1976) i Hara (2007) i mostra com durant l'espermioigènesi d'aquesta espècie es desenvolupen dos flagels 9+0.

En el present treball es descriu a nivell ultraestructural el patró de condensació de la cromatina espermàtica d'una altra espècie de mictòfid (*Symbolophorus veranyi*) així com la caracterització parcial de les proteïnes espermàtiques bàsiques (PEB) de *Lampanyctus crocodilus*, *Symbolophorus veranyi* i *Notoscopelus elongatus*.

MATERIALS I MÈTODES

Material biològic

S'ha treballat amb tres espècies de peixos mictòfids (Myctophidae, Myctophiformes) pertanyents a dues subfamílies: *Lampanyctus crocodilus*, *Notoscopelus elongatus* (Lampanyctinae) i *Symbolophorus veranyi* (Myctophinae). Tots els exemplars van ser capturats al Mediterrani. Les mostres destinades a l'estudi de la ultraestructura van ser fixades seguint el protocol descrit a Saperas i Ribes (2015) mentre que les destinades a l'estudi bioquímic van ser preservades en etanol 90% a -20°C fins al seu processament.

Microscòpia electrònica

Tant les mostres destinades a microscòpia electrònica de transmissió (TEM) com de rastreig (SEM) van ser processades i observades com es descriu a Saperas i Ribes (2015).

Extracció i purificació de les PEB

Els nuclis es van preparar com a Saperas *et al.* (1993) amb lleugeres modificacions. Breument, les gònades madures es van homogeneïtzar en tampó A (0.25 M sacarosa, 5 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) continent 50 mM de clorur de benzamidina, es van filtrar i centrifugar (2300g, 10 min, 4°C), i a continuació es van homogeneïtzar i centrifugar dos vegades més en tampó A continent 0.1% Tritó-X100, una vegada en tampó B (20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) i una última vegada en tampó C (50 mM Tris-HCl, pH 7.4). En aquells casos on es va processar un únic exemplar, els passos amb els tampons B i C es van ometre i tot el procés es va realitzar en un tub Eppendorf.

Les PEB es van extreure a partir dels nuclis amb HCl 0.4 M o bé, mitjançant una extracció fraccionada, utilit-

zant primer àcid acètic al 35 % i després HCl 0.4 M. Les proteïnes extretes es van precipitar amb 6 volums d'acetona a -20°C tota la nit, es van rentar amb acetona freda i finalment es van assecar.

Pel fraccionament i purificació de les PEB es va usar HPLC de fase reversa amb una columna Vydac C₁₈ 4.6x250 mm utilitzant un gradient creixent d'acetonitril en presència de 0.1% àcid trifluoroacètic (Ausió, 1988) així com cromatografia d'intercanvi catiònic. En el darrer cas es va utilitzar un ÄKTA Purifier 10 FPLC, una columna HiTrap SP FF (GE Healthcare) i un gradient creixent de NaCl en 50 mM acetat de sodi, pH 6.0.

Anàlisis electroforètiques, anàlisis aminoacídiques i espectrometria de masses

Les electroforesis en gels de poliacrilamida-acètic-urea (AU-PAGE) s'han realitzat com a Saperas *et al.* (1992). Per a les electroforesis bidimensionals s'ha utilitzat AU-PAGE per a la primera dimensió i electroforesi en poliacrilamida-dodecil sulfat sòdic (SDS-PAGE) per a la segona.

Les anàlisis d'aminoàcids van realitzades com a Karsinsky *et al.* (2005), i la desorció/ionització làser assistida per matriu (MALDI) com a Hunt *et al.* (1996).

RESULTATS

Caracterització de les PEB de *Lampanyctus crocodilus*

L. crocodilus mostra un patró complex de PEB en gels AU-PAGE. Tant en les mostres d'esperma com en les procedents de gònada madura extretes amb HCl 0.4 M, les bandes proteïques apareixen distribuïdes en dos regions principals (Figura 1A): un primer grup de proteïnes amb mobilitat electroforètica a la zona de les histones, i un segon grup (P a la Figura 1) amb una mobilitat major, que es troba entre la de les histones i la de la salmina (protamina de salmó). Aquesta darrera fracció consisteix majoritàriament en tres proteïnes, P1, P2 i P3, que són quantitativament les més importants de l'extracte. Quan l'extracció de les PEB es fa de forma fraccionada, les histones s'extreuen típicament a l'utilitzar acètic 35% (fracció AC) (Subirana *et al.*, 1973; Saperas *et al.*, 1993), mentre que aquelles proteïnes amb una major relació arginina/lisina (com ara les protamines) s'extreuen posteriorment amb la fracció HCl 0.4 M post acètic (fracció PA). En el cas de *L. crocodilus* (Figura 1B), a la fracció AC apareixen majoritàriament histones però també algunes altres bandes minoritàries. D'altra banda, la fracció ràpida P, així com algunes de les proteïnes que migraven a la regió de les histones, apareixen a la fracció PA, fet que indica una

major basicitat d'aquestes proteïnes. El fet que les mateixes proteïnes que apareixen en la fracció PA es mostren també incapaces d'entrar en els gels SDS-PAGE durant les electroforesis bidimensionals (Figura 1C) apunta també clarament a què aquestes proteïnes són riques en arginina.

Tot i que les proteïnes de la fracció ràpida (P1, P2 i P3) no tenen una mobilitat tan ràpida com les protamines típiques de peixos, el seu comportament durant les extraccions àcides i en front de l'SDS apunten a què es tractaria de protamines.

nic (no mostrat) no van permetre obtenir les proteïnes P1, P2 i P3 com a tres pics perfectament separats. Tot i així, es va poder dur a terme una anàlisi aminoacídica preliminar de P1 i P3 (Figura 1G). L'anàlisi mostra, efectivament, una composició rica en arginina (42% i 46% molar, respectivament), essent la quantitat de lisina força menor (4.4% i 3.5%). Igualment presenten una representació important dels aminoàcids fosforilables Ser i Thr (11-12%).

Finalment, la massa molecular de les proteïnes P1, P2 i P3 va poder ser determinada per espectrometria de

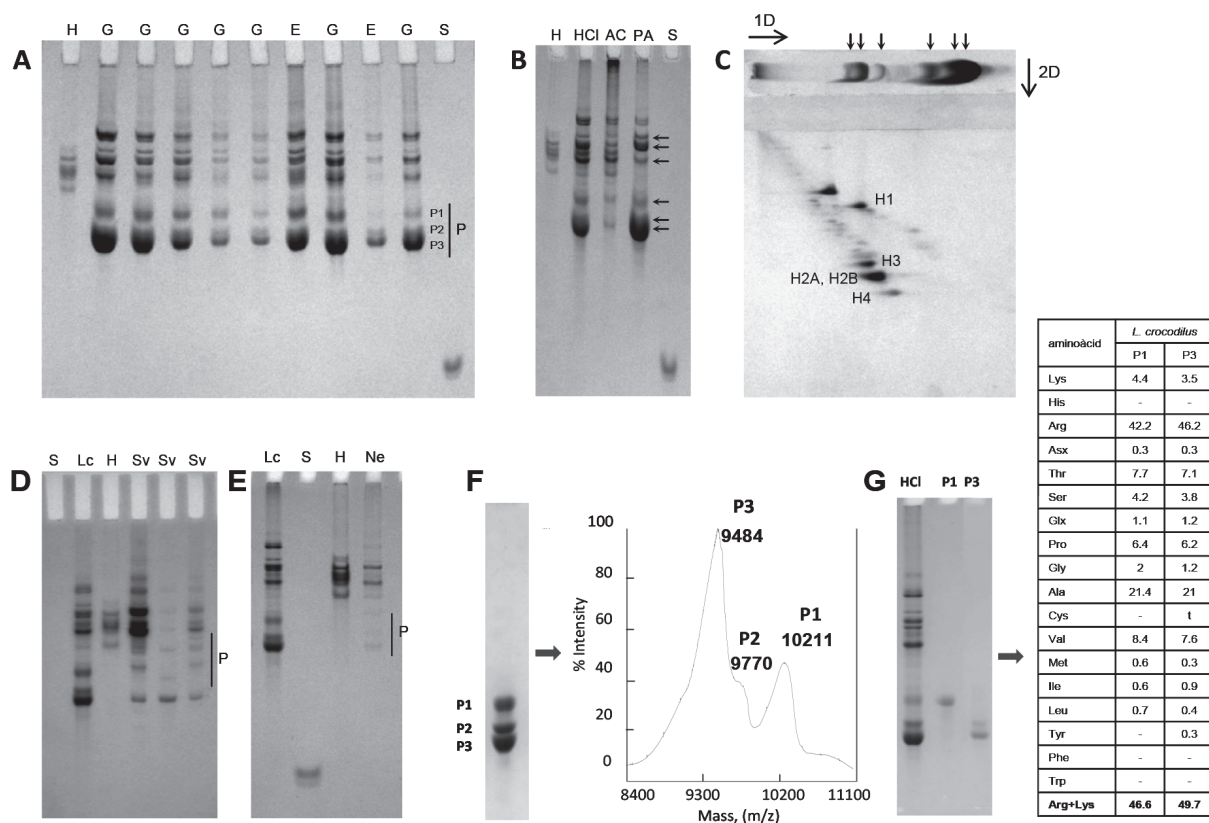


Figura 1. Caracterització de les proteïnes espermàtiques bàsiques (PEB). **A**, PEB obtingudes a partir de gònada madura (G) o esperma (E) de diferents individus de *L. crocodilus* (AU-PAGE). **B**, Extracció fraccionada de les PEB de *L. crocodilus* (AU-PAGE); HCl, AC i PA, segons es descriu al text. **C**, Electroforesi bidimensional de les PEB de *L. crocodilus* (1D, AU-PAGE; 2D, SDS-PAGE). **D** i **E**, PEB obtingudes a partir de gònada madura de diferents individus de *S. veranyi* (**D**) i *N. elongatus* (**E**). **F**, Espectrometria de masses de les proteïnes P1, P2 i P3 de *L. crocodilus*. **G**, Mostres utilitzades i resultat de la determinació de la composició aminoacídica de P1 i P3 de *L. crocodilus*. H, patró d'histones d'eritròcit de pollastre; S, patró de salmina (protamina de salmó); Lc, patró corresponent a les PEB de *L. crocodilus*; Sv, *S. veranyi*; Ne, *N. elongatus*.

Per poder caracteritzar-les millor es va procedir a la seva purificació. Les proves realitzades amb HPLC de fase reversa permetien separar la fracció ràpida P de la resta de proteïnes. No obstant això, els intents de refraccionament tant per fase reversa com per bescanvi catiò-

masses, resultant-ne uns valors de 10211, 9770 i 9494 Da, respectivament (Figura 1E), valors molt més elevats que els 4000-5000 Da habituals en altres protamines de peixos.

PEB de *Symbolophorus veranyi* i *Notoscopelus elongatus*

En el cas d'aquestes dues espècies, el baix nombre d'exemplars que es van poder aconseguir va limitar la caracterització de les seves proteïnes. Tot i així, es pot observar com el patró general de les PEB de les dues espècies (extracció global amb HCl 0.4 M) és comparable al de *L. crocodilus*: un grup de proteïnes amb mobilitat electroforètica a la regió de les histones i un altre grup de mobilitat intermitja entre les histones i la salmina (P a Figura 1D-E).

Morfologia general de l'espermatozoide i patró de condensació de la cromatina de *S. veranyi*

L'espermatozoide de *S. veranyi* presenta una morfologia molt similar a la de *L. crocodilus* (Ribes *et al.*, 2015; Saperas i Ribes 2015). A la Figura 2A-B es mostren les imatges de SEM dels dos espermatozoides. Es pot apreciar com en ambdós casos el cap presenta una morfologia força modificada, en forma de plàtan. Així, el cap és corbat i més estret en l'extrem anterior que en el posterior. Del costat convex del cap (que correspondria inicialment al pol basal de l'espermàtida), i lleu-

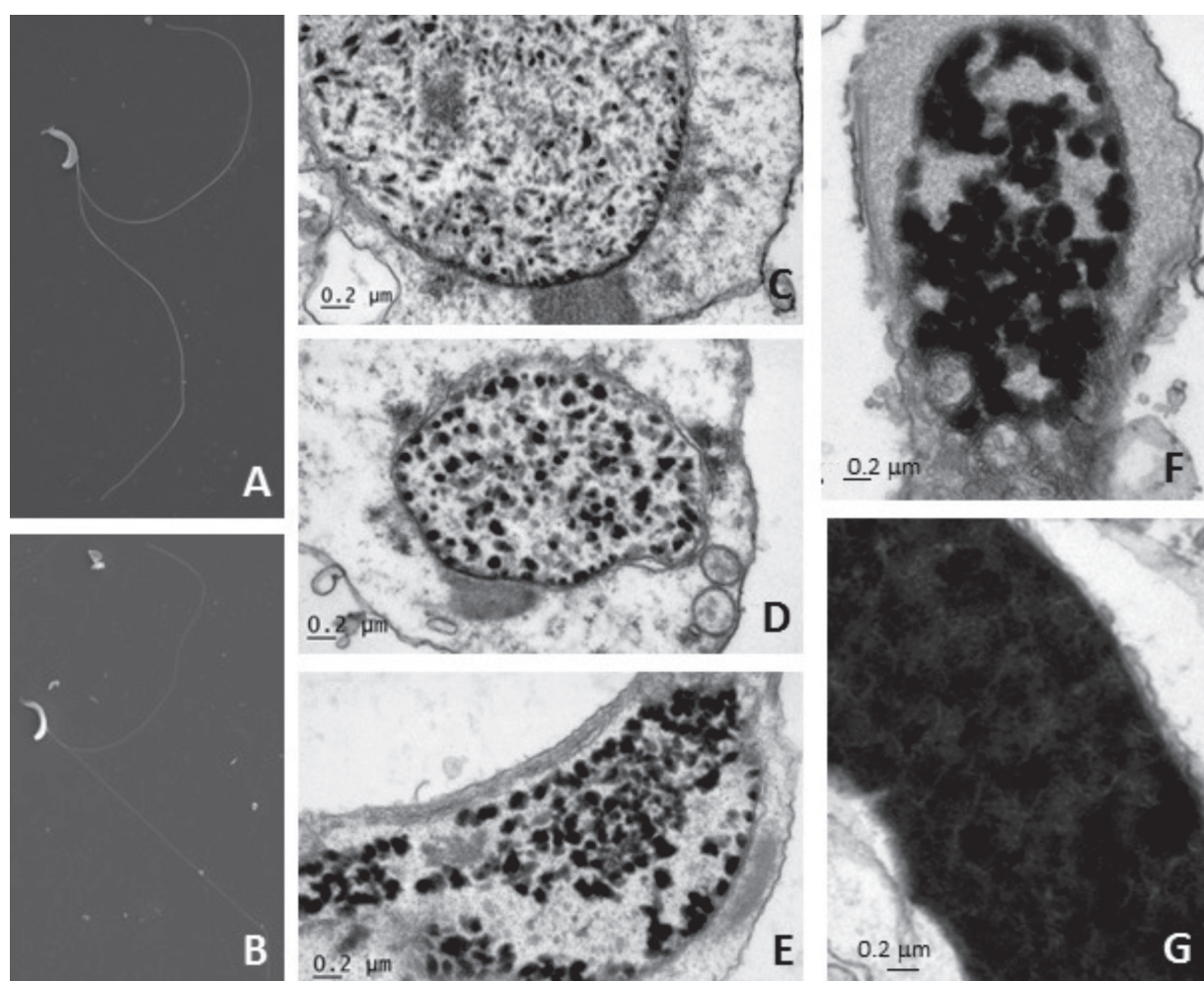


Figura 2. A i B, Imatges de microscòpia electrònica de rastreig (SEM) de l'espermatozoide de *Lampanyctus crocodilus* (A) i de *Symbolophorus veranyi* (B). C – F, Imatges de microscòpia electrònica de transmissió (TEM) d'espermàtides de *S. veranyi* en diverses etapes de desenvolupament: C, espermàtida jove, cromatina fibrogranular amb grànuls de 25 i de 50±5 nm de diàmetre; D i E, espermàtida mitjana, cromatina granular de 150±50 nm de diàmetre; F espermàtida avançada, els grànuls de 150 nm inicien un procés d'aglutinació. G, Nucli de l'espermatozoide de *S. veranyi*. La cromatina presenta un alt grau de compactació degut a la completa aglutinació dels grànuls. Escala: 0,2 µm.

gerament desplaçats del seu centre, en surten dos flagels d'uns 55 µm de longitud. Com a *L. crocodilus*, aquests flagels presenten un patró axonemal 9+0 (no mostrat).

Concomitantment a la transformació morfològica del cap de l'espermatozoide, el seu nucli i l'organització de la cromatina també es van modificant (Figura 2C-G). La cromatina del nucli arrodonit de l'espermàtida primerenca presenta una estructura fibrogranular amb grànuls de 25 i 50±5 nm de diàmetre. La condensació sembla iniciar-se preferentment a la perifèria i va progressant cap a l'interior. Els grànuls de cromatina van augmentant de mida de manera que a l'espermàtida mitjana (Figura 2D-E) s'hi troben estructures granulars de 150±50 nm de diàmetre. Finalment, en l'espermàtida avançada (Figura 2F), aquests grànuls ja no augmenten de mida sinó que es van aglutinant, donant lloc a una cromatina altament electrodensa a l'espermatozoide d'aquesta espècie (Figura 2G).

DISCUSSIÓ

A les cèl·lules somàtiques el DNA està associat a histones, en canvi la cromatina dels espermatozoides presenta una major variabilitat en el tipus de proteïna responsable de la seva organització. En general, les proteïnes espermàtiques bàsiques (PEB) solen classificar-se en tres grans grups: les proteïnes tipus histones (tipus H); el tipus protamina (tipus P), que engloba un conjunt variat de proteïnes petites i molt enriquides en arginina que solen reemplaçar les histones somàtiques assolint un grau de condensació de la cromatina molt més elevat; i el tipus PL (de "protamine-like"), que agruparia a un grup de proteïnes amb característiques composicionals i estructurals intermèdies entre histones i protamines. Malgrat que el tipus protamina hi predomina, a diferència d'altres grups de vertebrats, en els peixos hi podem trobar exemples de tots tres tipus de PEB (Saperas *et al.*, 1994).

A *L. crocodilus*, el comportament durant les extraccions àcides i enfront de l'SDS, i les anàlisis composicionals, indiquen que les PEB predominants poden ser considerades protamines. Són poc extretes amb àcid acètic 35% (apareixent majoritàriament a la fracció PA), i es mostren insolubles en SDS. A més presenten una gran riquesa en arginina i una presència considerable d'aminoàcids fosforilables (tret també característic en protamines). A diferència d'altres peixos, però, aquestes protamines coexisteixen amb histones i amb una notable proporció de proteïnes de mobilitat electroforètica similar a aquestes però de major basicitat. A més, la mida d'aquestes protamines és aproximadament el doble de l'habitual en peixos.

Les PEB de *S. veranyi* i *N. elongatus* mostren un patró electroforètic en AU-PAGE molt similar a les de *L. crocodilus*, apuntant a què aquest tipus de proteïnes podria ser característic dels mictòfids.

D'altra banda, tant el tipus d'espermatozoide com el patró de condensació de la cromatina observat durant l'espermioïgènesi de *S. veranyi* són també equiparables als descrits recentment per *L. crocodilus* (Ribes *et al.*, 2015, Saperas i Ribes, 2015). En totes dues espècies (representants de les dues subfamílies dels mictòfids), s'observa com al llarg de l'espermioïgènesi el cap i el nucli es van allargant i corbant, la cromatina inicialment fibrogranular va presentant grànuls de mida creixent, fins que a l'espermàtida avançada es dona una coalescència d'aquests grànuls assolint un grau de compactació de la cromatina molt elevat. Paral·lelament a les modificacions que experimenta el cap, l'espermàtida desenvolupa dos flagels, tots dos de tipus 9+0.

Així doncs, als Myctophidae, a més de trobar-hi les dues singularitats ja apuntades per Mattei i Mattei (1976) de posseir un espermatozoide biflagel·lat i un patró axonemal 9+0, s'hi afegeix la de presentar les protamines més grans descrites fins al moment en peixos.

AGRAÏMENTS

Els autors volem agrair a J.A. Caparrós i a la tripulació dels vaixells de pesca *Nus* i *l'Òstia* l'haver-nos proporcionat els exemplars estudiats, i al Dr. D. Lloris el seu ajut en la identificació de les espècies. Les observacions de microscòpia electrònica han estat realitzades als Serveis Científic-Tècnics de la UB. Aquest treball ha estat parcialment finançat per la Fundació Bosch i Gimpera (UB) (E.R.), pel NSERC (46399-2012) (J.A.) i pel MINECO-FEDER (MAT2015-69547-R) i la Generalitat de Catalunya (2014SGR188) (N.S.).

BIBLIOGRAFIA

- HARA M (2007) Ultrastructure of spermatozoa of two species of Myctophidae; *Symbolophorus californiensis* and *Notoscopelus* sp. *Japan J Ichthyol* 54:41-46.
- HARA M, OKIYAMA M (1998) An ultrastructural review on the spermatozoa of Japanese fishes. *Bulletin of the Ocean Research Institute, University of Tokyo* 33:1-138.
- HULLEY PA (1984) Myctophidae. In: Whitehead PJP, Bauchot ML, Hureau JC, Nielsen J, Tortonese E (eds) *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean* (FNAM). UNESCO, Paris, vol I, p. 429-483.

- HUNT JG, KASINSKY HE, ELSEY RM, WRIGHT CL, RICE P, BELL JE, SHARP DJ, KISS AJ, HUNT DF, ARNOTT DP, RUSS MM, SHABANOWITZ J, AUSIÓ J (1996) Protamines of reptiles. *J Biol Chem* 271:23547-23557.
- KASINSKY HE, FREHLICK LJ, SU HW, AUSIÓ J (2005) Protamines in the internally fertilizing neobatrachian frog *Eleutherodactylus coqui*. *Mol Reprod Dev* 70:373-381.
- MATTEI X, MATTEI C (1976) Spermatozoïdes à deux flagelles de type 9+0 chez *Lampanyctus* sp. (poisson Myctophidae). *J Microsc Biol Cell* 25:187-188.
- RIBES E, CHEEMA M, GONZÁLEZ-ROMERO R, LLORIS D, AUSIÓ J, SAPERAS N (2015) Spermiogenesis and biflagellate spermatozoon of the teleost fish *Lampanyctus crocodilus* (Myctophiformes, Myctophidae): ultrastructure and characterisation of its sperm basic nuclear proteins. *Cell Tissue Res* 361:619-632.
- SAPERAS N, AUSIÓ J, LLORIS D, CHIVA M (1994) On the evolution of protamines in bony fish: alternatives to the “retroviral horizontal transmission” hypothesis. *J Mol Evol* 39:282-295.
- SAPERAS N, CHIVA M, AUSIÓ J (1992) Purification and characterization of the protamines and related proteins from the sperm of a tunicate, *Styela plicata*. *Comp Biochem Physiol B* 103:969-974.
- SAPERAS N, LLORIS D, CHIVA M (1993) Sporadic appearance of histones, histone-like proteins, and protamines in sperm chromatin of bony fish. *J Exp Zool* 265:575-586.
- SAPERAS N, RIBES E (2015) Anàlisi ultrastructural de l'espermioquèsi i l'espermatozoide biflagellat del peix *Lampanyctus crocodilus* (Myctophiformes, Myctophidae). *Societat Catalana de Biologia (SCB) Biol Reprod* 14:55-60.
- Subirana JA, Cozcolluela C, Palau J, Unzeta M (1973) Protamines and other basic proteins from spermatozoa of molluscs. *Biochim Biophys Acta* 317:364-379.

POSIBLE PAPEL DE H4K5bu EN LA TRANSICIÓN NUCLEOHISTONA-NUCLEOPROTAMINA DE LA ESPERMATOGENESIS HUMANA Y SU DESREGULACIÓN EN DIFERENTES PATOLOGÍAS TESTICULARES

Alberto de la Iglesia^{1*}, Ferran Barrachina^{1*}, Afsaneh Goudarzi², Sophie Rousseaux², Saadi Khochbin², Carme Mallofré³, Leonardo Rodriguez-Carunchio³, Josep Lluís Ballescà⁴, Rafael Oliva¹

¹Grupo de Investigación de Biología Molecular de la Reproducción y el Desarrollo, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Barcelona, España, y Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Hospital Clínic, Barcelona, España (roliva@ub.edu)

²CNRS UMR 5309; Inserm, U1209; Université Grenoble Alpes; Institute for Advanced Biosciences, Grenoble, F-38700 Francia

³Departamento de Patología, Universidad de Barcelona. Hospital Clínic, Barcelona, España

⁴Instituto Clínico de Ginecología, Obstetricia y Neonatología, Hospital Clínic, Barcelona, España

*Equal contribution

Resumen

El reciente descubrimiento de nuevos tipos de acilaciones, concretamente la butirilación de lisinas (Kbu), como modificaciones postraduccionales (MPTs) de histona durante el proceso de gametogénesis masculina ha ampliado el campo de la regulación epigenética de la expresión génica durante la espermatogénesis. Kbu estimula la transcripción y compite directamente con la acetilación de lisinas (Kac), siendo ésta especialmente importante en el residuo Lisina 5 de la histona H4 (H4K5), en el que comienza la transición nucleohistona-nucleoprotamina dependiente de acetilación. Dada la importancia de la Kbu en la remodelación de la cromatina durante la espermatogénesis, el objetivo de nuestro estudio es caracterizar por primera vez el patrón de H4K5bu durante los diferentes estadios del proceso espermatogénico en humanos, así como analizar su desregulación en diferentes tipos de patologías testiculares. Para ello, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica (IHC) e inmunofluorescencia (IF) en biopsias testiculares humanas y espermatozoide maduro, respectivamente. La IHC reveló altos niveles de H4K5bu durante los estadios correspondientes a la transición de espermátida redonda a elongada en pacientes con espermatogénesis normal, un comportamiento similar al observado previamente para H4K5ac en ratón. Esta observación apoya la hipótesis de que, en humano, al igual que se ha visto en ratón, un mecanismo de competencia entre H4K5ac-H4K5bu lideraría el control de la transición histona a protamina en las células germinales masculinas. Además, la IHC de pacientes con arresto espermatogénico y cáncer testicular evidencia diferentes desregulaciones del patrón descrito, sugiriendo que H4K5bu podría estar involucrada en el correcto desarrollo de la espermatogénesis. En resumen, nuestros hallazgos contribuyen a una mayor comprensión de esta acilación durante la espermatogénesis humana, lo que apoyaría un nuevo mecanismo de remodelación de la cromatina necesario para el proceso de transición histona-protamina.

Paraules clau: butirilación de histona H4K5, H4K5bu, transición NH-NP, inmunohistoquímica, espermatogénesis.

Abstract

The recent finding of acylation histone post-translational modifications (PTMs) other than the well-known lysine acetylation (Kac) during the male gametogenic process, such as lysine butyrylation (Kbu), has broadened the field of epigenetic regulation of gene expression during spermatogenesis. Kbu stimulates transcription and is known to directly compete with Kac, being specifically relevant in Lys5 residues of histone H4 (H4K5), in which the acetylation-dependent nucleohistone to nucleoprotamine transition is triggered. Given the importance of Kbu in chromatin remodeling throughout spermatogenesis, the aim of our study is to characterize for the first time the pattern of H4K5bu during the different stages of the human spermatogenic process and to analyze its deregulation in different testicular pathologies. To address this issue, immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) assays were performed in human testicular biopsies and sperm cells, respectively. IHC results in normal spermatogenesis revealed high levels of H4K5bu during the stages corresponding to the transition from round to elongating spermatids, a similar behavior than H4K5ac (previously described in mouse). This observation supports the hypothesis that, as previously shown in mouse, a dynamic H4K5bu-H4K5ac competing mechanism would be leading the control of histone-to-protamine transition in

human male gametogenic cells. Furthermore, IHC in patients with spermatogenic arrest or testicular cancer evidences different deregulations of the described pattern, suggesting that H4K5bu could be involved in the correct development of spermatogenesis. In summary, our findings contribute to nourish the knowledge of this non-acetyl acylation during human spermatogenesis supporting a novel competing mechanism of chromatin remodeling required for the histone-to-protamine transition process.

Key words: histone H4K5 butyrylation, H4K5bu, NH-to-NP transition, immunohistochemistry, spermatogenesis.

INTRODUCCIÓN

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación celular complejo y altamente regulado que permite que las células madre germinales masculinas diploides se transformen en células haploides altamente especializadas, los espermatozoides. Durante la última etapa de éste proceso, la espermiogénesis, se producen los cambios más dramáticos a nivel morfológico, citoplasmático y nuclear. Uno de los procesos clave a nivel de la cromatina es la transición de nucleohistona a nucleoprotamina, que da lugar a un núcleo altamente compactado, necesario para proteger el genoma paterno del ataque de nucleasas y conferir al espermatozoide de una estructura hidrodinámica necesaria para su función (Oliva y Mezquita, 1982; Oliva *et al.*, 1987; Oliva *et al.*, 1990; Oliva y Dixon, 1991; Oliva, 2006; Oliva y Castillo, 2011; Neto *et al.*, 2016). No obstante, este reemplazamiento no es completo y, mientras un 85-95% del DNA queda unido a la fracción nucleoprotamina en una estructura toroidal muy compacta, el 5-15% restante permanece unido a una fracción nucleohistona residual (Gatewood *et al.*, 1987; Oliva, 2006; Balhorn, 2007; Rathke *et al.*, 2014). Este proceso está altamente regulado a nivel epigenético interviniendo de forma clave las modificaciones postraduccionales (MPTs) de las histonas (Rathke *et al.*, 2014). Concretamente, una ola de hiperacetilación de las histonas es el detonante que desencadena el proceso de reemplazamiento de histonas en el núcleo del espermatozoide (Oliva y Mezquita, 1982; Oliva *et al.*, 1990; Goudarzi *et al.*, 2014). Cuando las histonas son hiperacetiladas, el primer bromodominio de la proteína Brdt (*bromodomain testis-specific protein*) reconoce el residuo de lisina 5 de la histona H4 (H4K5) (Morinière *et al.*, 2009) y empieza la transición: primero, las histonas son reemplazadas por variantes de histonas y, posteriormente, por proteínas de transición, que serán finalmente sustituidas por protaminas (Kimmins y Sassone-Corsi, 2005; Oliva 2006; Balhorn, 2007; Rathke *et al.*, 2014; Bao y Bedford, 2016; Oliva and Castillo, 2011). Sin embargo, hallazgos recientes sugieren la posible implicación de nuevos participantes en este proceso, así como de nuevas funciones de elementos ya conocidos. Por ejemplo, la participación de la variante H2A.L.2 de la histona H2A parece ser indis-

pensable para la unión de las proteínas de transición, las cuales, en contra de lo que se pensaba, no reemplazan directamente las histonas sino más bien parece que son cruciales para el reclutamiento de las protaminas y su correcto procesamiento, siendo las protaminas las verdaderas mediadoras del reemplazo de histonas (Barral *et al.*, 2017). Por otro lado, parece ser que no sólo las acetilaciones de las histonas regulan epigenéticamente este proceso, sino que también intervendrían otras MPTs, todas pertenecientes al grupo de las acilaciones (Sabari *et al.*, 2017). Entre ellas, se ha descrito un papel clave de la butirilación en la espermatogénesis de ratón, compitiendo por la acetilación en H4K5 durante el proceso de recambio de histona a protamina (Goudarzi *et al.*, 2016) (Figura 1). Se ha descrito que cuando H4K5 es butirilada (H4K5bu) en vez de acetilada (H4K5ac), el primer bromodominio de Brdt no puede reconocer dicho residuo, evitando así el reemplazamiento de las histonas dependiente de hiperacetilación. Es por ello que se ha propuesto que las histonas H4K5bu serían reemplazadas de una forma más tardía en comparación con las histonas H4K5ac, sin coincidir temporalmente con las proteínas de transición. Este hecho sugiere que el intercambio de H4K5bu se produciría directamente por protaminas, dando una conformación toroidal final menos compacta. La hipótesis de nuestro trabajo es que este mecanismo de competencia H4K5ac-H4K5bu podría estar presente también en humanos. Por tanto, nuestro primer objetivo será caracterizar por primera vez el patrón de H4K5bu durante la espermatogénesis humana, así como analizar su desregulación en diferentes tipos de patologías testiculares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Biopsias testiculares y muestras de semen

Las biopsias testiculares provienen del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínic (Barcelona, España). Se definieron dos grupos de estudio principales: (i) pacientes con espermatogénesis normal (n=5) y (ii) pacientes con espermatogénesis alterada, dentro del cual se incluyen pacientes con Síndrome de *Sertoli cell-only* (n=3), hipoespermatogénesis (n=3), arresto espermato-

génico (n=4), seminoma (n=3) y teratoma (n=1). Las muestras de semen humano provienen de pacientes de la clínica de fertilidad del Hospital Clínic de Barcelona (FIV Clinic). Todos los pacientes han dado el consentimiento informado para participar en el estudio.

ros estadios de espermátidas redondas (Estadios I-V) (ii) Estadios tardíos de espermátidas redondas (Estadios VI-VIII), (iii) Espermátida elongada (Estadios IX-XII) y (iv) Espermátidas condensantes.

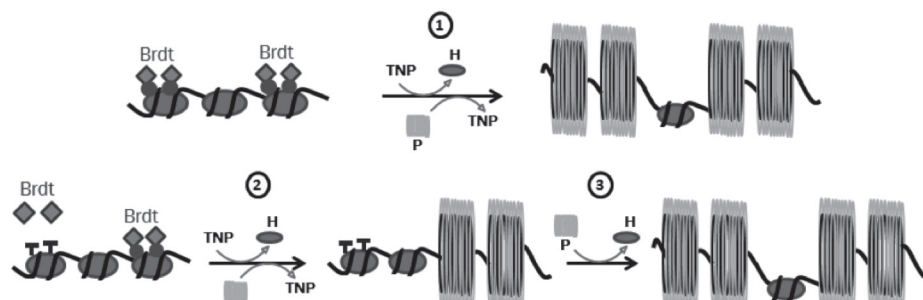


Figura 1. Mecanismo de actuación propuesto para H4K5bu en la transición nucleohistona-nucleoprotamina por Goudarzi *et al.*, 2016. Cuando Brdt (*Bromodomain testis-specific protein*) reconoce el residuo H4K5ac (círculo en la imagen) en el nucleosoma, se desencadena la transición nucleohistona a nucleoprotamina (1), y las histonas (H) son sustituidas por proteínas de transición (TNP) y éstas después por protaminas (P) (parte de arriba). Sin embargo, el bromodominio de Brdt no reconoce a H4K5bu (forma de T en la imagen), por lo que H4K5bu evitaría el recambio de histonas dependiente de acetilación (2). En lugar de esto, las histonas butiriladas llevarían a cabo un recambio tardío directamente por protaminas, sin la intervención de proteínas de transición (3).

Inmunohistoquímica (IHC)

Las biopsias testiculares fueron fijadas por inmersión en fijador Bouin y embebidas en parafina. La IHC se realizó siguiendo las especificaciones de Minjia *et al.*, 2011. Se incubó con anticuerpo anti-H4K5bu a concentración 1:400 en leche 1%-PBS (PTM-313; PTM Biolabs). La incubación con anticuerpo secundario biotinilado en dilución 1:200 en leche 0,5%-PBS (B7264; Vector Laboratories) se realizó durante 30 min a temperatura ambiente. Se llevó a cabo una contraincoloración PAS-hematoxilina. Las secciones se observaron en microscopio óptico (Olympus BX50).

Clasificación de los estadios de la espermatogénesis humana

La clasificación de los estadios de la espermatogénesis en los túbulos seminíferos se realizó siguiendo la nueva clasificación definida por Muciaccia *et al.*, 2013. Se analizaron un total de 30 túbulos de cada muestra para la caracterización del patrón de H4K5bu. El criterio de inclusión se acotó a la identificación de todos los tipos celulares esperados para cada uno de los estadios y a una correcta distribución de los diferentes tipos celulares dentro del túbulo seminífero. Para la comparación entre diferentes grupos, se agruparon las espermátidas analizadas en diferentes rangos de estadios: (i) Prime-

Inmunofluorescencia (IF)

Tras la descondensación de los núcleos de espermatozoides, el protocolo de IF se realizó según se describe en Ramalho-Santos *et al.*, 2007. El anticuerpo anti-H4K5bu ya mencionado se aplicó a concentración 1:200 durante 16h a 4°C. El anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit (dilución 1:500 en PBS + 5% leche desnatada + 0.2% Tween 20) se aplicó durante 30 min a 37°C. Se observó en microscopio de fluorescencia (Olympus BX50).

RESULTADOS

H4K5bu se detecta durante la transición de espermátida redonda a elongada en la espermatogénesis humana normal

La IHC de H4K5bu durante la espermatogénesis humana normal permitió caracterizar su presencia en los diferentes tipos de células germinales, así como en las células somáticas de Sertoli (Figura 2). Se determinó el porcentaje de detección de H4K5bu expresado en función del número de túbulos positivos con respecto al total de túbulos identificados para un estadio determinado, así como la intensidad de la tinción. Las células de Sertoli presentaron unos niveles basales de butirilación,

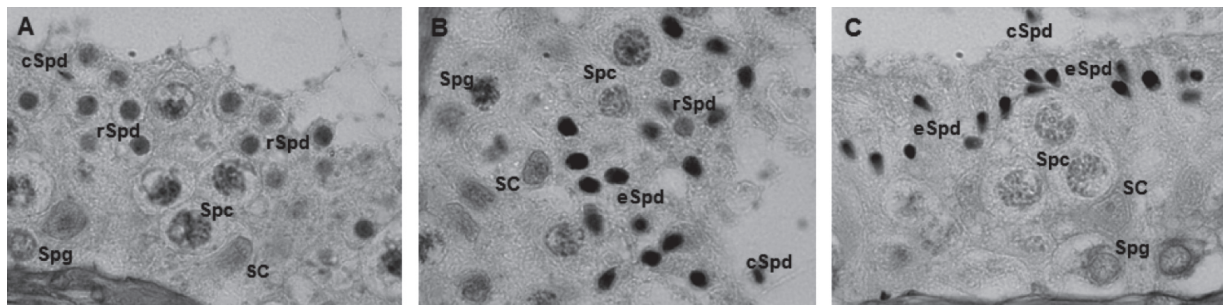


Figura 2. Detección mediante IHC de H4K5bu en túbulos seminíferos de testículo durante los estadios II/III (A), VIII/IX (B) y X (C) de la espermatogénesis humana. Los diferentes tipos celulares de la espermatogénesis se muestran en las imágenes como Spg (espermatogonia), Spc (espermatocito), rSpd (espermátida redonda), eSpd (espermátida elongada) y cSpd (espermátida condensante). Las células de Sertoli se indican como SC.

evidenciados por los bajos porcentajes de detección e intensidad de la misma (Tabla 1). Respecto a los diferentes tipos de células germinales, el cribado inicial mostró una mayor detección de esta MPT desde los últimos estadios de espermátida redonda hasta alcanzar su pico máximo en los estadios de espermátida elongada, para después disminuir drásticamente en las espermátidas condensantes (Tabla 1). Esto nos llevó a profundizar más en el estudio de H4K5bu en las diferentes fases de espermátidas (Figura 3). En base a la clasificación de los diferentes estadios de la espermatogénesis establecida por Mucciaccia *et al.*, 2013, se observaron los mayores niveles de detección e intensidad de H4K5bu concretamente en espermátidas VIII-XI, coincidiendo con la transición de espermátida redonda a

elongada (Figura 3). Por otro lado, las espermatogonias y los primeros estadios de espermátida redonda mostraron unos bajos niveles de butirilación (Tabla 1).

El patrón de H4K5bu se encuentra desregulado principalmente en pacientes con arresto espermatogénico y cáncer testicular

Para esclarecer el papel de H4K5bu en la espermatogénesis humana, una vez caracterizado el patrón normal de H4K5bu estudiamos posibles desregulaciones del mismo en pacientes con diferentes tipos de patologías testiculares. Todos los grupos de pacientes estudiados presentaron cambios en el patrón de H4K5bu comparados con el grupo control (espermatogénesis normal)

Tabla 1. Resultados de IHC de H4K5bu para los diferentes grupos de estudio, referidos a cada tipo celular estudiado. Los resultados vienen expresados por el porcentaje de túbulos que presentaron tinción de H4K5bu para cada tipo celular estudiado con respecto al total de túbulos estudiados (superíndice), así como por la intensidad de la tinción en una escala arbitraria con rango de 1 a 6 ($\pm$: 0-1.5; +: 1.5-2.5; ++: 2.5-3.5; +++: 3.5-4.5; ++++: 4.5-6; NA: no detectado).

Grupo	SC	SPG	SPC	rSPD (I-V)	rSPD (VI-VIII)	eSPD	cSPD
NORMAL (n=5)	1% ¹⁴⁸ (+)	15% ¹⁵⁴ (++)	0% ¹⁵⁹	15% ⁵³ (+)	70% ⁵¹ (++++)	95% ¹⁰⁵ (++++)	1% ⁷⁶ ($\pm$)
SERTOLI-CELL ONLY (n=3)	10% ⁹⁰ ($\pm$)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HIPOESPERMATOGÉNESIS (n=3)	0% ⁷¹	30% ⁶⁷ (+)	0% ⁷²	25% ¹⁹ (-)	80% ¹⁴ (++++)	95% ³⁷ (++++)	25% ¹³ ($\pm$)
ARRESTO ESPERMATOGÉNICO (n=4)	0% ¹⁰⁰	7% ¹¹² ($\pm$)	1% ⁹⁷ ($\pm$)	50% ²⁷ (++)	60% ⁸ (++++)	95% ³² (++++)	40% ¹⁰ (++)
SEMINOMA (n=3)	0% ⁸⁰	25% ⁸² ($\pm$)	0% ⁸⁰	0% ²⁵	65% ¹⁷ (++)	75% ⁵⁹ (+++)	0% ¹⁹
TERATOMA (n=1)	10% ²⁸ ($\pm$)	65% ²⁷ ($\pm$)	0% ³⁰	40% ¹⁰ (+)	100% ⁴ (++)	100% ²¹ (++++)	0% ⁸

SC: células de Sertoli; SPG: espermatogonias; SPC: espermatocitos; rSPD: espermátidas redondas; eSPD: espermátidas elongadas; cSPD: espermátidas condensantes.

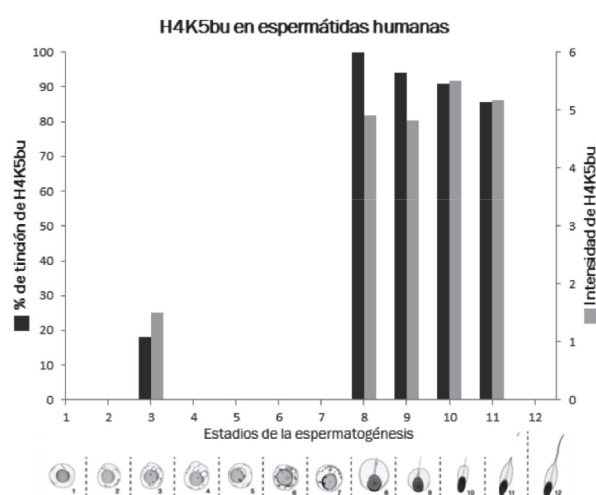


Figura 3. Resultados de IHC para H4K5bu en espermátidas humanas según los distintos estadios de la espermatogénesis (modificado de Muciaccia *et al.*, 2013). Los resultados vienen expresados por el porcentaje de túbulos que presentaron tinción de H4K5bu para cada tipo celular estudiado con respecto al total de túbulos estudiados y por la intensidad de la tinción en una escala con rango de 1 a 6.

(Tabla 1). Entre ellos, cabe destacar los cambios encontrados a nivel de espermátida en los grupos de arresto espermatogénico y de cáncer testicular. Los pacientes con arresto espermatogénico presentaron mayores niveles de H4K5bu en los primeros estadios de espermátida redonda en comparación con el patrón normal, tanto en el porcentaje de detección como en la intensidad de la misma (Tabla 1).

Por otro lado, los pacientes con diferentes tipos de cáncer testicular presentaron dos comportamientos opuestos con respecto al patrón normal de H4K5bu en las espermátidas redondas y elongadas: (i) los pacientes con seminoma presentaban un porcentaje de detección, así como una intensidad de H4K5bu menores que el grupo control, mientras que (ii) el paciente con teratoma presentó unos niveles de detección e intensidad superiores al grupo control (Tabla 1).



Figura 4. H4K5bu se detectó mediante IF en el núcleo de espermatozoides maduros. (A) Visualización en microscopía de campo claro, (B) Tinción de DNA con DAPI y (C) Inmunodetección de H4K5bu.

H4K5bu está presente en espermatozoide maduro

Los estudios de IF en espermatozoide maduro evidenciaron que, a pesar de la disminución de detección de H4K5bu en espermátidas condensantes, un remanente de H4K5bu permanece asociado a la cromatina del espermatozoide maduro de pacientes con seminograma normal (Figura 4).

DISCUSIÓN

En este estudio se define por primera vez el patrón que sigue H4K5bu durante la espermatogénesis humana normal y su presencia en el espermatozoide maduro, así como cambios del mismo en pacientes con diferentes patologías testiculares. La presencia de altos niveles de H4K5bu, específicamente en los últimos estadios de espermátida redonda y durante espermátida elongada, coincide temporalmente con la transición nucleohistona-nucleoprotamina que ocurre durante la espermiogénesis, sugiriendo la participación de esta MPT en los mecanismos reguladores de dicho proceso. Además, los niveles superiores de H4K5bu en espermátidas redondas encontrados en los pacientes con arresto espermatogénico nos llevan a pensar que, cambios en el patrón de expresión de esta modificación en estadios previos a la transición nucleohistona-nucleoprotamina podrían estar provocando una incorrecta regulación global de dicho proceso. Así mismo, los pacientes de cáncer testicular (seminoma y teratoma) posiblemente con una desregulación general de diferentes mecanismos epigenéticos, presentan también una desregulación del patrón de H4K5bu en los túbulos seminíferos que no están directamente afectados por las células cancerosas.

Los resultados de este estudio apoyan resultados previos obtenidos en ratón por Goudarzi *et al.*, 2016, que sugieren la competencia de H4K5ac-H4K5bu en el control de la unión del primer bromodominio de Brdt en la reorganización diferencial de la cromatina espermática. Este mecanismo sería crucial en el intercambio histona-protamina, siendo las histonas butiriladas aquellas que se eliminarían de una forma más tardía y que sufrirían una sustitución directa por protaminas sin la ayuda de proteínas de transición, resultando así en unas estructuras toroidales menos compactas que aquellas que siguen el patrón normal de reemplazamiento. Nuestros resultados para el patrón H4K5bu en espermatogénesis humana apuntan a que dicho mecanismo competitivo podría existir también en modelos de espermatogénesis de mamíferos superiores, por lo que actualmente estamos llevando a cabo estudios de H4K5ac en los mismos pacientes estudiados en el presente estudio.

Por último, la identificación de H4K5bu en el espermatozoide maduro podría ser resultado de remanentes de la espermatogénesis sin una función específica. Sin embargo, no se descarta que pueda representar una marca epigenética potencialmente involucrada en la regulación de la transcripción durante las primeras fases del desarrollo embrionario. Futuros estudios que exploren qué regiones del DNA de espermatozoide están asociadas a H4K5bu mediante Chip-seq podrían aclarar el posible papel de esta MPT en la embriogénesis temprana.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que, al igual que en ratones, el marcaje diferencial de la histona H4 con diferentes grados de acilación podría ser clave en la regulación epigenética de la remodelación cromatínica del espermatozoide e incluso podría participar en los primeros momentos del desarrollo del embrión.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se encuentra subvencionado a cargo del proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad, Fondos FEDER, ISCIII (PI16/00346, PI13/00699), Fundación Salud 2000 (SERONO 13-015) y EUGEN-UB (EU-REP 2014), a R.O. F.B. está subvencionado por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte para la Formación de Profesorado Universitario (FPU15).

REFERENCIAS

- Balhorn, R. (2007). «The protamine family of sperm nuclear proteins». *Genome Biol.*, vol. 8, núm. 9, p. 227.
- Bao, J., Bedford, M.T. (2016). «Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis». *Reproduction*, vol. 151, núm. 5, p. R55–70.
- Barral, S. [et al.] (2017). «Histone Variant H2A.L.2 Guides Transition Protein-Dependent Protamine Assembly in Male Germ Cells». *Molec. Cell*, vol. 66, núm. 1, p. 89–101.
- Gatewood, J.M. [et al.] (1987). «Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin». *Science*, vol. 236, núm. 4804, p. 962–964.
- Goudarzi, A. [et al.] (2014). «Genome-scale acetylation-dependent histone eviction during spermatogenesis». *J. Mol. Biol.*, vol. 426, núm. 20, p. 3342–3349.
- Goudarzi, A. [et al.] (2016). «Dynamic Competing Histone H4 K5K8 Acetylation and Butyrylation Are Hallmarks of Highly Active Gene Promoters». *Molec. Cell*, vol. 62, núm. 2, p. 169–180.
- Kimmins, S., Sassone-Corsi, P. (2005). «Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells». *Nature*, vol. 434, núm. 7033, p. 583–589.
- Minjia, T. [et al.] (2011). «Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification». *Cell*, vol. 146, núm. 6, p. 1016–1028.
- Morinière, J. [et al.] (2009). «Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain». *Nature*, vol. 461, núm. 7264, p. 664–668.
- Muciaccia, B. [et al.] (2013). «Novel Stage Classification of Human Spermatogenesis Based on Acrosome Development». *Biol. of Reprod.*, vol. 89, núm. 3, p. 1–10.
- Neto, F.T.L. [et al.] (2016). «Spermatogenesis in humans and its affecting factors». *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 59, p. 10–26.
- Oliva, R.; Mezquita, C. (1982). «Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids». *Nucleic acids research*, vol. 10, núm. 24, p. 8049–8059.
- Oliva, R., [et al.] (1987). «Factors affecting nucleosome disassembly by protamines in vitro. Histone hyperacetylation and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, núm. 35, p. 17016–17025.
- Oliva, R., [et al.] (1990). «Histone hyperacetylation can induce unfolding of the nucleosome core particle». *Nucleic acids research*, vol. 18, núm. 9, p. 2739–2747.
- Oliva, R.; Dixon, G.H. (1991). «Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction». *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, vol. 40, p. 25–94.
- Oliva, R. (2006). «Protamines and male infertility». *Hum. Reprod. Update*, vol. 12, núm. 4, p. 417–435.
- Oliva, R.; Castillo, J. (2011). «Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation». *Asian journal of andrology*, vol. 13, núm. 1, p. 24.
- Ramalho-Santos, J. [et al.] (2007). «Probing the structure and function of mammalian sperm using optical and fluorescence microscopy». *Mod. Res. Educ. Top. Microsc.*, vol. 1, p. 394–402.
- Rathke, C. [et al.] (2014). «Chromatin dynamics during spermiogenesis». *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, vol. 1839, núm. 3, p. 155–168.
- Sabari, B.R. [et al.] (2017). «Metabolic regulation of gene expression through histone acylations». *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 18, p. 90–101.

BASE MOLECULAR DE LA FUNCIÓ DE L'ESPERMATOZOIDE DE PEIXOS: EL PAPER DE LES ACUAPORINES

Joan Cerdà^{1*}, François Chauvigné¹, Alba Ferré¹, Roderick Nigel Finn²

¹Laboratori Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)-Institut de Ciències del Mar (CSIC), Passeig marítim 37-49, 08003 Barcelona, Espanya. * joan.cerda@irta.cat

²Department of Biology, Bergen High Technology Centre, University of Bergen, 5020 Bergen, Norway, i Institute of Marine Research, PO Box 1870 Nordnes, 5817 Bergen, Norway

Resum

Els gàmetes de teleostis ovípars s'enfronten a importants reptes osmòtics quan s'alliberen al medi extern aquàtic. Descobriments recents en la dorada (*Sparus aurata*) indiquen que els espermatozoides expressen múltiples canals d'aigua transmembrana (acuaporines) que podrien mitigar l'estrès osmòtic associat a l'activació de la motilitat espermàtica en l'aigua marina. Estudis d'inhibició immunològica han revelat que un d'aquests canals, acuaporina-1aa (Aqp1aa), facilita el flux de sortida d'aigua durant el xoc hiperosmòtic en aigua de mar, lo que porta a un augment del Ca^{2+} intracel·lular que activa la motilitat dels espermatozoides. Al mateix temps, durant l'activació la Aqp8bb és ràpidament fosforilada i translocada a la mitocondria, on actua com una peroxiporina facilitant el flux de sortida d'espècies reactives d'oxigen (ROS), com ara el H_2O_2 , i la producció d'ATP per alimentar la motilitat flagel·lar. Mitjançant l'ús d'un repertori d'inhibidors de diferents vies de senyalització intracel·lular hem trobat que el transport mitocondrial de Aqp8bb és regulat per la proteïna quinasa C activada per Ca^{2+} així com per la via de la quinasa c-Jun N-terminal induïda per ROS. Aquestes observacions revelen l'acció coordinada tant de les acuaporines com de diferents vies de senyalització durant l'activació de la motilitat dels espermatozoides de teleostis marins, i proporcionen nous coneixements sobre els mecanismes moleculars subjacents a la fertilitat masculina.

Paraules clau: acuaporina, calci, mitocondria, motilitat, espermatozoide, teleosti, tràfic intracel·lular, ROS.

Abstract

The gametes of oviparous teleosts face tremendous osmotic challenges when released into the external aquatic environment. Recent findings in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*) indicate that multiple transmembrane water channels (aquaporins) are expressed in spermatozoa which might mitigate the osmotic stress occurring during the activation of motility in seawater (SW). Immunological inhibition studies have revealed that one of these channels, aquaporin-1aa (Aqp1aa), facilitates the water efflux during the hyperosmotic shock in SW and the further rise of intracellular Ca^{2+} , which activates sperm motility. In contrast, upon activation Aqp8bb is rapidly phosphorylated and translocated to the mitochondrion, where it acts as a peroxiporin facilitating the efflux of reactive oxygen species (ROS), such as H_2O_2 , and the production of ATP to power flagellar motility. Using a repertoire of inhibitors for different transduction pathways we find that Aqp8bb mitochondrial transport is concomitantly regulated by Ca^{2+} -activated protein kinase C as well as by ROS-induced c-Jun N-terminal kinase signaling. These findings uncover the coordinated action of aquaporins and signaling pathways during sperm motility activation in marine teleosts, and provide novel insight into the molecular mechanisms underlying male fertility.

Key words: aquaporin, calcium, mitochondria, motility, spermatozoa, teleost, intracellular trafficking, ROS.

INTRODUCCIÓ

Els peixos teleostis que habiten en ambients marins i d'aigua dolça estan constantment exposats a gradients osmòtics oposats que condueixen respectivament a l'afluència passiva o flux de sortida d'aigua i el flux de sortida o entrada d'ions. Aquestes perturbacions hidro-

minerals són compensades pel control coordinat dels òrgans osmoregulators que faciliten l'absorció o excreció d'aigua i minerals per tal de mantenir l'equilibri homeosmòtic (Marshall i Grosell 2006). Aquesta situació, però, és extremadament difícil per als gàmetes i embrions de teleostis ovípars alliberats al medi, ja que aquests estan desproveïts dels òrgans juvenils i adults per el

control hídric i iònic. Per tant, sembla probable que en els òrgans reproductius i cèl·lules germinals d'aquests peixos hagin evolucionat adaptacions moleculars per tal de fer front als reptes osmòtics externs, i d'aquesta manera mantenir la capacitat dels gàmetes per formar un zigot que desenvoluparà embrions i larves normals.

En els últims anys, evidències creixents indiquen el paper dels canals d'aigua transmembrana (acuaporines) per el transport de fluid transepitelial en els òrgans de osmoregulació de peixos, com ara les brànquies, intestí o ronyó (Cerdà i Finn 2010; Madsen *et al.* 2015). En teleostis marins també s'ha demostrat que les acuaporines exerceixen papers importants en els gàmetes masculins i femenins. Aquesta investigació està revelant mecanismes inesperats i altament específics de regulació d'acuaporines en cèl·lules germinals, així com la funció d'alguns d'aquests canals més enllà del transport d'aigua. En aquesta petita revisió resumirem alguns d'aquests nous descobriments en el espermatozoide de teleostis marins.

ACTIVACIÓ DE LA MOTILITAT DELS ESPERMATOZOIDES DE PEIXOS MARINS

Els espermatozoides de teleostis es mantenen en repòs en el testicle i conductes eferents, i l'activació de la motilitat solament es induïda pel medi aquàtic en el que el esperma és ejaculat. En teleostis marins la motilitat dels espermatozoides s'activa pel xoc osmòtic causat per l'exposició a l'aigua de mar. Aquest xoc hiperosmòtic augmenta la concentració intracel·lular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), que activa directament la maquinària del axonema, o mitjançant la fosforilació/desfosforilació de proteïnes de components estructurals del axonema depenent de Ca^{2+} /calmodulina o AMP cíclic (Zilli *et al.* 2012). En algunes espècies, l'augment de Ca^{2+} intracel·lular pot ocórrer com a conseqüència del transport de Ca^{2+} través de la membrana plasmàtica, tot i que fins a la data només un intercanviador invers $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ s'ha pogut demostrar en alguna espècie (Cerdà *et al.*, 2017). En altres casos, l'augment de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pot ser el resultat de l'estimulació de canals activats per estirament (SACs, del anglès *stretch-activated channels*) en resposta a canvis osmòtics o mecànics, o ser causat per l'alliberament de Ca^{2+} intracel·lular (Zilli *et al.*, 2012). No obstant això, els mecanismes osmòtics de membrana i iònics, així com les vies de transducció de senyals per l'activació i manteniment de la motilitat flagel·lar en espermatozoides marins són molt desconeguts. Aquest escenari es complica encara més pel fet que els mecanismes d'iniciació de la motilitat dels espermatozoides en teleostis marins són en molts casos específic de l'espècie (Zilli *et al.* 2012).

LOCALITZACIÓ DE LES ACUAPORINES EN EL ESPERMATOZOIDE DE PEIXOS

La resposta osmòtica dels espermatozoides de teleostis marins després de l'exposició a l'aigua de mar s'ha estimat que es dona en qüestió de mil·lisegons (Cosson *et al.* 2008). Aquest ràpid mecanisme suggereix la presència de acuaporines en la membrana plasmàtica de l'espermatozoide, i així facilitar un ràpid flux de sortida d'aigua seguint el gradient osmòtic. En conseqüència, en diferents espècies marines s'ha observat que el mercuri (típic inhibidor de acuaporines), en dosis que no tenen cap efecte sobre l'aparell axonemal dels espermatozoides, pot reduir la motilitat de l'esperma (Cosson *et al.*, 2008). En alguns teleostis d'aigua dolça, el mercuri també pot afectar la motilitat de l'esperma, però en d'altres, tot i que el HgCl_2 redueix la durada de la motilitat de manera dependent de la dosi, la baixa permeabilitat de la membrana plasmàtica dels espermatozoides suggereix l'absència de acuaporines (Boj *et al.*, 2015b). En els teleostis d'aigua dolça, cap estudi ha proporcionat evidències directes de la presència de les acuaporines en els espermatozoides, i per tant el paper d'aquests canals en l'activació dels espermatozoides d'aquestes espècies és incerta.

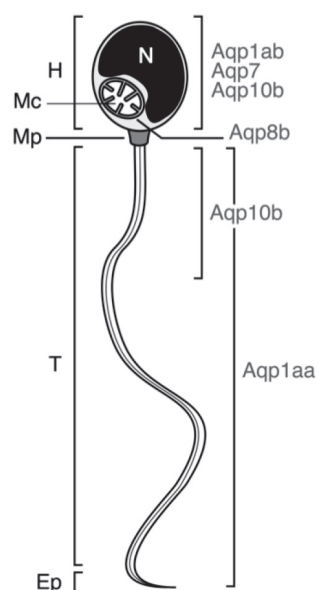


Figura 1. Localització de acuaporines en espermatozoides activats de dorada establerta mitjançant microscopia d'immunofluorescència amb anticossos específics. H, head (cap); Mc, mitochondria; Mp, midpiece (regió mitja); T, tail (cua); Ep, end piece (regió final).

En la dorada (*Sparus aurata*) experiments de immunofluorescència mitjançant anticossos específics han demostrat la presència de múltiples acuaporines en el

espermatozoide (Chauvigné *et al.*, 2013; Boj *et al.*, 2015a) (Figura 1). Així, en els espermatozoides ejaculats immòbils la Aqp1aa i -7 es troben en el flagell i el cap, respectivament, mentre que la Aqp1ab, -8bb i -10b estan en el cap i la cua anterior. Durant l'activació la Aqp1ab i -10b s'acumulen en la membrana plasmàtica del cap i la cua anterior, i la Aqp8bb és ràpidament fosforilada i transportada al únic mitocondri del espermatozoide, mentre que la Aqp1aa i -7 romanen sense canvis. Aquesta redistribució suggereix que les acuaporines podrien exercir diferents papers en el transport d'aigua i soluts durant la iniciació i/o el manteniment de la motilitat dels espermatozoides.

PAPER DE LA AQP1AA DURANT L'ACTIVACIÓ DELS ESPERMATOZOIDES

En l'espermatozoide ejaculat de dorada, la Aqp1aa es distribueix al llarg de tot el flagell, i aquesta localització es manté sense canvis després de l'activació en aigua de mar. La persistència de la Aqp1aa en el flagell pot implicar una necessitat immediata d'aquest canal d'aigua per a l'activació de la motilitat. D'acord amb aquesta hipòtesi, s'ha observat que l'exposició dels espermatozoides de dorada al mercuri suprimeix completament la motilitat, i aquesta inhibició pot ser revertida per l'agent reductor β -mercaptoetanol (Zilli *et al.* 2009). El possible paper de la Aqp1aa en la activació de la motilitat ha estat re-avaluat recentment mitjançant anticossos específics per la Aqp1aa de dorada purificats per afinitat, que poden bloquejar la conductància de la Aqp1aa a l'aigua en oòcits de granota (Boj *et al.*, 2015a). Aquests experiments han demostrat que la inhibició immunològica de la Aqp1aa induïx una forta disminució de la motilitat, la progressió i el moviment flagel·lar dels espermatozoides, el que reforça la idea que la Aqp1aa és essencial per iniciar la motilitat.

En teleosts marins, la activació de canals de Ca^{2+} o K^{+} pot no ser necessària per a la iniciació de la motilitat flagel·lar, ja que els espermatozoides poden ser activats en solucions no iònics, i s'ha vist que diversos inhibidors de canals iònics no tenen cap efecte sobre la motilitat (Zilli *et al.* 2008; Boj *et al.* 2015b). En la dorada es creu que l'augment de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en els espermatozoides durant l'activació és el resultat del increment de la concentració citosòlica a causa del flux de sortida massiva d'aigua després del xoc hiperosmòtic i/o per l'alliberament de Ca^{2+} intracel·lular (Zilli *et al.* 2012; Boj *et al.*, 2015b). En presència del anticòs contra la Aqp1aa s'inhibeix l'elevació del $[\text{Ca}^{2+}]_i$, i aquest efecte s'inverteix per l'exposició dels espermatozoides a un ionòfor de Ca^{2+} (A23187) que restaura els nivells de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i la motilitat (Figura 2). Per tant, aquestes dades proporcio-

nen més suport per al model actual d'activació dels espermatozoides de dorada, on el ràpid flux de sortida d'aigua a través de la Aqp1aa en resposta al xoc osmòtic eleva el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que activa el moviment flagel·lar (Boj *et al.*, 2015b).

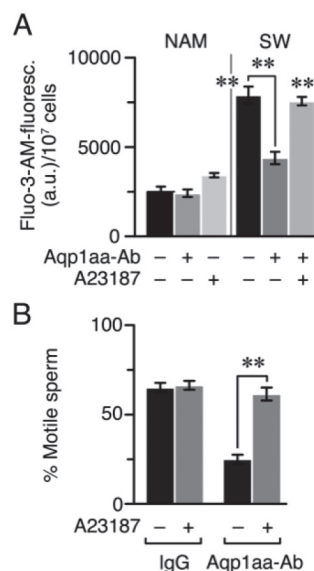


Figura 2. Determinació de Ca^{2+} intracel·lular (A) i la motilitat (B) en espermatozoides immòbils i activats en presència o absència d'un anticòs contra Aqp1aa (Aqp1aa-Ab) i/o el ionòfor A23187. NAM (del anglès, *non-activating medium*); SW (del anglès, *seawater*). **, $P < 0,01$, respecte als espermatozoides en NAM o com s'indica amb parèntesi quadrat. Les dades són de Boj *et al.* (2015a).

LA AQP8BB I LA BIOENERGÈTICA DE LA MOTILITAT FLAGEL·LAR

Durant l'activació dels espermatozoides de la dorada la Aqp8bb, que es troba prèviament al llarg del flagell anterior i en vesícules que envolten el nucli, és ràpidament (és a dir, en menys d'un segon després de l'activació) fosforilada i s'insereix en la membrana interna del únic mitocondri del espermatozoide (Chauvigné *et al.*, 2015). Molts paràlegs d'acuaporina, incloent la Aqp8bb de la dorada, poden transportar espècies d'oxigen reactives (ROS, del anglès *reactive oxygen species*) com ara el peròxid d'hidrogen (H_2O_2), a més d'aigua (Cerdà *et al.*, 2017). Com la fosforilació oxidativa mitocondrial sembla ser una important font d'ATP en els espermatozoides de peix durant la fase de la motilitat (Boj *et al.*, 2015b), es possible que el H_2O_2 produït com un subproducte durant la fosforilació oxidativa, així com el que s'acumula a la mitocondria a causa del estrès hiperosmòtic, podrien ser transportats fora d'aquest compartiment a través de l'Aqp8bb. Per comprovar aquesta hi-

pòtesi, es va fer servir un anticòs purificat per afinitat específic per l'Aqp8bb de dorada que bloqueja el transport intracel·lular del canal en els espermatozoides, possiblement a través de la inhibició estèrica del mecanisme de trànsit, així com la seva permeabilitat un cop inserit en la mitocondria. Quan el trànsit mitocondrial i l'activitat de l'Aqp8bb es bloquegen immunològicament en espermatozoides activats, els nivells de H_2O_2 s'acumulen en el mitocondri, el que condueix a la despolarització de la membrana mitocondrial, la reducció de la producció d'ATP i la ràpida detenció de la motilitat de l'esperma (Figura 3). Aquesta inhibició es reverteix completament en presència d'un antioxidant mitocondrial.

El descobriment de la funció fisiològica de l'Aqp8bb en l'espermatozoide de dorada revela la funció d'aquest canal més enllà del transport d'aigua. Així, en espermatozoides activats l'Aqp8bb opera com una peroxiporina mitocondrial per permetre el flux de sortida de H_2O_2 acumulat, mantenint d'aquesta manera el potencial de la membrana mitocondrial i la producció d'ATP necessari per al manteniment de la motilitat (Chauvigné *et al.*, 2015). Això indica per tant que la Aqp8bb mitocondrial possiblement juga un paper essencial per millorar l'estrès oxidatiu per ROS en els espermatozoides acti-

vats i així preservar la motilitat en condicions hipertòniques. Recentment s'ha observat que un ortòleg de la AQP8 també s'acumula en la mitocondria dels espermatozoides activats del salmó de l'Atlàntic (*Salmo salar*) (Chauvigné *et al.*, dades no publicades), el que suggereix que el mecanisme de desintoxicació per AQP8 en els espermatozoides dels teleostis pot haver evolucionat com un avantatge selectiu per augmentar la competència espermàtica (Chauvigné *et al.* 2015).

REGULACIÓ COORDINADA DE LES ACUAPORINES

Les vies de senyalització i mecanismes intracel·lulars que regulen el trànsit de l'Aqp8bb al mitocondri durant l'activació dels espermatozoides de peixos són desconeguts. En la dorada, però, s'ha trobat que la inhibició de la funció de l'Aqp1aa redueix l'acumulació de l'Aqp8bb en el mitocondri, i aquest efecte pot ser revertit amb el ionòfor de Ca^{2+} A23187 (Boj *et al.* 2015a). Aquestes observacions suggereixen el paper coordinat de l'Aqp1aa i -8bb durant l'activació dels espermatozoides de dorada (Figura 4). En aquest model l'augment de $[Ca^{2+}]$ i facilitat per l'Aqp1aa exerceix un doble pa-

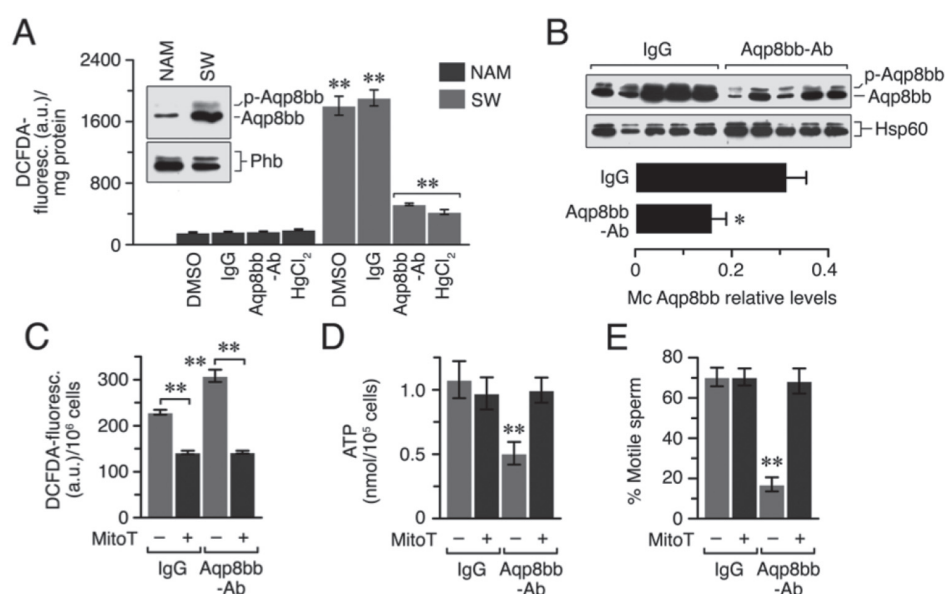


Figura 3. (A) Transport de H_2O_2 en mitocondries aïllades en presència de 0,5% de DMSO, 0,3 μ M IgG (control) o anticòs contra Aqp8bb (Aqp8b-Ab), o 10 μ M mercuri. El insert mostra un immunoblot per Aqp8bb de les mitocondries de espermatozoides immòbils i mòbils, on s'indiquen els monòmers Aqp8bb fosforilats (p-Aqp8bb) i desfosforilats. La Prohibitina b (Phb) es va utilitzar com a control. **, $P < 0,01$, respecte a les mitocondries de espermatozoides en NAM, o respecte a mitocondries tractades amb DMSO o IgG (en parèntesis quadrats). (B) Western blot que mostra la inhibició de la acumulació de Aqp8bb en la mitocondria de espermatozoides tractats amb IgG o Aqp8bb-Ab, usant la proteïna de xoc tèrmic 60 (Hsp60) com a control. *, $P < 0,05$. (C-E) Nivells de H_2O_2 (C) ATP (D) i motilitat (E) de espermatozoides activats en presència de IgG o Aqp8bb-Ab i del antioxidant mitocondrial MitoTempo (MitoT). *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$, respecte als espermatozoides tractats amb IgG, o com s'indica en parèntesi.

per, mitjançant l'activació de la motilitat flagel·lar a través de l'estimulació de l'axonema així com el mecanisme de desintoxicació mitocondrial per Aqp8bb.

Recentment les vies moleculars implicades en el control del transport de l'Aqp8bb al mitocondri han començat a ser investigades. En estudis inicials s'ha investigat el possible paper de proteïnes quinasas activades per mitògens (MAPK) que responen a estímuls d'estrès en el control del transport de Aqp8bb a la mitocondria. Utilitzant diferents inhibidors i activadors de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), p38 MAPK i glicogen sintasa quinasa 3 (GSK3) hem vist que les vies de senyalització de la JNK i GSK3 poden controlar el transport mitocondrial de la Aqp8bb (Figura 5). Així mateix hem detectat que la incubació de espermatozoides no activats amb el ionòfor de Ca^{2+} A23187 en presència de Ca^{2+} extern pot induir la fosforilació de l'Aqp8bb i la seva acumulació en la mitocondria, un procés que es pot prevenir amb un inhibidor de la proteïna quinasa C (PKC). A més, hem observat que tant la incubació d'espermatozoides immòbils amb generadors de ROS in vitro, com l'activació dels espermatozoides en aigua de mar en presència d'un quelant de Ca^{2+} , promouen el transport mitocondrial de l'Aqp8bb. Això suggereix que els nivells intracel·lulars de Ca^{2+} i ROS, són senyals primàries independents que regulen el mecanisme de desintoxicació per Aqp8bb, possiblement a través de les vies de la PKC/GSK3 i JNK, respectivament.

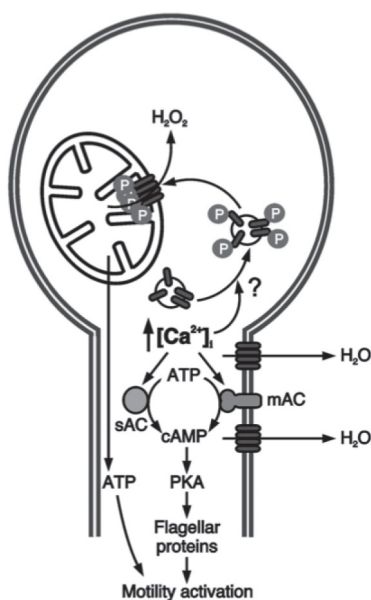


Figura 4. Model de la funció coordinada de l'Aqp1aa i -8bb durant l'activació de la motilitat dels espermatozoides. El xoc hiperosmòtic desencadena el flux de sortida d'aigua a través de l'Aqp1aa flagel·lar, que provoca una reducció del volum cel·lular i l'augment de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Això pot conduir a l'activació de l'adenilat ciclasa de la membrana i soluble (mAC i sAC,

respectivament) i de la ruta de senyalització d'AMPC/PKA (que activa la fosforilació de les proteïnes del axonema i la motilitat). Els nivells de Ca^{2+} , a través d'una via encara desconeguda, poden també induir la ràpida fosforilació de l'Aqp8bb i el seu transport al mitocondri. L'Aqp8bb inserida en la membrana interna mitocondrial pot permetre el flux de sortida de peròxid d'aquest compartiment per evitar el dany oxidatiu durant la síntesi d'ATP, i mantenir així la motilitat.

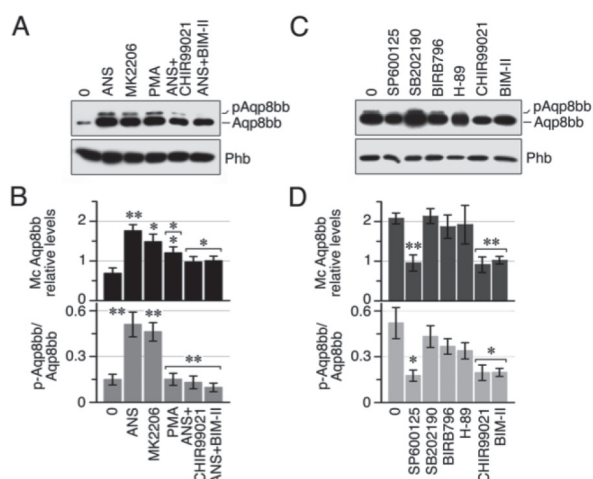


Figura 5. Efecte de moduladors de la ruta de MAPK en la translocació de Aqp8bb a la mitocondria dels espermatozoides. (A-B) En medi no activant, la traslocació de Aqp8bb és potenciada per un activador de la JNK (anisomicina; ANS), i en menor mesura per un activador de la PKC (PMA), i per un inhibidor de la PKB (MK2206) que activa la GSK3. L'acumulació de Aqp8bb en les mitocondries induïda amb ANS es redueix amb inhibidors de la PKC (BIM-II) i GSK3 (CHIR99021). (C-D) Durant l'activació, els inhibidors de JNK (SP600125), PKC i GSK3 bloquegen el trànsit de l'Aqp8bb a la mitocondria, mentre que, els inhibidors de PKA (H89) i p38 MAPK (SB2020190 i BIRB796) no tenen efecte.

CONCLUSIONS

Les dades actuals demostren que les acuaporines de teleostis marins han evolucionat per exercir múltiples funcions fisiològiques en les cèl·lules germinals masculines. Això inclou la inserció de canals Aqp1aa a la membrana flagel·lar del espermatozoide per activar la motilitat, així com la especialització de l'Aqp8bb per funcionar com un canal de H_2O_2 mitocondrial en espermatozoides activats. Aquests descobriments representen importants avenços en la nostra comprensió de les funcions de les acuaporines en les cèl·lules germinals de teleostis. No obstant això, les dades actuals es limiten principalment a una sola espècie de teleosti marí, com la dorada, i no es coneix per tant si les acuaporines poden tenir una funció fisiològica en altres llinatges de peixos. A més, la funció d'altres paral·logs d'acuaporines presents en el sperma-

tozoide de la dorada, com les Aqp1ab, -7 i -10b, encara no s'ha dilucidat. Finalment, els mecanismes moleculars que governen el trànsit intracel·lular de les acuaporines en els espermatozoides de teleostis romanen encara molt desconeguts. Tot aquest nou coneixement serà per tant fonamental per a comprendre la rellevància biològica de les acuaporines durant el desenvolupament i la funció dels espermatozoides de peixos.

AGRAÏMENTS

Aquesta recerca ha estat finançada per el Ministeri d'Economia i Competitivitat espanyol (AGL2010-15597 i AGL2013-41196-R), Generalitat de Catalunya (2009 SGR 01050 i 2014 SGR 1351), i el Consell d'Investigació de Noruega (224816/E40 i 254872/I40).

REFERÈNCIES

- Boj M, Chauvigné F, Cerdà J (2015a) Coordinated action of aquaporins regulates sperm motility in a marine teleost. *Biol Reprod* 93(2), 40.
- Boj M, Chauvigné F, Cerdà J (2015b) Aquaporin biology of spermatogenesis and sperm physiology in mammals and teleosts. *Biol Bull* 229, 93-108.
- Cerdà J, Finn RN (2010) Piscine aquaporins: an overview of recent advances. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 313, 623-650.
- Cerdà J, Chauvigné F, Finn RN (2017) The physiological role and regulation of aquaporins in teleost germ cells. *Adv Exp Med Biol* 969, 149-171.
- Chauvigné F, Boj M, Vilella S, Finn RN, Cerdà J (2013) Subcellular localization of selectively permeable aquaporins in the male germ line of a marine teleost reveals spatial redistribution in activated spermatozoa. *Biol Reprod* 89, 37.
- Chauvigné F, Boj M, Finn RN, Cerdà J (2015) Mitochondrial aquaporin-8-mediated hydrogen peroxide transport is essential for teleost spermatozoon motility. *Sci Rep* 14, 7789.
- Cosson J, Groison AL, Suquet M, Fauvel C, Dreanno C, Billard R (2008) Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers. *Reproduction* 136, 277-294.
- Madsen SS, Engelund MB, Cutler CP (2015) Water transport and functional dynamics of aquaporins in osmoregulatory organs of fishes. *Biol Bull* 229, 70-92.
- Marshall WS, Grosell M (2006) Ion transport, osmoregulation and acid-base balance. In: D.H. Evans and J.B. Claiborne (eds) *The Physiology of Fishes*, 3rd edn, CRC Press, BocaRaton, pp 177-230.
- Zilli L, Schiavone R, Storelli C, Vilella S (2008) Molecular mechanisms determining sperm motility initiation in two sparids (*Sparus aurata* and *Lithognathus mormyrus*). *Biol Reprod* 79, 356-366.
- Zilli L, Schiavone R, Chauvigné F, Cerdà J, Storelli C, Vilella S (2009) Evidence for the involvement of aquaporins in sperm motility activation of the teleost gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biol Reprod* 81, 880-888.
- Zilli L, Schiavone R, Storelli C, Vilella S (2012) Molecular mechanism regulating axoneme activation in marine fish: a review. *Int Aquatic Res* 4, 2.

RELACIÓN DE LAS ACUAPORINAS 3, 7, Y 11 CON LA CRIOTOLERANCIA EN EL ESPERMATOZOIDE EQUINO

Sebastián Bonilla-Correal^{1, 2, *}, Federico Noto¹, Estela Garcia-Bonavila³, Joan E. Rodriguez-Gil¹, Marc Yeste³, Jordi Miro¹

¹Departament de Medicina i Cirurgia Animal, Universitat Autònoma de Barcelona

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Antonio Nariño, Colombia

³Biotechnologia de la Reproducció Animal i Humana (TechnoSperm), Departament de Biologia, Universitat de Girona

*sebastian.bonilla@e-campus.uab.cat

Resumen

Estudios previos han demostrado que las acuaporinas 3 (AQP3), 7 (AQP7) y 11 (AQP11) están presentes en los espermatozoides de ratón, humano, bovino y porcino y juegan un papel relevante en la resistencia de estas células a la criopreservación. En este trabajo, se determinó, en primer lugar, si dichas proteínas se hallaban en el espermatozoide de equino. En segundo lugar, se estudió si los niveles relativos de cada una de estas acuaporinas en el semen fresco estaban relacionados con la criotolerancia espermática, evaluada sobre la base de la motilidad y la viabilidad espermáticas después de la descongelación. De un lado, se observó que las tres acuaporinas estaban presentes en el espermatozoide equino. Por otra parte, se establecieron dos grupos de eyaculados según su criotolerancia y se observó que los eyaculados de elevada congelabilidad (GFE) presentaban unos niveles significativamente superiores de AQP3 y AQP11 en comparación con los de baja congelabilidad (PFE). En conclusión, este estudio ha confirmado la presencia de las acuaporinas 3, 7 y 11 en el espermatozoide de caballo y se ha demostrado que la AQP3 y la AQP11 están relacionadas con su criotolerancia.

Palabras clave: espermatozoide, AQP3, AQP7, AQP11, criopreservación, equino.

Abstract

Previous studies performed have demonstrated that aquaporins 3 (AQP3), 7 (AQP7) and 11 (AQP11) are present in mouse, human, pig and cattle sperm and play a pivotal role for their resilience to withstand freeze-thawing procedures (cryotolerance or freezability). Against this background, the current study aimed at a) determining the presence of these three proteins in stallion sperm and, b) studying the relationship of their relative abundance in fresh semen with sperm cryotolerance, evaluated as motility and viability at post-thawing. On the one hand, the three proteins were found to be present in stallion sperm by immunoblotting. On the other hand, and after establishing two groups of ejaculates based upon their sperm cryotolerance (good, GFE, and poor freezability ejaculates, PFE), relative AQP3- and AQP11-content in stallion fresh semen was found to be significantly higher in GFE than in PFE. In conclusion, the current study has confirmed the presence of AQP3, AQP7 and AQP11 in stallion sperm, and has also demonstrated that AQP3 and AQP11 are involved in their cryotolerance.

Key words: sperm, AQP3, AQP7, AQP11, cryopreservation, equine.

INTRODUCCIÓN

Las acuaporinas son proteínas transmembrana involucradas en el tránsito de agua y pequeños solutos (Agre 2004; Sales et al., 2013). Hay tres grupos diferentes de acuaporinas que se distinguen por su permeabilidad al agua y a otros solutos y por su secuencia de aminoácidos (Agre et al., 2002; Ishibashi et al., 2009). Las acuaporinas se han encontrado en varios tejidos y órganos y también en el tracto reproductivo tanto de machos como hembras de diferentes especies (Thoroddsen et al.,

2011). En lo que concierne a los espermatozoides, estudios previos han hallado las acuaporinas 3 (AQP3), 7 (AQP7) y 11 (AQP11) en varias especies: ratón, humano, porcino y bovino (Yeung et al., 2009; 2010; Prieto-Martínez et al., 2015, 2016a; 2016b).

Con todo, el interés de estas proteínas no sólo radica en su función fisiológica como transportadores de agua sino también en su potencial implicación en la criotolerancia, dada la relevancia del tráfico del agua y los crioprotectores permeables (como el glicerol). Dado que no se ha llevado a cabo ningún estudio sobre la presencia

de las acuaporinas en el espermatozoide de caballo, el presente trabajo tuvo como objetivos: a) determinar la presencia de las AQP3, AQP7 y AQP11 en el espermatozoide de caballo, y b) estudiar la relación de los contenidos relativos de dichas proteínas en el semen fresco y la criotolerancia de dicho espermatozoide.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

Excepto en los casos en los que no se indique de otro modo, los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EE.UU.) y los fluorocromos de Molecular Probes/Invitrogen (Eugene, Oregon, EE.UU.).

Muestras seminales

Se utilizaron un total de cinco eyaculados de sementales sanos de pura raza española estabulados en el Servicio de Reproducción Equina de la Universidad Autónoma de Barcelona. Dichos sementales fueron alimentados con heno y concentrado comercial para caballos y agua *ad libitum*. El semen fue extraído con vagina artificial tipo Hannover y congelado con crioprotector (Botucio, Sao Paulo, Brasil) en pajuelas de 0,5 ml usando un bio-congelador (Ice-Cube programmable freezer; Minitub Ibérica, Tarragona). Antes de la congelación de las muestras se tomó una alícuota que se utilizó para la extracción de proteínas y el análisis por Western blot subsecuentes.

Extracción de proteínas y Western blot

La alícuota destinada a la extracción de proteínas se centrifugó a 600×g durante 10 min a 4°C. Este pellet fue después resuspendido con 400 µl de tampón de lisis compuesto por SDS (2%), Triton X-100 (1%), Urea (8 M), DTT (2 mM), Tween 20 (0,5%), Tris-HCl (50 mM), cóctel inhibidor de proteasas (1%), PMSF (0,1 M) y ortovanadato de sodio (700 mM). Después de la resuspensión fue sonificado tres veces con 5 pulsos cada 2 minutos (SONO-PLUS ultrasonic homogenizer HD 2070; Bandelin, Berlin, Germany). Seguidamente, la muestra se centrifugó a 10.000×g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue meticulosamente colectado y cuantificado mediante el kit DC Protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA EE.UU.).

Para la separación con electroforesis en gel de poliacrilamida y sulfato dodecil de sodio (SDS-PAGE), se utilizaron 10 µg de proteína total para cada muestra. Antes de la electroforesis, las muestras y el marcador

molecular fueron hervidos a 90°C durante cinco minutos y cargados en el gel. El gel separador contuvo 12 % de acrilamida, y el apilador 5%.

Después de correr el gel durante aproximadamente 90 minutos, las bandas de proteína fueron transferidas en membranas de polivinilideno fluorado (MB) durante 2 horas a 120 mA. Finalmente, las membranas se incubaron con solución de bloqueo y agitadas (5% BSA en TBS 1×) a 4°C durante toda la noche.

Las membranas bloqueadas se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios: Anti-Aquaporin 3 antibody ab 125219 (Abcam® PLC, Cambridge, Massachusetts, EE.UU.) en dilución 1:300; Aquaporin-7 Antibody (NBP1-30862 novus biologicals, Littleton, Colorado, EE.UU.) en dilución 1:1000; y AQP11 antibody (orb36094 Biorbyt, Cambridge, Reino Unido) en dilución 1:300 en solución de bloqueo durante una hora y con agitación. Seguidamente, se realizaron tres lavados de las membranas de cinco minutos cada uno. Después fueron incubadas con horseradish peroxidase (HRP)-conjugated polyclonal anti-rabbit immunoglobulin (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca) durante una hora a diferentes diluciones: AQP3 (1:4000), AQP7 (1:10000) y AQP11 (1:5000).

Posteriormente, cada membrana se lavó cinco veces (cinco minutos cada lavado). Las bandas reactivas fueron visualizadas con sustrato de quimioluminiscencia (Immobilon Western Detection Reagent; Milipore, Alemania), un sistema de imagen quimioluminiscencia Syngene y un software de adquisición de la imagen Genesys (Synoptics Limited, Cambridge, Reino Unido). Se identificaron para cada acuaporina, dos bandas proteicas (una a 30 kDa y otra a 60 kDa), que fueron escaneadas y cuantificadas mediante el software Quantity One Software (Version 4.6.2; Bio-Rad). Los valores se expresaron como la intensidad de la señal dentro de los límites de la banda evaluada en número de píxeles (densidad, mm²). La señal de fondo fue evitada y la baja intensidad de píxel fue considerada como 0 (blanco; Vilagran et al., 2013). La α -tubulina fue usada para normalizar el contenido relativo de cada AQP.

Motilidad y viabilidad espermáticas

La motilidad espermática fue evaluada usando un sistema de análisis computerizado (CASA) y la viabilidad espermática fue determinada mediante citometría de flujo, sobre la base de la integridad de la membrana espermática (SYBR 14/yoduro de propidio (IP) a las 0 y 2 horas después de la descongelación (incubación a 37°C). En este último caso se utilizó el kit LIVE/DEAD y los espermatozoides verdes (SYBR14+/IP-) se consideraron viables y los rojos (SYBR14+/IP+) y naranjas (SYBR14+/IP+) se consideraron como no viables. Se

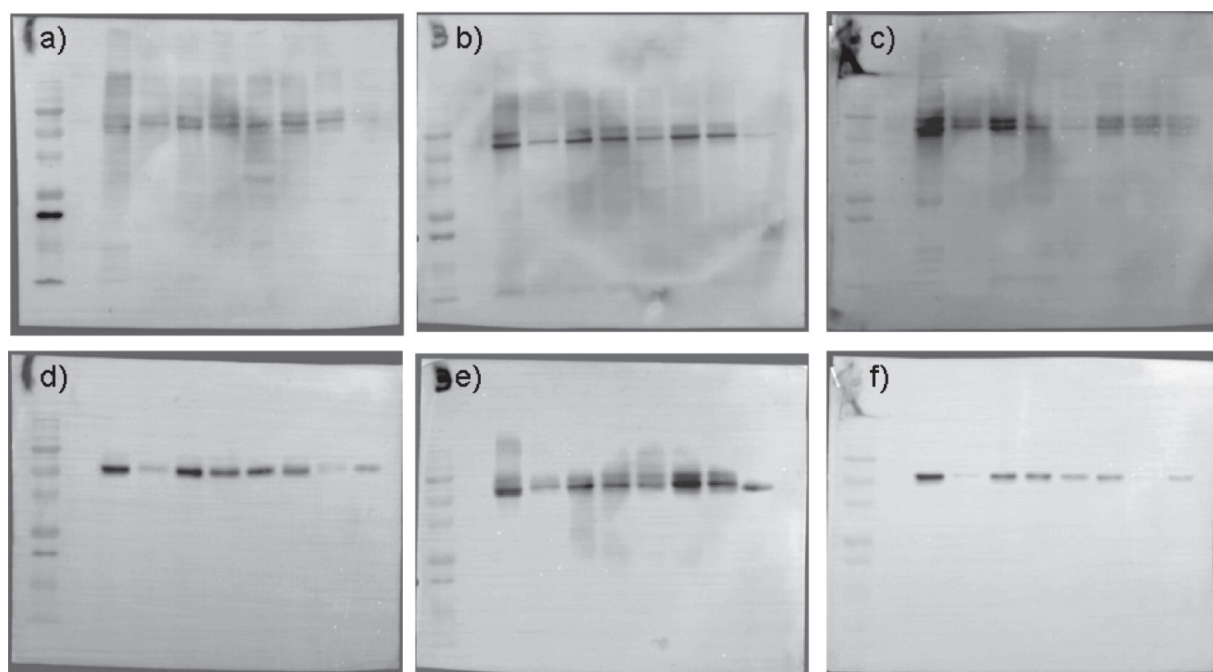


Figura 1 Inmunoblots representativos de las tres acuaporinas: AQP3 (a), AQP7 (b) y AQP11 (c), junto con sus respectivos resultados de stripping y revelado con α -tubulina (d, e y f). En todas las acuaporinas, se observaron bandas a 30 kDa y 60 kDa, siendo la segunda la más importante.

evaluaron tres réplicas de cada muestra y en cada caso se analizaron 10.000 espermatozoides (eventos).

Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis estadístico se utilizó un paquete estadístico (IBM SPSS 21.0 para Windows; IBM, Chicago, Illinois, EE.UU.). Se comprobaron la normalidad y la homogeneidad de varianzas y se estableció una clasificación de eyaculados mediante análisis de clústeres en dos fases y con la distancia logarítmica como medida de similitud. Los parámetros que se utilizaron fueron la motilidad y la viabilidad espermáticas después de descongelar (0h y 2h). Una vez establecidos los dos grupos de eyaculados según la congelabilidad (GFE y PFE), se compararon los niveles relativos de AQP3, AQP7 y AQP11 entre ellos mediante un test *t* de medidas independientes. El nivel de significación se estableció en $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

Presencia de las acuaporinas AQP3, AQP7 y AQP11

Mediante los inmunoblots para AQP3, AQP7 y AQP11, se confirmó la presencia de estas tres proteínas en el

semen fresco de caballo, tal y como muestra la Figura 1. En todos los casos se observaron banda a 30 y 60 kDa, siendo la densidad de la segunda superior a la de la primera.

Clasificación de los eyaculados según su congelabilidad

De los 5 eyaculados analizados, 3 resultaron ser buenos congeladores (GFE) y 2 fueron malos congeladores (PFE). La Tabla 1 muestra las medias $\pm$ los errores estándar de la media (SEM) para la viabilidad y la motilidad espermáticas inmediatamente después de descongelar (0h) y a las 2h post-descongelación.

Tabla 1 Viabilidad y motilidad total de los espermatozoides en los eyaculados de alta (GFE) y baja (PFE) congelabilidad inmediatamente después de su descongelación (0h) y después de incubar a 37°C durante 2h.

Parámetro	Tiempo	GFE	PFE
Viabilidad espermática	0h	29,4 $\pm$ 2,1	14,7 $\pm$ 1,6
	2h	20,3 $\pm$ 2,7	4,1 $\pm$ 2,3
Motilidad espermática total	0h	29,6 $\pm$ 2,6	13,9 $\pm$ 2,7
	2h	14,1 $\pm$ 2,9	4,7 $\pm$ 0,3

Relación entre la congelabilidad y los niveles relativos de AQP3, AQP7 y AQP11

La Figura 2 muestra (como media $\pm$ SEM) los niveles relativos de ambas bandas identificadas (30 y 60 kDa) para cada acuaporina (AQP3, AQP7 y AQP11) y para los eyaculados de buena (GFE) y mala congelabilidad (PFE).

En el caso de las bandas de 30 kDa, cuyas densidades, como se ha apuntado previamente, fueron inferiores a las de 60 kDa, solo se observaron diferencias significativas en el caso de la AQP11. Por otra parte, y en lo que concierne a las bandas de 60 kDa, los eyaculados de buena congelabilidad presentaron niveles relativos de AQP3 y AQP11 superiores a los de mala congelabilidad ($P < 0.05$). En el caso de la AQP7, no se observaron diferencias significativas.

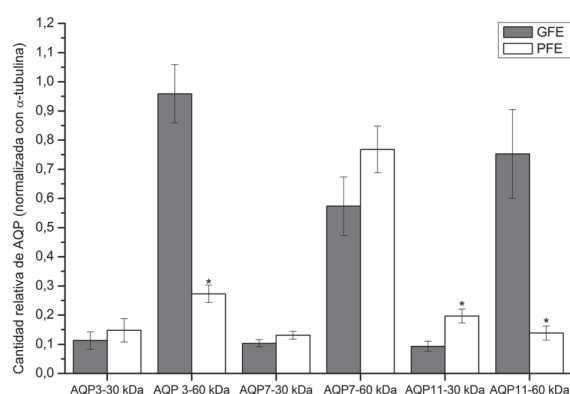


Figura 2 Cantidad relativa (normalizada con α -tubulina; media $\pm$ SEM) de las bandas de 30 kDa y 60 kDa de AQP3, AQP7 y AQP11 en los eyaculados de buena (GFE) y mala congelabilidad (PFE). El asterisco (*) indica diferencias significativas ($P < 0.05$) entre GFE y PFE.

DISCUSIÓN

Las acuaporinas juegan un papel fundamental para el tránsito del agua y otros solutos, incluidos los crioprotectores permeables como el glicerol (Agre *et al.*, 2002). En este trabajo, se reporta, por primera vez, la presencia de las acuaporinas 3, 7 y 11 en el espermatozoide equino. Hay que destacar que en todos los casos se observaron dos bandas, una de 30 kDa y otra de 60 kDa, lo que sugiere la presencia de formas diméricas o de agregados de dichas proteínas después de la extracción. En cualquier caso, es importante mencionar aquí que la especificidad de los anticuerpos utilizados fue verificada mediante péptidos de bloqueo en estudios previos del grupo de investigación (Prieto-Martínez *et al.*, 2014; 2015; 2016).

Por otra parte, se ha determinado que los eyaculados buenos y malos congeladores difieren en sus niveles relativos de AQP3 y AQP11. Ello sugiere que la mayor presencia de estas proteínas en el espermatozoide equino le confiere una mayor resistencia a la criopreservación. En cambio, los niveles relativos de AQP7 no difieren entre grupos de congelabilidad. Estos resultados están de acuerdo, en parte, con lo obtenidos en porcino y bovino, pues la AQP3 ha sido identificada como marcador de congelabilidad en porcino (Prieto-Martínez *et al.*, 2015) y la AQP11 en bovino (Prieto-Martínez *et al.*, 2016b). Sin embargo, mientras que estudios previos han reportado que los niveles relativos de AQP7 en semen fresco están relacionados con la congelabilidad del semen de porcino y bovino (Prieto-Martínez *et al.*, 2016a; 2016b), no se han hallado diferencias entre GFE y PFE en este estudio. Dicho esto, hay que mencionar que se observó una tendencia a favor de los PFE. Con todo, y dado que el tamaño muestral de este estudio es bajo, hace falta replicar el presente diseño experimental en un mayor número de casos para confirmar estos resultados que, aún, tienen carácter preliminar.

En conclusión, en este trabajo se ha demostrado, por primera vez, que las AQP3, AQP7 y AQP11 se encuentran en el espermatozoide de caballo. Además, los primeros resultados indican que hay una relación entre los niveles relativos de AQP3 y AQP11 y la criotolerancia del espermatozoide equino. Estudios futuros deben ampliar el universo muestral, incluyendo más réplicas biológicas, y deben también contemplar ensayos de inmunolocalización para estas tres proteínas.

REFERENCIAS

- Agre, P. (2004). Aquaporin water channels (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 43, p. 4278-4290.
- Agre, P.; King, L.S.; Yasui, M.; Guggino, W.B.; Ottersen, O.P.; Fujiyoshi, Y.; Engel, A.; Nielsen, S. (2002). Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol*, vol. 542, p. 3-16.
- Ishibashi, K.; Hara, S.; Kondo, S. (2009). Aquaporin water channels in mammals. *Clin Exp Nephrol*, vol. 13, p. 107-117.
- Prieto-Martínez, N.; Morató, R.; Vilagran, I.; Rodríguez-Gil, J.E.; Bonet, S.; Yeste, M. (2015). Aquaporins in boar spermatozoa. Part II: detection and localization of Aquaglyceroporin 3. *Reprod Fertil Dev*, doi: 10.1071/RD15164.
- Prieto-Martínez, N.; Vilagran, I.; Morató, R.; Rodríguez-Gil, J.E.; Yeste, M.; Bonet, S. (2016a). Aquaporins 7 and 11 in boar spermatozoa: detection, loca-

- lization and relationship with sperm quality. *Reprod Fertil Dev* vol. 28, p. 663-672.
- Prieto-Martínez, N.; Morató, R.; Muiño, R.; Hidalgo, C.O.; Rodríguez-Gil, J.E.; Bonet, S.; Yeste, M. (2016b). Aquaglyceroporins 3 and 7 in bull spermatozoa: identification, localisation and their relationship with sperm cryotolerance. *Reprod Fertil Dev*, doi:10.1071/RD16077.
- Sales, A.D.; Lobo, C.H.; Carvalho, A.A.; Moura, A.A.; Rodrigues, A.P.R. (2013). Structure, function and localisation of aquaporins: their possible implications on gamete cryopreservation. *Gene. Mol Res*, vol. 12, p. 6718-6732.
- Throddsen, A.; Dahm-Kahler, P.; Lind, A.K.; Weijdegard, B.; Lindenthal, B.; Müller, J.; Brannstrom, M. (2011). The water permeability channels aquaporins 1-4 are differentially expressed in granulosa and theca cells of the preovulatory follicle during precise stages of human ovulation. *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 96, p. 1021-1028.
- Vilagran, I.; Castillo, J.; Bonet, S.; Sancho, S.; Yeste, M.; Estanyol, S.M.; Oliva, R. (2013). Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. *Theriogenology*, vol. 80, p. 443-450.
- Yeste, M.; Estrada, E.; Rocha, L.G.; Marin, H.; Rodríguez-Gil, J.E.; Miró, J. (2014). Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology*, vol. 3, p. 395-407.
- Yeung, C.H.; Callies, C.; Rojek, A.; Nielsen, S.; Cooper, T.G. (2009). Aquaporin isoforms involved in physiological volume regulation of murine spermatozoa. *Biol Reprod*, vol. 80, p. 350-357.
- Yeung, C.H.; Callies, C.; Tüttelmann, F.; Kliesch, S.; Cooper, T.G. (2010). Aquaporins in the human testis and spermatozoa - identification, involvement in sperm volume regulation and clinical relevance. *Int J Androl*, vol. 33, p. 629-641.

IMPLICACIÓ DEL CANAL ANIÒNIC DEPENDENT DE VOLTATGE (VDAC2) EN LA CAPACITACIÓ *IN VITRO* I LA REACCIÓ ACROSÒMICA INDUÏDA AMB PROGESTERONA DE L'ESPERMATOZOIDE DE PORCÍ

Sandra Martínez-Abad^{1,*}, Beatrice Gadani¹, Joan E. Rodríguez-Gil², Sergi Bonet¹, Marc Yeste^{1,*}

¹Biotecnologia de la Reproducció (TechnoSperm), Departament de Biologia. Universitat de Girona.

²Departament de Medicina i Cirurgia Animal, Universitat Autònoma de Barcelona

*sandra.ma@gmail.com, marc.yeste@udg.edu

Resum

Els canals iònics tenen un paper fonamental durant la capacitació espermàtica. A banda dels canals CatSper, l'espermatozoide té altres canals iònics, el paper dels quals no és del tot conegut. En aquest treball, es va estudiar la implicació del canal iònic dependent de voltatge 2 (VDAC2) durant la capacitació de l'espermatozoide porcí. Amb aquest objectiu, els espermatozoides es van capacitar *in vitro* amb i sense presència de dos inhibidors diferents (erastina i olesoxime) a dues concentracions diferents (10 μ M i 100 μ M). La presència dels inhibidors va comportar, en ambdós casos, una reducció de la motilitat espermàtica tant total com progressiva. Tanmateix, mentre que la presència d'erastina 100 μ M va reduir el percentatge d'espermatozoides no capacitats, l'addició d'olesoxime va inhibir l'increment de la fluïdesa de membrana característic de la capacitació. Aquests resultats suggereixen que la VDAC2 està implicada en la regulació de la capacitació espermàtica, per bé que els mecanismes pels quals l'erastina i l'olesoxime duen a terme els seus efectes inhibitoris són diferents.

Paraules clau: espermatozoide, VDAC2, capacitació, erastina, olesoxime.

Abstract

Ion channels play a pivotal role for mammalian sperm capacitation. Although CatSperm channels are crucial for that process, the function of other ion channels that have identified in mammalian sperm still remains unknown. This work was based on the pig model and aimed at addressing whether voltage-dependent anion channel (VDAC2) was involved in sperm capacitation. With this purpose, boar spermatozoa were *in vitro* capacitated with or without the presence of two separate specific VDAC2-inhibitors (erastin and olesoxime) at two different concentrations (10 μ M and 100 μ M). Sperm motility was significantly decreased when the aforementioned inhibitors were present. However, while 100 μ M erastin reduced the proportion of uncapacitated sperm, adding the capacitation medium with 100 μ M olesoxime did not cause that decrease, which is a typical feature of sperm capacitation. While these results suggest that VDAC2 is involved in the regulation of sperm capacitation, they also indicate that the pathways through which erastin and olesoxime exert their VDAC2-inhibitory effects differ.

Key words: spermatozoa, VDAC2, capacitation, erastin, olesoxime.

INTRODUCCIÓ

La capacitació és un procés fisiològic molt complex que inclou els canvis moleculars necessaris perquè l'espermatozoide adquireixi la capacitat de fecundar l'òcit. Aquest procés es pot dividir en dos tipus d'esdeveniments: lents i ràpids (Yeste, 2013). Els esdeveniments ràpids s'inicien a l'ejaculació, gràcies a la presència de calci i bicarbonat al medi. Ambdós components són transportats a l'interior de la cèl·lula i activen una adenilat ciclasa soluble, la qual cosa incrementa els nivells intracel·lulars de d'AMP cíclic (cAMP). Aquest aug-

ment comporta l'activació de la proteïna quinasa dependent de cAMP (PKA) que, al seu torn, activa altres vies de senyalització necessàries per la capacitació espermàtica i la posterior reacció acrosòmica. (Visconti, 2009)

Els esdeveniments lents s'inicien quan l'espermatozoide arriba a la trompa de Fal·lopi o oviducte. En aquest moment, s'alteren els patrons de motilitat de l'espermatozoide (hiperactivació) i les membranes acrosòmica externa i plasmàtica es fusionen. La presència de l'albumina com a acceptor lipídic ajuda a eliminar el colesterol de la membrana i es produeix la fosforilació dels residus de tirosina d'algunes proteïnes

crucials, com la proteïna d'unió a l'acrosina (ACRBP, Visconti, 2009).

Els canal iònics involucrats en el transport del calci tenen una gran rellevància tant en els esdeveniments ràpids com en els lents. A més dels canals iònics CatSper, característics dels espermatozoides, hi ha d'altres proteïnes involucrades en el transport del calci. Una d'aquestes proteïnes és el canal aniònic dependent de voltatge 2 (VDAC2), recentment identificat a l'espermatozoide de mamífer (Vilagran *et al.*, 2014). La VDAC2 és una proteïna present a totes les cèl·lules eucariotes i es caracteritza per presentar llocs d'unió al calci i fer possible el flux d'aquest ió a través de la membrana (Kwon *et al.*, 2015). Mitjançant estudis d'immunolocalització, s'ha determinat que la VDAC2 no només està present a la membrana externa mitocondrial sinó que també es troba a les fibres denses del flagel i a l'acrosoma (Kwon *et al.*, 2013). La VDAC2 també està relacionada amb l'espermatoogènesi, la maduració espermàtica i la regulació de la motilitat espermàtica (Liu *et al.*, 2010). Tanmateix, i malgrat el seu interès, no s'han dut a terme estudis sobre el paper d'aquest canal iònic durant la capacitació espermàtica.

Així doncs, l'objectiu d'aquest estudi va ser determinar la implicació de la VDAC2 en la capacitació de l'espermatozoide de mamífer, emprant el model porcí. Amb aquest propòsit, els espermatozoides de porcí es van capacitar *in vitro* i la reacció acrosòmica es va induir amb progesterona. Això es va dur a terme en presència de dos inhibidors específics d'aquest canal: l'erastina i olesoxime (també conegut com a TRO19622). Ambdós inhibidors entren a la cèl·lula per difusió passiva i s'uneixen a la VDAC2, alterant el transport iònic a través d'aquest canal mitocondrial (Yagoda *et al.*, 2007; Bordet *et al.*, 2010). Com a paràmetres espermàtics, es van avaluar la motilitat i viabilitat espermàtiques, i el desordre lipídic de la membrana plasmàtica.

MATERIALS I MÈTODES

Animals i mostres

Es van utilitzar un total de 14 ejaculacions provinents de mascles sans, sexualment madurs i sense problemes de fertilitat. Aquest mascles estaven sotmesos a les mateixes condicions controlades de temperatura i alimentació. L'extracció del semen la va fer el personal tècnic de la granja (Gepork S.L., Roda de Ter, Barcelona), mitjançant el mètode de la mà enguantada i la munta sobre maniquí. La fracció rica de l'esperma es va filtrar amb una gasa per eliminar la fracció gelatinosa. Posteriorment, es va diluir amb medi MR-A (Kubus S.A., Madrid) i el volum resultant es va dividir en dosis seminals

de 90 mL (3×10^9 espermatozoides per dosi). Finalment, les dosis comercials es van refrigerar a 17°C i es van transportar al laboratori a la mateixa temperatura.

Capacitació espermàtica in vitro i reacció acrosòmica induïda per la progesterona

Per a la capacitació espermàtica, es van prendre 50 mL de dosi seminal i es van centrifugar a 600×g durant 5 min. El *pellet* es va resuspendre amb medi de capacitació (TALP). La composició del medi va ser la següent: 4,772 mg·mL⁻¹ Hepes, 6,552 mg·mL⁻¹ NaCl, 0,232 mg·mL⁻¹ KCl, 0,9 mg·mL⁻¹ Glucosa, 2,432 mg·mL⁻¹ L-Lactat, 0,112 mg·mL⁻¹ Piruvat sòdic, 0,1 mg·mL⁻¹ MgSO₄, 0,66 mg·mL⁻¹ CaCl₂, i 4,84 mg·mL⁻¹ albúmina sèrica bovina. El pH es va ajustar a 7,4. La capacitació espermàtica es va dur a terme durant 4 h a 38,5°C i 5% CO₂. A les 4h (240 min), es va induir la reacció acrosòmica amb progesterona (concentració final: 10 µg/mL; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Estats Units). Les mostres es van avaluar a 0, 120, 240, 270 i 300 min.

Inhibidors: erastina i olesoxime

Es van assajar, juntament amb el control, dues concentracions diferents (10 µM i 100 µM) d'erastina i olesoxime (TRO19622). Ambdós reactius es van obtenir de Sigma-Aldrich.

Citometria de flux

Tant la viabilitat espermàtica com el desordre lipídic de la membrana es van determinar amb un citòmetre de flux (Cell laboratory QuantaSC™; Beckman Coulter; Fullerton, Califòrnia, Estats Units). Les mostres es van excitar amb un làser d'argó (488 nm) a una potència de 22 mW, i es van utilitzar els sensors FL1 (DRLP: 550 nm, BP: 525 nm, detecció: 505-545 nm), i FL3 (LP: 670 nm, detecció: 670 ± 30 nm). Es van analitzar 10.000 cèl·lules per mostra i cada mostra es va avaluar tres vegades.

Viabilitat espermàtica

La viabilitat espermàtica es va determinar mitjançant un kit comercial (LIVE/DEAD®; Molecular Probes, Invitrogen; Eugene, Oregon, Estats Units) i els espermatozoides es van incubar amb SYBR-14 (concentració final: 100 µM) durant 10 min i després amb iodur de propidi (PI, concentració final: 12 µM) durant 5 minuts. Ambdues incubacions es van dur a terme a 38°C i en absència de llum. La fluorescència emesa pel SYBR va ser registrada amb el filtre FL1, mentre que el sensor FL3 va captar l'emesa pel PI.

Alteració dels lípids de membrana

Aquesta anàlisi es va dur a terme com a indicador de la capacitat espermàtica. Es van combinar dos fluorocroms, M540 i YO-PRO-1 (Molecular Probes), a una concentració final de 2.6 μM i 25 nM, respectivament. Les mostres es van incubar durant 10 min a 38°C i en absència de llum. La fluorescència emesa per la M540 va ser capturada pel sensor FL3 mentre que la fluorescència emesa pel YO-PRO va ser captada pel filtre FL1.

Anàlisis de la motilitat espermàtica

La motilitat espermàtica es va determinar mitjançant una cambra de Makler i un sistema d'anàlisi computeritzat del semen (CASA; ISAS, Proiser, València). L'anàlisi de les mostres es va dur a terme amb un microscopi òptic de contrast de fase (BX41 Olympus; Olympus Europe GmbH, Hamburg, Alemanya) equipat amb una càmera de vídeo. Aquesta anàlisi va permetre classificar els espermatozoides d'acord amb els patrons cinemàtics, incloent la velocitat i el tipus de moviment de la seva trajectòria. D'aquesta manera, els espermatozoides es van classificar com a mòbils progressius, mòbils no progressius i estàtics. Es van fer tres recomptes de 1.000 espermatozoides cadascun.

Anàlisi estadística de les dades

Per a l'anàlisi de les dades, es va utilitzar un paquet estadístic IBM SPSS 21.0 (Chicago, Illinois, Estados Unidos). Després de comprovar que la distribució de les dades era normal i les variàncies eren homogènies, es va utilitzar un model lineal mixt i el test post-hoc de Sidak. Les variables dependents van ser els paràmetres espermàtics, el factor entre subjectes va ser el tractament (control, erastina i olesoxime a les concentracions pertinents), i el factor dins dels subjectes va ser el temps d'incubació (0, 120, 240, 270 i 300 min). El nivell de significació es va establir en $p \leq 0,05$.

RESULTATS

La Figura 1 mostra els percentatges de motilitat progressiva, total, viabilitat espermàtica i espermatozoides amb desordre lipídic baix.

Motilitat progressiva

Es va observar una tendència negativa a tots els tractaments, inclòs el control, que es va estabilitzar a partir dels 240 minuts. Quant a la comparació amb els altres tractaments, es va determinar que la presència d'olesoxime

10 μM incrementava el percentatge d'espermatozoides mòbils progressius. Per contra, l'addició d'erastina a 100 μM va reduir significativament aquest percentatge. Al final de l'experiment, es va observar que els tractaments amb erastina 10 i 100 μM presentaven una motilitat progressiva significativament inferior a la del control (Figura 1A).

Motilitat total

Pel que fa a la motilitat total (Figura 1B), també es va observar una tendència cap a la reducció d'aquest paràmetre atès que, tot i partir d'un percentatge d'aproximadament un 65% d'espermatozoides mòbils totals, només un 20% dels espermatozoides eren mòbils al concloure l'experiment. No obstant això, es van observar diferències significatives entre tractaments de manera similar a la motilitat progressiva. Així, el percentatge d'espermatozoides mòbils totals tant després d'afegir erastina 10 μM com olesoxime a la mateixa concentració incrementaven els percentatges d'espermatozoides mòbils totals als 120 min. En canvi, la presència d'erastina a una concentració de 100 μM tenia l'efecte oposat. Aquest efecte de reducció de la motilitat per part de l'erastina 100 μM es va observar també als 240, 270 i 300 min. Finalment, la presència d'erastina 10 μM també va reduir significativament el percentatge d'espermatozoides mòbils totals als 300 min.

Viabilitat espermàtica

La viabilitat espermàtica (Figura 1C) es va avaluar mitjançant el percentatge d'espermatozoides amb la membrana plasmàtica intacta (SYBR14⁺/PI⁻). Els resultats obtinguts mostren de nou una tendència a la baixa en tots els tractaments, llevat del tractament amb olesoxime 100 μM que, des dels 120 min i fins al final de l'experiment va presentar uns percentatges d'espermatozoides viables significativament superiors al control. Per contra, l'addició d'erastina a una concentració de 100 μM va resultar en una reducció significativa de la viabilitat espermàtica des dels 120 min i fins a la conclusió de l'experiment.

Desordre lipídic de la membrana plasmàtica

Es va avaluar el percentatge d'espermatozoides viables que presentaven una membrana intacta amb un desordre lipídic baix (no capacitats, M540/YO-PRO-1⁻) (Figura 1D). De manera similar a l'anàlisi de la viabilitat, es va observar una tendència a la disminució del percentatge d'espermatozoides amb baix desordre lipídic a la seva membrana, la qual cosa era concomitant amb un increment del percentatge d'espermatozoides capacitats

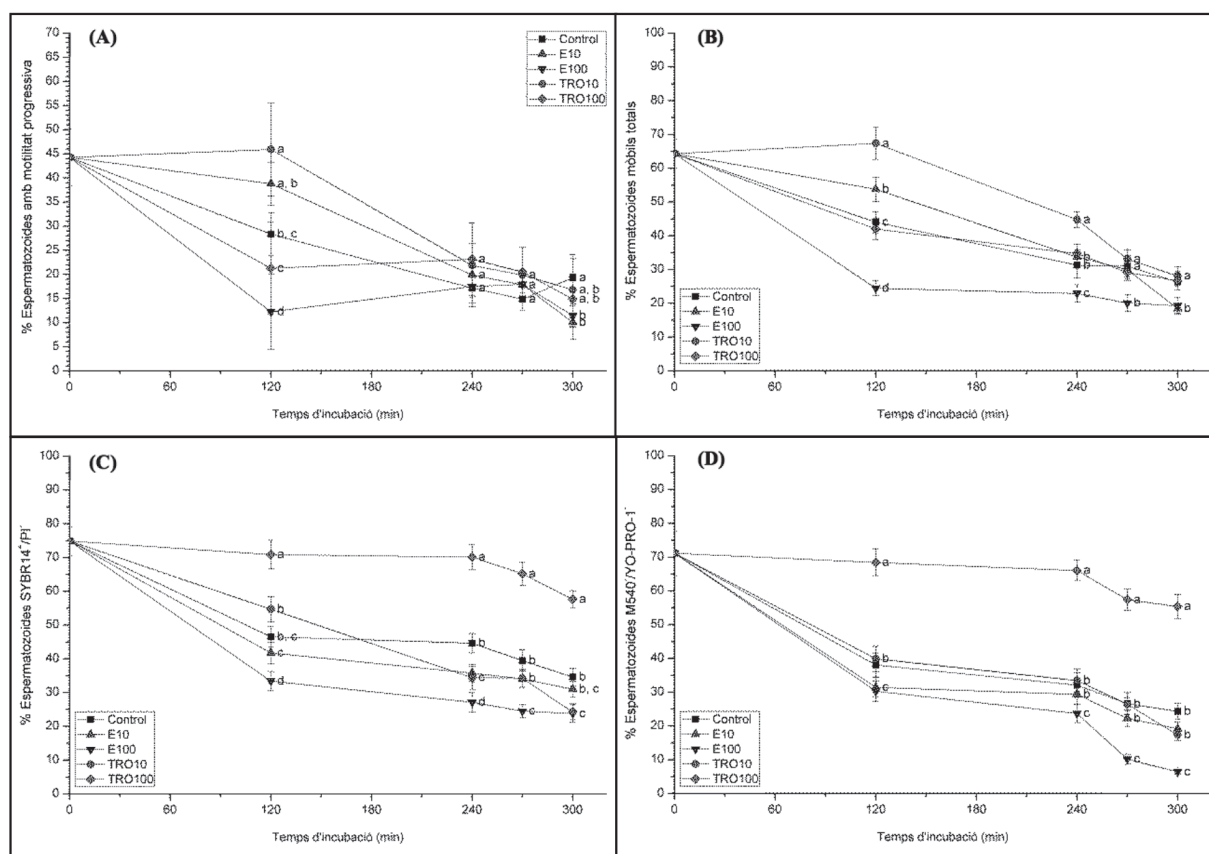


Figura 1. Comparació dels efectes dels dos inhibidors (erastin i olesoxime) en dues concentracions diferents (10 μ M i 100 μ M) respecte el control. Es representen la motilitat progressiva (A) i total (B), la viabilitat (C) i el desordre lipídic (D) de la membrana plasmàtica. En tots els casos, es representa la mitjana i l'error estàndard de la mitjana. Les diferències significatives entre tractaments ($p \leq 0,05$) dins d'un mateix temps es denoten amb superíndexs diferents (*a*, *b*, *c*). Abreviacions: E10: erastin 10 μ M; E100: erastin 100 μ M; TRO10: olesoxime 10 μ M; TRO100: olesoxime 100 μ M.

(M540⁺). Tanmateix, aquesta reducció no es va observar en el tractament d'olesoxime 100 μ M, atès que el percentatge d'espermatozoides amb baix desordre lipídic a la seva membrana va ser significativament superior a la resta de tractaments des dels 120 min i fins al final de l'experiment. En canvi, la presència d'erastina a elevades concentracions va reduir aquest paràmetre de manera significativa respecte el control a partir dels 120 min d'incubació. Per contra, les concentracions més baixes d'ambdós inhibidors (10 μ M) no van tenir un impacte significatiu sobre el percentatge d'espermatozoides amb baix desordre lipídic.

DISCUSSIÓ

Aquest estudi ha pretès incrementar el coneixement del paper que els canals iònics tradicionalment menys estudiats, com la VDAC2, tenen durant la capacitat esper-

màtica. Per aquest motiu s'ha assajat l'addició de dos inhibidors diferents (l'erastina i l'olesoxime) a dues concentracions diferents (10 μ M i 100 μ M) i s'han determinat els seus efectes sobre diferents paràmetres indicadors de la capacitat espermàtica, tant abans com després de l'addició de la progesterona.

Per una banda, l'anàlisi de la motilitat indica que tant la motilitat progressiva com la total tendeixen a disminuir amb concentracions de 100 μ M d'erastina i d'olesoxime. En canvi, els efectes sobre ambdós paràmetres són molt menys evidents quan les concentracions són d'un ordre de magnitud inferior.

D'altra banda, tant l'anàlisi de la viabilitat espermàtica com el de la viabilitat indiquen que una concentració elevada d'olesoxime (100 μ M) inhibeix la capacitat espermàtica, àdhuc quan l'espermatozoide es troba en un medi capacitant i en presència de bicarbonat i BSA. Aquest efecte inhibitori tant de la capacitat espermàtica suggereix que la VDAC2 té un paper molt

important durant aquest fenomen fisiològicament tant rellevant per la vida d'un espermatozoide i pel desenvolupament de la seva capacitat fecundant. Aquest resultat no hauria de ser sorprenent, atès que aquest canal de membrana mitocondrial està implicat en el trànsit del calci, i estudis previs han demostrat que el calci mitocondrial juga un paper fonamental per la motilitat espermàtica i durant la capacitació (Costello et al., 2009; Yeste et al., 2015).

Tanmateix, els resultats més interessants d'aquest treball provenen de la comparació dels efectes d'ambdós inhibidors. Malgrat els dos redueixen de manera significativa la motilitat espermàtica, especialment a les concentracions més elevades, els efectes sobre la fluïdesa o desordre lipídic de la membrana són completament oposats. Així, mentre l'increment del desordre lipídic característic de la capacitació s'observa també en presència d'erastina, el tractament amb olesoxime 100 μ M inhibeix aquest increment, de manera que les cèl·lules espermàtiques mantenen la seva integritat i el seu estat no capacitat. Aquests resultats indiquen que, malgrat l'erastina i l'olesoxime inhibeixen la hiperactivació, és a dir, el canvi del patró de motilitat propi de la capacitació, els efectes sobre la fluïdesa de la membrana són diferents perquè actuen mitjançant mecanismes diferents. Una altra explicació seria que l'erastina no és un inhibidor prou específic, atès que desencadena un ruta, la ferroptosi que, fins avui, no s'ha descrit a l'espermatozoide (Yagoda et al., 2007). D'altra banda, l'olesoxime és un medicament neuroprotector de gran utilitat a l'esclerosi lateral amiotròfica (Bordet et al., 2010), de manera que calen altres estudis per avaluar els mecanismes que governen aquest efecte tant positiu observat sobre la integritat de la membrana espermàtica i la seva fluïdesa.

En resum, aquest estudi ha demostrat que la inhibició del canal VDAC2 a través de dos molècules dife-

rents té un efecte significatiu sobre la capacitació espermàtica. Tanmateix, es requereixen estudis addicionals per determinar les vies de senyalització cel·lular que es desencadenen en resposta a cadascun d'aquests inhibidors.

REFERÈNCIES

- Bordet T [et al] (2010) Olesoxime (TRO19622): A Novel Mitochondrial-Targeted Neuroprotective Compound. *Pharmaceuticals*, vol. 3, p. 345-368.
- Costello S [et al] (2009) Ca²⁺-stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction*, vol. 138, p. 425-437.
- Kwon WS [et al] (2015) Proteomic approaches for profiling negative fertility markers in inferior boar spermatozoa. *Sci Rep*, vol. 5, p. 13821.
- Liu B [et al] (2010) Analysis and difference of voltage-dependent anion channel mRNA in ejaculated spermatozoa from normozoospermic fertile donors and infertile patients with idiopathic asthenozoospermia. *J Assist Reprod Genet*, vol. 27, p. 719-24.
- Vilagran I [et al] (2014) Relationship of sperm small heat-shock protein 10 and voltage dependent anion channel 2 with semen freezability in boars. *Theriogenology*, vol. 82, p. 418-426.
- Visconti PE (2009) Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *PNAS*, vol. 106, p. 667-668.
- Yagoda N [et al] (2007) RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage dependent anion channels. *Nature*, vol. 447, p. 864-868.
- Yeste M (2013) Boar spermatozoa within the oviductal environment (II): Sperm Capacitation. Dins: *Boar Reproduction*. Ed. Springer, Berlin, p. 281-342.

EFFECTES DEL PÈPTID ANTIMICROBIÀ PROTEGRINA 1 (PG1) SOBRE LA VIABILITAT I LA CÀRREGA BACTERIANA DE SEMEN DE PORCÍ

Eva Bussalleu^{1*}, Sílvia Sancho¹, M. Dolors Briz¹, Marc Yeste¹, Sergi Bonet¹

¹Bioteconologia de la Reproducció Animal i Humana (TechnoSperm), Departament de Biologia, Institut de Tecnologia Agroalimentària, Universitat de Girona, 17003 Girona, Catalunya.

eva.bussalleu@udg.edu; silvia.sancho@udg.edu; mailo.briz@udg.edu; marc.yeste@udg.edu; sergi.bonet@udg.edu

Resum

La presència de bacteris afecta negativament la qualitat espermàtica de porcí. Una manera de controlar-la és la utilització d'antibiòtics en la formulació dels diluents, però s'han descrit moltes resistències microbianes a aquests antibiòtics. Actualment es busquen alternatives a l'ús d'antibiòtics, i una de les més prometedores són els pèptids antimicrobians. En aquest estudi es van avaluar els efectes del pèptid antimicrobià protegrina 1 (PG1) sobre la viabilitat espermàtica i sobre la càrrega bacteriana de dosis seminals de porcí. Es van assajar tres concentracions diferents de PG1 (2.5 µg/ml; 25 µg/ml i 100 µg/ml). Els resultats obtinguts mostraren que la PG1 és eficient per controlar la càrrega bacteriana a totes les concentracions provades, per bé que afecten de manera significativa la viabilitat espermàtica, essent els efectes més notoris a les concentracions més altes del pèptid antimicrobià. Tot i aquests resultats, no es pot descartar l'ús de la PG1 com a alternativa als antibiòtics, ja que calen més estudis utilitzant aquest pèptid en la seva forma truncada.

Paraules clau: pèptids antimicrobians, protegrina 1, viabilitat espermàtica, càrrega bacteriana, semen porcí.

Abstract

The presence of bacteria adversely affects boar sperm quality. The most common measure to control is the use of antibiotics in the formulation of semen extender; however, a great microbial resistance to these antibiotics has been described. One of the most promising alternative to antibiotics are the antimicrobial peptides. In this study, the effects of the antimicrobial peptide protegrin 1 (PG1) on the sperm viability and on the bacterial load of boar semen doses were evaluated. Three different concentrations of PG1 were tested (2.5 µg/mL, 25 µg/ml and 100 µg/ml). The results showed that PG1 is effective in controlling the bacterial load in all the assessed concentrations, although it significantly affects the sperm viability, being the most evident effects at the higher concentrations of the antimicrobial peptide. Despite these results, the use of PG1 as an alternative to antibiotics can not be totally discarded, as further studies using the truncated form of this peptide are needed.

Key words: antimicrobial peptides, protegrin 1, sperm viability, bacterial load, boar semen.

INTRODUCCIÓ

La presència de microorganismes en el semen de porcí es coneix com bacteriospermia, i actualment és un dels principals problemes existents en la indústria porcina i en els centres d'inseminació artificial (Bussalleu i Torner, 2013). Els efectes adversos de la bacteriospermia no només poden causar una mala qualitat del semen, sinó que també poden incloure la infertilitat (temporal) i la reducció de la producció d'esperma en els mascles, així com afectar la capacitat fecundant dels espermatozoides (i conseqüentment un menor rendiment reproductiu en les granges), endometritis, a més a més de poder provocar diverses malalties en les femelles receptores. Per controlar la bacteriospermia hi ha diverses op-

cions que poden ser eficaces. El primer mètode per minimitzar la contaminació bacteriana del semen diluït es troba en l'àmbit de la higiene individual i general (Kuster i Althouse, 2016). La segona opció, i la més utilitzada per tal de controlar la bacteriospermia, és la selecció d'antibiòtics amb un ampli espectre bactericida, que s'inclouen en la formulació dels diluents (Althouse *et al.*, 2000; Bussalleu i Torner, 2013).

No obstant això, alguns estudis han demostrat que més del 90% dels bacteris aïllats de dosis seminals són resistents als antibiòtics comuns (Bolarin, 2011; Schulze *et al.*, 2014).

En aquest escenari que mostra una augment dramàtic de la resistència als antibiòtics, urgeix trobar alternatives als antibiòtics convencionals.

En les últimes dècades s'ha fet un gran esforç en la producció de nous agents antimicrobians, com ara els anomenats pèptids antimicrobians (AMP) (Hancock i Patrzykat, 2002; Peters *et al.*, 2010; Schulze *et al.*, 2014). La majoria d'aquests pèptids s'han obtingut de diverses fonts com poden ser els neutròfils, leucòcits o cèl·lules epitelials (Peters *et al.*, 2010). Els pèptids antimicrobians poden eliminar amb èxit els bacteris Gram-negatius i Gram-positius, fongs, virus i fins i tot les cèl·lules de càncer *in vitro*. Tot i així, l'activitat dels pèptids antimicrobians pot resultar tòxica per a les cèl·lules sanes de l'hoste i, per tant, abans de la seva aplicació, és important determinar si l'AMP en qüestió té algun efecte citotòxic sobre les cèl·lules eucariotes (Hancock i Patrzykat, 2002; Schulze *et al.*, 2014).

També se sap que cada AMP interactua de manera específica i diferencial amb la membrana plasmàtica de les cèl·lules eucariotes, observant-se efectes molt diversos sobre la qualitat espermàtica de porcí depenent de cada AMP (Schulze *et al.*, 2014).

La Protegrina 1 (PG1) és l'AMP estudiat en aquest treball; és un pèptid que pertany a la família de les catelicidines, format per 18 aminoàcids i que presenta una amida modificada a l'extrem C terminal. La PG1 té un ampli espectre d'activitat i és capaç d'inactivar nombrosos bacteris Gram-negatius i Gram-positius, fongs i alguns virus.

Així doncs, segons l'exposat anteriorment, els objectius d'aquest treball foren analitzar l'efecte d'un AMP, la PG1, sobre la viabilitat espermàtica de dosis seminals de porcí per conèixer si aquest pèptid antimicrobià té algun efecte citotòxic sobre els espermatozoides de porcí. Alhora, es va determinar l'efectivitat de la PG1 en el control del creixement bacterià de dosis seminals de porcí, per tal de conèixer si aquest pèptid pot ser usat com a substitut dels antibiòtics en el semen diluït i conservat en fresc, mimetitzant les condicions normals d'emmagatzematge del semen de porcí a 15-17°C.

MATERIAL I MÈTODES

El disseny experimental es mostra a la Figura 1. Pel que fa a l'anàlisi estadística dels resultats, i per tal de comparar els resultats obtinguts entre els diferents tractaments i els controls, així com per avaluar l'efecte del temps de durada dels tractaments, es va utilitzar el paquet estadístic IBM SPSS per a Windows (Versió 23; Chicago, IL, EUA). Inicialment, es va determinar si es complien les hipòtesis de normalitat i d'homogeneïtat de variàncies amb els testos Shapiro-Wilk i Levene, respectivament. Les dades a estudiar no seguien les hipòtesis de normalitat i homogeneïtat necessàries; per tant, es va aplicar estadística no paramètrica mitjançant el test de Friedman, seguit del de Wilcoxon. El nivell de significació es va establir en $P \leq 0.05$.

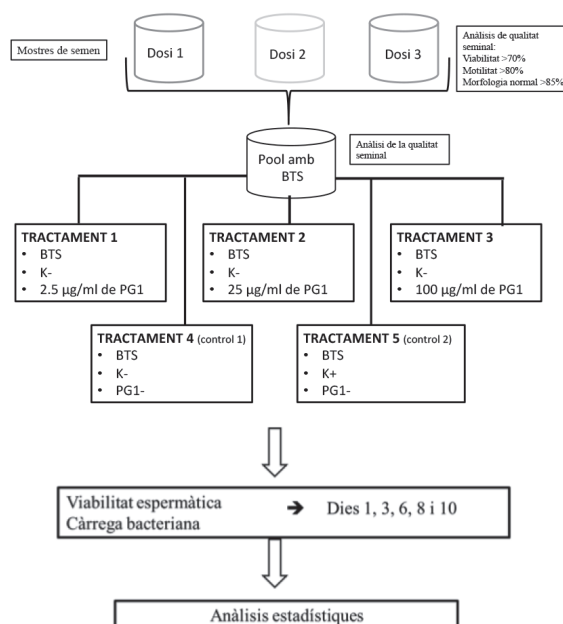


Figura 1. Disseny experimental seguit en aquest estudi. (BTS: Beltsville Thawing Solution; K: kanamicina; PG1: protegrina 1).

RESULTATS

L'evolució del creixement bacterià al llarg dels 10 dies d'estudi, es mostra a la Figura 2.

Dins de cada tractament, quan el dia 0 (4×10^2 ufc·mL⁻¹) era comparat amb el dia 10, es van observar diferències significatives en tots els tractaments amb PG1 (T1, T2 i T3), així com en els grups control (T4 i T5), essent la càrrega bacteriana final de 6.6×10^1 ufc·mL⁻¹ a T1; 0 ufc·mL⁻¹ a T2; 1×10^1 a T3; 2.6×10^2 ufc·mL⁻¹ a T4 i 1×10^3 ufc·mL⁻¹ a T5 ($P < 0.05$). Quan els tractaments foren comparats entre ells, sí que es van observar diferències significatives en els dies 1, 3, 8 i 10 entre els controls (T4 i T5) i els tractaments T1, T2 i T3 ($P < 0.05$).

A l'inici de l'estudi, el percentatge d'espermatozoides viables era del 86% en tots els casos (Fig.3). Al llarg de l'experiment, es va observar una davallada del percentatge d'espermatozoides viables en tots els temps dins de cada un dels tractaments, essent el dia 10 del $36\% \pm 5.51$ en el T1, $27\% \pm 1.41$ en el T2, $17\% \pm 0.00$ en T3, $66.67\% \pm 2.08$ en el T4 i $68.50\% \pm 0.71$ en el T5 respectivament ($P < 0.05$; en tots els casos) de manera que els valors de viabilitat eren superiors en els tractaments control (T4 i T5).

Quan es van comparar els tractaments entre ells, es van observar diferències significatives entre T1 i T2 en els dies 1 i 6 de l'experiment (T1, dia 1: $71\% \pm 4.58$ i dia 6: $44.33\% \pm 1.15$; T2, dia 1: $56\% \pm 3$ dia 6: $34\% \pm 1.73$; $P < 0.05$).

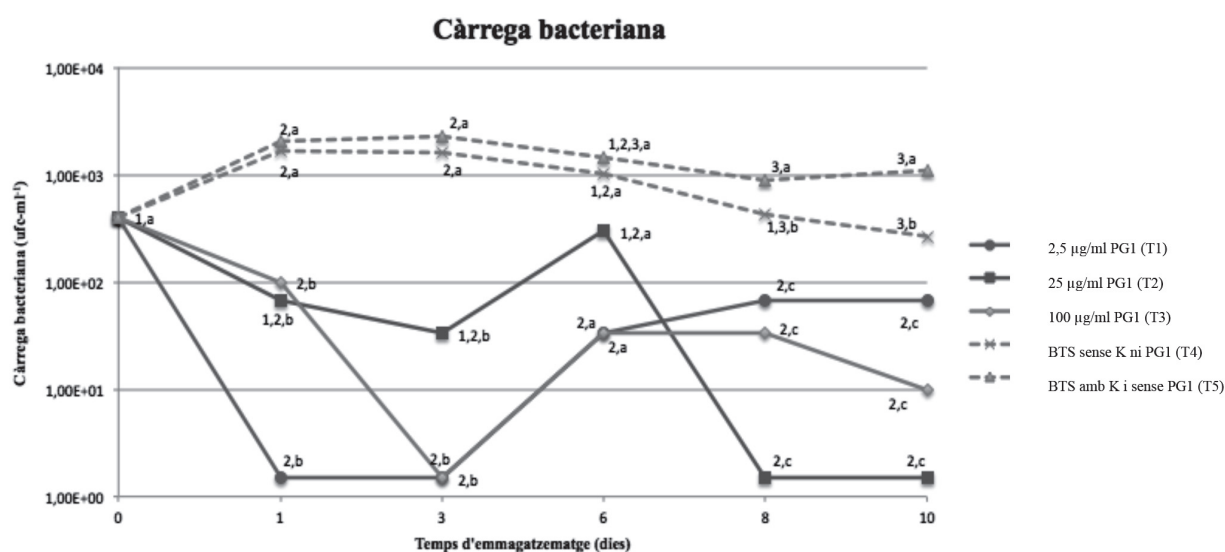


Figura 2. Càrrega bacteriana (ufc x ml⁻¹) després de 10 dies d'emmagatzematge a 17°C. Diferents lletres (a, b, c) mostren diferències significatives ($P<0.05$) entre tractaments, mentre que diferents números (1, 2, 3) mostren diferències significatives ($P<0.05$) dins d'un mateix tractament.

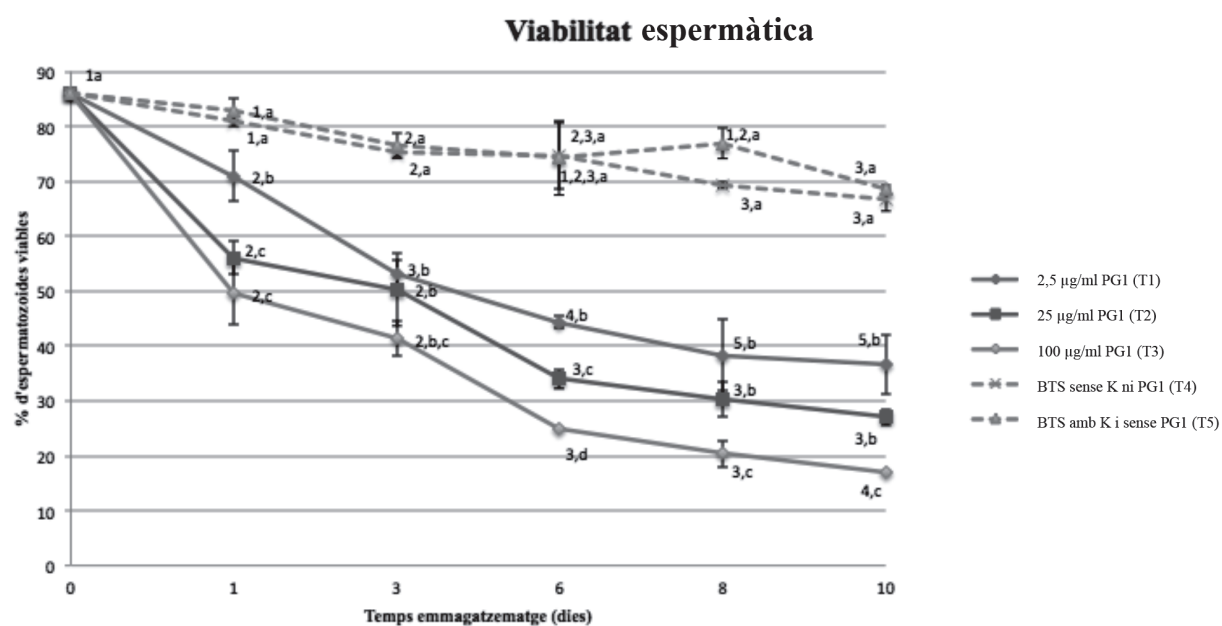


Figura 3. Percentatge d'espermatozoides viables (mitjana±SEM) després de 10 dies d'emmagatzematge a 17°C. Diferents lletres (a, b, c, d) mostren diferències significatives ($P<0.05$) entre tractaments, mentre que diferents números (1, 2, 3, 4, 5) mostren diferències significatives ($P<0.05$) dins d'un mateix tractament.

DISCUSSIÓ

L'estudi dut a terme va mostrar que la presència de PG1, a qualsevol de les concentracions estudiades, va ser

efectiva per controlar el creixement bacterià, mostrant millors resultats que els diluents que contenen kanamicina o que no contenen cap tipus de substància antimicrobiana. Tot i que hi ha diversos mecanismes d'acció

pels quals els AMPs actuen contra els microorganismes, sembla ser que, de manera general, els pèptids antimicrobians actuen ràpidament reduint el nombre de cèl·lules viables durant els primers minuts d'interacció (Hancock i Patrzykat, 2002). Es tracta d'un procés específic que es basa en la composició diferencial de les membranes dels bacteris i dels eucariotes. En els primers, es troba un major contingut de fosfolípids aniònics a la cara extracitoplasmàtica de la membrana plasmàtica respecte a la dels eucariotes, on aquests fosfolípids es troben majoritàriament a la cara citoplasmàtica de la membrana, fent-los inaccessible al pèptid (Zasloff, 2002). A més a més, la presència de colesterol en les membranes de les cèl·lules eucariotes animals, actua com a reductor del potencial citotòxic dels AMPs (Hancock i Patrzykat, 2002; Giuliani *et al.*, 2007).

La viabilitat espermàtica al final de l'experiment va ser millor en els dos grups control que en els tractaments que contenien el pèptid antimicrobià. Cal esmentar, però, que la concentració més baixa de PG1 (2.5 µg/ml; T1), va mostrar millors resultats respecte a la viabilitat final dels espermatozoides que la concentració mitjana (25 µg/ml; T2) o la concentració més elevada (100 µg/ml; T3). Altres estudis ja descriuen que alguns AMPs poden tenir varis efectes citotòxics sobre els espermatozoides, dependents del temps i la concentració i que, per tant, poden provocar efectes espermicides i espermiostàtics (Schulze *et al.*, 2016). La citotoxicitat de la PG1 sobre els espermatozoides de porcí es podria explicar pel fet que, tot i tractar-se de cèl·lules eucariotes, aquestes presenten un contingut més baix en colesterol en les seves membranes plasmàtiques respecte als espermatozoides d'altres espècies de mamífers, cosa que afavoriria la seva interacció amb el pèptid PG1, afectant-ne la seva motilitat i viabilitat (Cross, 1998). S'ha proposat que l'efecte lític dels AMPs prové de la seva habilitat per induir canvis estructurals en la membrana, resultant en la formació de porus. Aquests porus resultants podrien ser una estructura similar a la que es forma en els models d'acció proposats pels AMPs, els models de barril o toroïdal (Lam *et al.*, 2012).

El model de barril consisteix en la inserció perpendicular i l'agregació d'un nombre relativament petit de pèptids dins de la membrana que indueixen la formació d'un porus transmembrana o canal amb una estructura cilíndrica (Hancock i Patrzykat, 2002; Giuliani *et al.*, 2007). El pas inicial en la formació del porus, en aquest model de barril, consisteix en la unió del pèptid a la superfície de la membrana, gràcies a interaccions electrostàtiques que faciliten aquest procés (Giuliani *et al.*, 2007). Quan el pèptid unit arriba a un llinar de concentració, s'insereix més profundament en el nucli hidrofòb de la membrana. Es creu que els canals formats per aquest procés provoquen una fuga de material cel·lular

i, per tant, la mort cel·lular (Hancock i Patrzykat, 2002; Giuliani *et al.*, 2007). Els porus que es formen són una estructura dinàmica que varia la seva mida en funció del reclutament o pèrdua de la quantitat de pèptid. No obstant això, cal dir que encara hi ha relativament pocs pèptids pels quals hi ha evidència convincent del model de barril (Hancock i Patrzykat, 2002).

Els estudis més recents (Lam *et al.*, 2012) donen major suport al model de porus toroïdal (Yang *et al.*, 2001), tot i que es tracta de models predictius que encara no han estat demostrats (Giuliani *et al.*, 2007). Aquest model és una extensió de l'anterior, en el qual els porus estan revestits per pèptids i lípids. La presència de fosfolípids carregats negativament en el revestiment del porus, redueix les interaccions de repulsió a causa de l'alta densitat de càrregues positives del pèptid i fan que l'estructura sigui molt més estable (Giuliani *et al.*, 2007).

La formació de porus induïts per PG1 en la bicapa lipídica de la membrana d'eucariotes s'ha observat directament utilitzant un microscopi de forces atòmiques, suggerint que el model toroïdal és el més probable per a l'acció de PG1. Així, a mida que augmenta la concentració de PG-1, va provocant primerament una inestabilitat a les vores de la bicapa, seguida de la formació d'un porus al centre per acabar amb la formació d'estructures en forma de cuc (Lam *et al.*, 2012).

És interessant comentar el fet que el grup control T4, sense antibiòtic ni pèptid, va obtenir els millors resultats en el control del creixement bacterià en comparació amb el control T5, amb kanamicina. Això es podria explicar per la presència de soques resistents a la kanamicina presents a les dosis seminals utilitzades en aquest estudi. Paral·lelament a aquest estudi, es van aïllar i identificar aquestes soques microbianes, resultant ésser *Proteus* spp. i *Streptococcus* spp. En conclusió, i tenint en compte els resultats de l'estudi, la PG1 a baixa concentració (2.5 µg/ml) mostra millors resultats que els grups control en evitar el creixement bacterià, així com millors resultats en la viabilitat final que els tractaments amb concentració intermèdia (25 µg/ml) i alta concentració (100 µg/ml) de PG1. Tot i així, la viabilitat al final de l'experiment (dia 10) va ser millor en els dos grups control. Així doncs, el pèptid antimicrobià PG1, no sembla la millor opció com a possible substitut dels antibiòtics en els diluents de semen, ja que ha demostrat ser citotòxic pels espermatozoides de porcí. Tot i així, no es pot descartar la PG1 per complet tenint en compte que, altres estudis han avaluat l'efecte de pèptids antimicrobians truncats, observant que el seu efecte citotòxic pot variar per complet (Tamamura *et al.*, 1995). Seria necessari la realització de més estudis per estudiar l'efecte de la PG1 en la seva forma de pèptid truncat.

BIBLIOGRAFIA

- Althouse, G.C. [et al.] (2000). «Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen». *Theriogenology*, vol. 53, p. 1167-1176.
- Bolarín, G. (2011). «Bacteriología en semen de porcino». *Avances en tecnología porcina*, vol. 8, núm. 79, p. 20-30.
- Bussalleu, E.; Torner, E. (2013). «Quality improvement of boar seminal doses». A: Bonet, S., Casas, I., Holt, W.V., Yeste, M. (Eds). *Boar Reproduction. Fundamentals and New Biotechnological Trends*. Springer-Verlag, Heidelberg, p. 517-550.
- Cross, N.L. (1998). «Role of cholesterol in sperm capacitation». *Biol. Reprod.*, vol. 59, p. 7-11.
- Giuliani, A. [et al.] (2007). «Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics». *Central European Journal of Biology*, vol. 2, núm.1, p.1-33.
- Hancock, R.E.; Patrzykat, A. (2002). «Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics». *Curr. Drug Targets-Infect. Disord.*, vol. 2, p. 79-83.
- Kuster, C.E.; Althouse, G.C. (2016). «The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance». *Theriogenology*, vol. 85, núm. 1, p. 21-26.
- Lam, K.L. [et al.] (2012). «Mechanism of structural transformations induced by antimicrobial peptides in lipid membranes». *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 1818, núm.2, p. 194-204.
- Peters, B.M. [et al.] (2010). «Antimicrobial Peptides: primeval molecules or future drugs?». *Plos Pathogens*, vol.6, núm. 10, e1001067.
- Schulze, M. [et al.] (2014). «Effects of cationic antimicrobial peptides on liquid-preserved boar spermatozoa». *PLoS One*, vol. 9, núm. 6, p. 96:e100490.
- Schulze, M. [et al.] (2016). «Liquid storage of boar semen: Current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders». *Theriogenology*, vol. 88, núm. 1, p. 39-46.
- Tamamura, H. [et al.] (1995). «Synthesis of protegrin-related peptides and their antibacterial and anti-human immunodeficiency virus activity». *Chem. Pharm. Bull.*, vol.43, núm. 5, p.853-858.
- Yang, L. [et al.] (2001). «Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores». *Biophys J.*, vol. 81, núm. 3, p.1475-1485.
- Zasloff, M. (2002). «Antimicrobial peptides of multicellular organisms». *Nature*, vol. 415, núm. 6870, p.389-395.

MÚLTIPLE CARACTERITZACIÓ DE LA FRAGMENTACIÓ DE L'ADN ESPERMÀTIC DE CADENA SENZILLA I DOBLE EN ESPERMATOZOIDES SELECCIONATS PER A ICSI

Sandra Lara Cerrillo¹, Maria Gracia Catalá², Jordi Benet Català³, Jordi Ribas Maynou¹, Agustín García Peiró¹

¹Centre d'Infertilitat Masculina i Anàlisi de Barcelona (CIMAB), Edifici Eureka, PBM5, Parc de Recerca de la UAB (PRUAB), Bellaterra, Spain.

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

³Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

08193 Bellaterra. info@cimab.es

Resum

En l'avaluació de la infertilitat, l'estudi de la fragmentació de l'ADN espermàtic s'ha establert com un sistema rellevant per al diagnòstic del baró. La injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI) és sovint el tractament de reproducció assistida d'elecció, però estudis recents mostren que l'anàlisi de la fragmentació en ejaculat analitzada amb els mètodes TUNEL i SCD no es correspon amb resultats clínics en cicles d'ICSI. El present estudi té com a objectiu la comparació de la fragmentació de l'ADN espermàtic entre espermatozoides d'ejaculat i espermatozoides seleccionats per micromanipulació sota els criteris de morfologia i motilitat que s'apliquen en ICSI. Els resultats mostren que la fragmentació extensiva, majoritàriament de cadena senzilla, detectada amb Comet alcalí, SCD i TUNEL disminueix en espermatozoides seleccionats respecte la mostra d'ejaculat i el swim-up ($p < 0.05$). En canvi, la fragmentació localitzada de cadena doble, que només pot ser detectada amb Comet neutre, no presenta aquesta variació ($p = 0.833$). Els resultats obtinguts en aquest estudi preliminar poden ser explicatius del biaix que existeix en la selecció dels espermatozoides en cicles de ICSI, suportant la hipòtesi de que el tipus de dany a l'ADN predominant en aquesta subpoblació d'espermatozoides és de cadena doble i no de cadena senzilla.

Paraules clau: Infertilitat masculina, injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI), fragmentació de l'ADN espermàtic (SDF).

Abstract

Sperm DNA fragmentation analysis has become a relevant system to evaluate male infertility. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is usually the elected treatment in assisted reproduction even recent studies show that sperm DNA fragmentation values analyzed with TUNEL and SCD are not related to clinical outcomes in ICSI cycles. The main purpose of the present study was to compare sperm DNA fragmentation between ejaculated sperm and selected sperm using ICSI motility and morphology criteria. Results show that extensive DNA fragmentation, mainly single-strand breaks and detected with alkaline Comet, SCD and TUNEL assays, is decreased in selected sperm compared to ejaculated sperm or swim-up samples ($p < 0.05$). On the contrary, localized double-strand breaks detected using neutral Comet assay do not show this variation ($p = 0.833$). Results of this preliminary study may be explicative of the bias caused by the selection of sperm cells in ICSI procedures, showing that double-strand breaks are the main DNA damage in this sperm subpopulation.

Key words: male infertility, Intracytoplasmic sperm injection (ICSI), sperm DNA fragmentation (SDF).

INTRODUCCIÓ

La infertilitat és una malaltia comú que actualment afecta el 15% de les parelles en edat reproductiva (Jungwirth et al., 2012). Els tractaments de reproducció assistida po-

den aportar solucions a parelles que no aconsegueixen concebre de forma natural, essent la injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI) el procediment més utilitzat tant a nivell estatal (89.4%) (Registro Nacional de Actividad, 2014) com europeu (48.83%) (Calhaz-

Jorge *et al.*, 2016). Tot i això, existeix un elevat nombre de casos en els que el tractament no resulta en un embaràs clínic i el posterior naixement d'un nadó, oscil·lant les taxes de gestació i part sobre el 36.6% i 16.8%, respectivament (Registro Nacional de Actividad, 2014).

L'origen multifactorial de la infertilitat, on els factors masculins i femenins estan implicats en similar proporció, fa difícil saber la causa de les baixes taxes d'èxit en cicles d'ICSI. En relació a la part masculina, existeix un biaix entre els espermatozoides de l'ejaculat i els espermatozoides que finalment són utilitzats per a fecundar i que presenten una millor morfologia i motilitat. Diversos estudis proposen aquest biaix com a possible causant de la falta de capacitat predictiva de les tècniques d'anàlisi en ejaculat sobre l'èxit o fracàs dels cicles d'ICSI (Bach *et al.*, 2016; Lewis *et al.*, 2013).

D'entre les causes genètiques relacionades amb la infertilitat masculina, la fragmentació de l'ADN espermàtic ha estat, en els últims temps, un bon marcador diagnòstic per a l'embaràs de forma natural. Les tècniques més avançades permeten distingir dos tipus de dany a l'ADN espermàtic: de cadena senzilla (ssSDF) i de cadena doble (dsSDF).

La ssSDF es caracteritza per ser un dany extensiu que afecta a totes les regions del genoma (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a), causada majoritàriament per estrès oxidatiu (Aitken *et al.*, 2013) i relacionada amb la motilitat espermàtica (Sheikh *et al.*, 2008; Simon i Lewis, 2011). El seu efecte clínic recau en la capacitat de fertilització de l'espermatozoide i la consecució d'un embaràs natural (Ribas-Maynou *et al.* 2013). L'avaluació d'aquest dany es pot fer mitjançant les tècniques Comet alcalí, Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) o el Sperm Chromatin Dispersion (SCD). La dsSDF, mesurada únicament amb Comet neutre (Ribas-Maynou *et al.*, 2013), es caracteritza per la seva localització a les regions d'unió a la matriu nuclear i s'ha relacionat amb avortaments de repetició en el primer trimestre de gestació en parelles sense un factor femení aparent (Ribas-Maynou *et al.*, 2012b), amb alteracions en la cinètica embrionària i amb fallades d'implantació en cicles de ICSI (Casanovas *et al.*, dades no publicades).

Davant la impossibilitat actual d'estudiar l'estat genètic del mateix espermatozoide que serà injectat dins l'òcit, la millor aproximació resulta d'estudiar el subgrup espermatozoides que s'utilitzen en cicles de reproducció assistida. Així, diversos estudis han relacionat una menor fragmentació de l'ADN analitzada amb TUNEL (Franco *et al.*, 2008; Hammoud *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2011) o Comet (Pastuszek *et al.*, 2017) amb l'absència de vacuoles detectades mitjançant la selecció d'espermatozoides seleccionats amb elevada magnificació (MSOME).

En el present estudi es pretén avaluar el risc genètic majoritari en la subpoblació d'espermatozoides seleccionats seguint criteris d'ICSI utilitzant quatre tècniques de detecció de la fragmentació de l'ADN (Comet neutre, Comet alcalí, SCD i TUNEL).

MATERIAL I MÈTODES

Població d'estudi i criopreservació de les mostres

Per al present estudi preliminar s'han inclòs 10 pacients infèrtils amb una mitjana d'edat de 34.10 ± 4.28 anys que han acudit a la consulta de CIMAB. Les mostres d'ejaculat van ser recollides després de 2-3 dies d'abstinència sexual, es van deixar liquar a temperatura ambient i van ser criopreservades. La criopreservació es va dur a terme amb Test Yolk buffer (1:1), aplicant un escalfatge de temperatures: 10 minuts a 4°C; 20 minuts a -80°C i finalment emmagatzemades en N₂ líquid fins el seu ús. La descongelació es va realitzar durant 1 minut a 37°C i posterior dilució del crio-protector en medi F-10 HAM (Sigma-Aldrich, USA). L'estudi ha estat aprovat pel comitè d'ètica de la Corporació Sanitària Parc Taulí. Tots els participants han signat el consentiment informat per a l'ús de les mostres en investigació.

Preparació de les mostres

Les mostres descongelades es van centrifugar a 300g durant 3 minuts per eliminar el medi de criopreservació i es van resuspendre en medi F-10 HAM a 37°C. El swim-up es va realitzar a 37°C durant 30 minuts. Es van recollir 100 µL de la part superior del swim-up i 1 µL es va incorporar en una gota de 5 µL de PVP 10% (Origio, Denmark), submergida en oli mineral (Sigma-Aldrich, USA). La selecció d'espermatozoides es va fer utilitzant un microscopi invertit Nikon Diaphot (Nikon, Japó) tenint en compte criteris d'ICSI de morfologia i motilitat. Es van seleccionar un total de 1212 espermatozoides per al seu anàlisi amb quatre tècniques d'avaluació de la integritat de l'ADN. La fixació dels espermatozoides va diferir en funció de la tècnica utilitzada: per a l'anàlisi TUNEL, es van col·locar entre 10-20 espermatozoides per mostra i experiment en una gota de 1 µL d'aigua mil·liQ, deixant-la assecar a temperatura ambient. Els portaobjectes es van fixar en Carnoy (àcid acètic i metanol, 1:3) *overnight* i es van deixar assecar a temperatura ambient. Per als anàlisis Comet neutre, Comet alcalí i SCD, 1 µL d'agarosa de baix punt de fusió a 37°C (Sigma-Aldrich, USA) es va posar sobre un portaobjectes escalfat prèviament a 37°C. Dins la gota es van col·locar entre 10-20 espermatozoides per mostra i experiment, deixant gelificar l'agarosa durant 5 minuts a temperatura

ambient. La mostra d'ejaculat i el swim-up de cada pacient es van ajustar a una concentració de 1×10^6 espermatozoides /mL i es van tractar de la mateixa forma que els espermatozoides seleccionats segons la tècnica.

Avaluació de la fragmentació de l'ADN

TUNEL

Es va utilitzar el kit *In Situ Cell Death Detection Fluorescein* (Roche, Germany). Seguint les indicacions del fabricant es va preparar un mix amb la solució de *labelling* i l'enzim (9:1) i es van col·locar 5µL sobre cada mostra. La reacció es va dur a terme durant 1h a 37°C i es van realitzar 3 rentats en PBS de 10 minuts cadascun. Es van incloure els controls negatiu (sense enzim) i positiu (mostra d'ejaculat incubada 30 minuts a 37°C amb nucleasa 2000U/µL (deoxyribonuclease I from bovine pancreas; Sigma-Aldrich, Germany).

Comet alcalí i neutre

Seguint el protocol descrit per Ribas-Maynou, 2012b, es van submergir els portaobjectes en dues solucions de lisi consecutives i en solució TBE. Per al Comet alcalí, es va fer una incubació en solució desnaturalitzant a 4°C i l'electroforesi es va dur a terme en un buffer alcalí a 20V durant 4 minuts. Pel Comet neutre, es va fer una electroforesi en buffer TBE a 20V durant 12,5 minuts i un rentat en solució NaCl. En ambdós casos es va fer una incubació en solució de neutralització de pH 7,5 i es va deshidratar en una sèrie d'etanols (70%, 90% i 100%).

Assaig SCD

Es va seguir el protocol descrit en el kit Halosperm (Halotech DNA, Espanya). Breument, es va submergir el portaobjectes en solució desnaturalitzant i es va fer un tractament de lisi. Es va realitzar un rentat amb aigua destil·lada i es va deshidratar en una sèrie d'etanols (70%, 90% i 100%).

Anàlisi microscòpic

Totes les mostres es van avaluar al microscopi de fluorescència Eclipse E200 (Nikon Instruments Europe BV, Netherlands). Es va utilitzar com a tinció fluorescent el DAPI SlowFade Gold Antifade reagent (Life Technologies, USA).

Anàlisi estadística

La normalitat de les variables es va avaluar amb el test Saphiro-Wilk. El test Wilcoxon per a mostres relacio-

nades es va utilitzar per comparar la fragmentació entre grups d'estudi. Tots els tests es van considerar significatius amb un 95% d'interval de confiança.

RESULTATS

Eficiència i comparació de les tècniques

Per a la fixació dels espermatozoides seleccionats amb micromanipulador seguint criteris d'ICSI s'han posat a punt dos protocols diferents: fixació amb Carnoy per a l'assaig TUNEL i fixació en agarosa per a les tècniques Comet neutre, Comet alcalí i SCD. En tots els casos es va obtenir un percentatge de recuperació dels espermatozoides seleccionats superior al 94% (Taula 1). La detecció de la fragmentació de l'ADN amb quatre tècniques diferents ha permès l'anàlisi d'un total de 933 dels 1212 espermatozoides seleccionats, el que representa un 77% d'eficiència mitjana de les quatre tècniques, essent el TUNEL la tècnica amb una millor eficiència d'anàlisi (Taula 1).

A la Figura 1 es pot observar el resultat de l'anàlisi de la fragmentació amb les quatre tècniques emprades per a una mostra d'ejaculat i espermatozoides seleccionats.

Fragmentació de cadena senzilla i doble de l'ADN espermàtic

A la Taula 1 i Figura 2 es mostren els resultats de ssSDF i dsSDF mesurada amb quatre metodologies d'anàlisi en els diferents subgrups d'espermatozoides (ejaculat, swim-up i espermatozoides seleccionats).

L'anàlisi de la dsSDF mitjançant Comet neutre no mostra diferències significatives entre la mostra d'ejaculat, el swim-up i els espermatozoides seleccionats ($p > 0,05$) (Figura 2). En canvi, l'anàlisi de la ssSDF mitjançant Comet alcalí mostra una reducció significativa en els espermatozoides seleccionats respecte la mostra d'ejaculat ($p = 0,043$) i el swim-up ($p = 0,043$) (Figura 2). En la mateixa línia, mitjançant el test SCD s'observa una disminució del dany en els espermatozoides seleccionats respecte la mostra d'ejaculat ($p = 0,043$) i respecte el swim-up ($p = 0,043$) (Figura 2). L'anàlisi mitjançant TUNEL també evidencia que la reducció del dany a l'ADN és significativa entre els espermatozoides seleccionats i la mostra d'ejaculat ($p = 0,008$) i swim-up ($p = 0,012$) (Figura 2).

DISCUSSIÓ

Diferents estudis mostren que mentre en cèl·lules somàtiques la inducció de trencaments en l'ADN genera una

Taula 1. Valors de fragmentació de l'ADN espermàtic (SDF) analitzada amb quatre tècniques (Comet neutre, Comet alcalí, SCD i TUNEL) en mostra d'ejaculat, mostra després del swim-up i espermatozoides seleccionats sota criteris d'ICSI (ICSI). L'eficiència de recuperació (%) representa el nombre d'espermatozoides recuperats respecte els seleccionats. L'eficiència d'anàlisi (%) representa el nombre d'espermatozoides que s'han pogut analitzar respecte els recuperats. Els resultats indiquen mitjana $\pm$ desviació estàndard.

Tècnica	Nº pacients analitzats	Eficiència recuperació	Eficiència d'anàlisi	Nº esperm. analitzats	SDF (%)		
					Ejaculat	Swim-up	ICSI
Comet Neutre	5	98 %	77 %	193	65,5 $\pm$ 6,9	63,3 $\pm$ 6,4	66,3 $\pm$ 19,2
Comet Alcalí	5	98 %	73 %	191	39,8 $\pm$ 9,5	32 $\pm$ 7,4 ^a	13,6 $\pm$ 8,9 ^{a,b}
SCD	6	97 %	73 %	204	20,7 $\pm$ 10,6	13,5 $\pm$ 7 ^a	2,4 $\pm$ 3,3 ^{a,b}
TUNEL	9	94 %	100 %	345	18,5 $\pm$ 10,6	13,2 $\pm$ 7 ^a	0,9 $\pm$ 1,5 ^{a,b}

^a Diferències significatives respecte la mostra d'ejaculat ($p < 0,05$).

^b Diferències significatives respecte la mostra de swim up ($p < 0,05$).

resposta cel·lular al dany (Li *et al.*, 2016), en cèl·lules germinals masculines les alteracions de la integritat de l'ADN espermàtic donen lloc a un estat clínic d'infertilitat (Bach i Schlegel, 2016; Ribas-Maynou *et al.*, 2012b; Simon i Lewis, 2011). Les opcions terapèutiques en aquests pacients passen sovint per la realització de la injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI), procediment que es diferencia de la resta de tractaments de reproducció assistida per la selecció mitjançant micromanipulació d'espermatozoides amb bones característiques de morfologia i motilitat que s'utilitzen en la fecundació dels oòcits. En relació a la ICSI, els estudis més recents mostren una falta d'associació entre els resultats de fragmentació de l'ADN mesurada en l'ejaculat utilitzant les tècniques SCD i TUNEL, i el desenvolupament embrionari preimplantacional o la taxa implantació (Bach i Schlegel, 2016; Esbert *et al.*, 2011). Aquests resultats discordants s'atribueixen al biaix causat en la selecció d'aquests espermatozoides respecte l'anàlisi en la mostra d'ejaculat. Amb l'objectiu de reduir al màxim aquest biaix, i davant la impossibilitat d'estudiar el mateix espermatozoide que s'utilitzarà per a la reproducció assistida, s'ha posat a punt un sistema de fixació d'espermatozoides seleccionats amb micromanipulador que permet l'anàlisi de trencaments en l'ADN sobre aquest subgrup cel·lular amb quatre tècniques diferents: Comet neutre, Comet alcalí, SCD i TUNEL.

El sistema desenvolupat (Figura 1) ha donat lloc a una eficiència d'anàlisi del 77% de mitjana (Taula 1). D'una banda, aquesta aproximació mostra una reducció estadísticament significativa de la fragmentació de cadena senzilla de l'ADN espermàtic en relació a la mostra d'ejaculat i swim-up (Taula 1 i Figura 2), fet que posa de manifest la diferència entre la mostra d'ejaculat

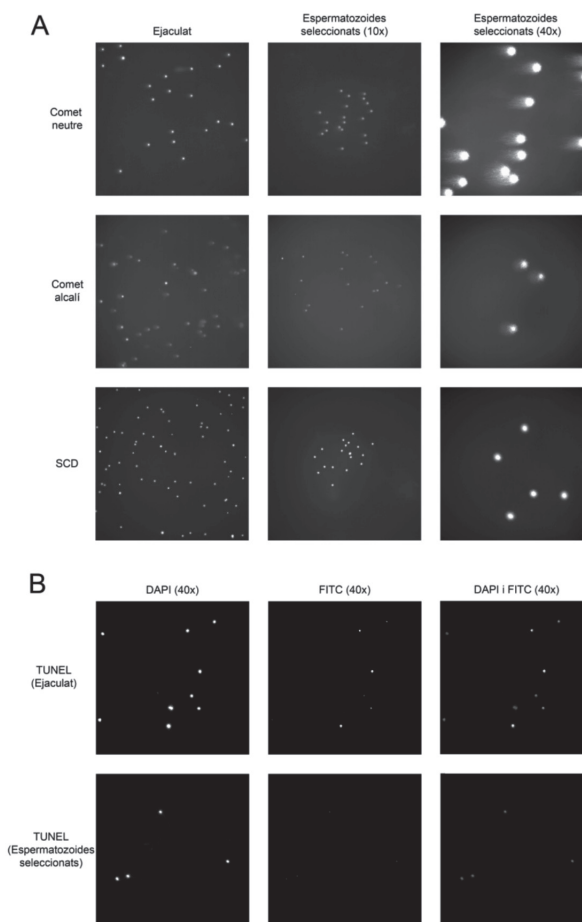


Figura 1. Fragmentació de l'ADN espermàtic de cadena doble estudiat amb Comet neutre (A). Fragmentació de cadena senzilla estudiat mitjançant Comet alcalí i SCD (A) i TUNEL (B).

i els espermatozoides utilitzats en ICSI. Aquest resultat podria donar explicació a la falta d'associació entre la fragmentació de l'ADN mesurada mitjançant SCD o TUNEL en ejaculat i les taxes de implantació en cicles de ICSI (Bach i Schlegel, 2016; Esbert *et al.* 2011). En diversos estudis s'han relacionat els trencaments de cadena senzilla de l'ADN espermàtic mesurats amb Comet alcalí, SCD i TUNEL amb la motilitat progressiva i la morfologia espermàtica (Aitken i De Iuliis, 2010; Ribas-Maynou *et al.* 2012a; Simon i Lewis, 2011). Així doncs, una reducció d'aquest tipus de trencaments és esperable al seleccionar un subgrup d'espermatozoides amb bona motilitat i morfologia.

D'altra banda, no s'ha observat una reducció de la fragmentació de cadena doble en mostres d'espermatozoides seleccionats sota criteris d'ICSI respecte la mostra d'ejaculat i de swim-up (Taula 1 i Figura 2). Així doncs, el percentatge d'espermatozoides amb alteracions del tipus dsSDF en la mostra d'ejaculat i en el subgrup d'ICSI sembla ser similar, evidenciant que aquest tipus de dany podria ser el majoritari en els espermatozoides utilitzats per a fecundar en ICSI. En aquest sentit, estudis previs del nostre centre mostren una associació entre els trencaments de cadena doble amb una cinètica embrionària més lenta, pitjors taxes d'implantació en tractaments de ICSI (A Casanovas, dades no publicades) i major incidència d'avortaments (Ribas-Maynou *et al.*, 2012b)..

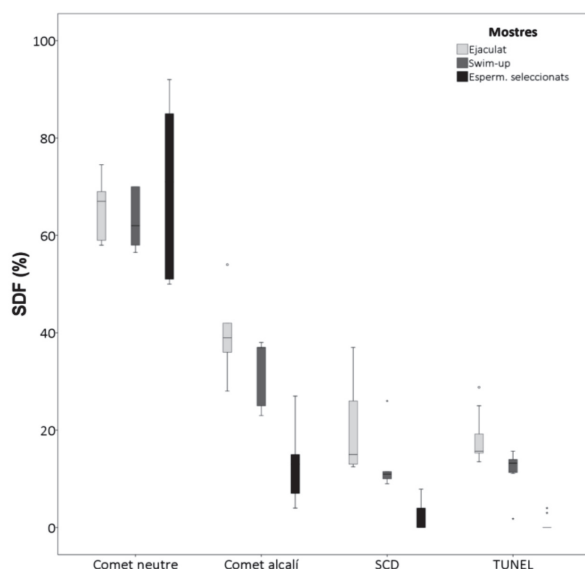


Figura 2. Comparativa dels valors de fragmentació de l'ADN espermàtic (SDF%) amb Comet neutre (n=5), Comet alcalí (n=5), SCD (n=6) i TUNEL (n=9) en mostres d'ejaculat, mostres després del swim-up i en espermatozoides seleccionats sota criteris d'ICSI.

CONCLUSIÓ

La fragmentació de l'ADN espermàtic de cadena doble, i no la de cadena senzilla, podria representar el risc predominant d'alteració del material genètic masculí en parelles que se sotmeten a cicles d'ICSI. La ampliació del grup d'estudi amb més pacients analitzats amb les quatre tècniques de fragmentació de l'ADN espermàtic és necessària per a la confirmació dels presents resultats.

REFERÈNCIES

- Aitken, RJ [et al.] 2013. "The Source and Significance of DNA Damage in Human Spermatozoa; a Commentary on Diagnostic Strategies and Straw Man Fallacies." *Mol Hum Reprod* 19(8): 475–85.
- Aitken, RJ and GN De Iuliis. 2010. "On the Possible Origins of DNA Damage in Human Spermatozoa." *Mol Hum Reprod*. 16(1): 3–13.
- Bach, PV [et al.] 2016. "Sperm DNA Damage and Its Role in IVF and ICSI." *Basic Clin Androl* 26(1): 1–10.
- Calhaz-Jorge, C [et al.] 2016. "Assisted Reproductive Technology in Europe, 2012: Results Generated from European Registers by ESHRE." *Human Reproduction* 31(8): 1638–52.
- Esbert, M [et al.] 2011. "Impact of Sperm DNA Fragmentation on the Outcome of IVF with Own or Donated Oocytes." *Reproductive BioMedicine Online* 23(6): 704–10.
- Jungwirth, A [et al.] 2012. "Male Infertility." *European Urology* 62(2): 324–32.
- Lewis, SEM [et al.] 2013. "The Impact of Sperm DNA Damage in Assisted Conception and beyond: Recent Advances in Diagnosis and Treatment." *Reproductive BioMedicine Online* 27(4): 325–37.
- Li, Z [et al.] 2016. "DNA Mismatch Repair and the DNA Damage Response." *DNA Repair (Amst)* 38: 94–101.
- Pastuszek, E [et al.] 2017. "An Investigation of the Potential Effect of Sperm Nuclear Vacuoles in Human Spermatozoa on DNA Fragmentation Using a Neutral and Alkaline Comet Assay." *Andrology* (5): 392–98.
- Registro Nacional de Actividad. 2014. "Informe Estadístico de Técnicas de Reproducción Asistida." *Registro SEF*: 0–48.
- Ribas-Maynou, J [et al.] 2012a. "Double Stranded Sperm DNA Breaks, Measured by Comet Assay, Are Associated with Unexplained Recurrent Miscarriage in Couples without a Female Factor." *PLoS ONE* 7(9).

- Ribas-Maynou, J [*et al.*] 2012b. "Alkaline and Neutral Comet Assay Profiles of Sperm DNA Damage in Clinical Groups." *Human Reproduction* 27(3): 652–58.
- Ribas-Maynou, J [*et al.*] 2013. "Comprehensive Analysis of Sperm DNA Fragmentation by Five Different Assays: TUNEL Assay, SCSA, SCD Test and Alkaline and Neutral Comet Assay." *Andrology* 1(5): 715–22.
- Sheikh, N [*et al.*] 2008. "Correlation between Sperm Parameters and Sperm DNA Fragmentation in Fertile and Infertile Men." *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 6(1): 13–18.
- Simon, L [*et al.*] 2016. "A Systematic Review and Meta-Analysis to Determine the Effect of Sperm DNA Damage on in Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection Outcome." *Asian journal of andrology* (February): 1–11.
- Simon, L and SEM Lewis. 2011. "Sperm DNA Damage or Progressive Motility: Which One Is the Better Predictor of Fertilization in Vitro?" *Systems biology in reproductive medicine* 57(3): 133–38.
- Watanabe, S [*et al.*]. 2011. "An Investigation of the Potential Effect of Vacuoles in Human Sperm on DNA Damage Using a Chromosome Assay and the TUNEL Assay." *Human Reproduction* 26(5): 978–86.

ANÀLISI DE FRAGMENTACIÓ DEL DNA ESPERMÀTIC MITJANÇANT L'ASSAIG COMET ALCALÍ I NEUTRE: APLICACIÓ D'UN SOFTWARE D'ANÀLISI COMPUTERITZADA

Sergio Garcia-Segura¹, Jordi Ribas-Maynou², Agustí Garcia-Peiró², Jordi Benet^{1*}

¹Departament de Biologia Cel·lular Fisiologia i Immunologia. Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica. Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.

²CIMAB, Centre de Infertilitat Masculina i Anàlisis de Barcelona, Parc de Recerca de la UAB, Campus de la UAB, 08193 Bellaterra, Barcelona.

Sergio.Garcia.Segura@uab.cat, Jordi.Benet@uab.cat

Resum

Estudis recents relacionen la fragmentació del DNA espermàtic de cadena senzilla (ssSDF) amb la capacitat d'aconseguir un embaràs de forma natural i la fragmentació de cadena doble (dsSDF) amb un risc incrementat d'avortaments. L'assaig Comet permet analitzar aquests dos tipus de dany mitjançant condicions alcalines per valorar la ssSDF i condicions neutres per la dsSDF. El present estudi té l'objectiu d'incorporar l'anàlisi computeritzada per estandarditzar la valoració dels resultats de la tècnica i aportar informació diagnòstica addicional. S'ha utilitzat el software Komet 7 per a capturar les imatges de l'assaig Comet, el qual calcula diferents paràmetres que mesuren la intensitat del dany al DNA. Aquest software s'ha posat a prova per a diverses variables i s'ha estudiat el perfil d'integritat del DNA espermàtic en diferents grups clínics. La posada a punt ha permès determinar que els paràmetres amb menys variació experimental en l'anàlisi de SDF són *Tail DNA*, *Tail Extent Moment*, *Olive Tail Moment* i *Tail Length*, amb els quals s'ha comprovat que l'anàlisi computeritzada aporta informació addicional al percentatge d'espermatozoides amb dany al DNA. L'anàlisi de fragmentació de DNA en 21 donants i 33 pacients infèrtils ha mostrat que la taxa d'avortaments depèn del percentatge d'espermatozoides amb dsSDF però no de la seva intensitat del dany, que es similar entre els pacients amb avortaments recurrents i la resta de grups clínics.

Paraules clau: fragmentació del DNA espermàtic; assaig Comet; anàlisi computacional.

Abstract

Current studies relate single strand sperm DNA fragmentation (ssSDF) with natural fertility and double strand sperm DNA fragmentation (dsSDF) with an increased risk of miscarriage. The Comet assay allows researchers to analyse these two types of damage by alkaline conditions to assess ssSDF and neutral conditions to assess dsSDF. This study aims to incorporate computerized analysis to standardize the assessment of the results of the technique and provide additional diagnostic information. Komet 7 software has been used to capture the images of the Comet assay, which has different parameters that measure the intensity of damage to DNA. This software has been tested by several variables and has studied the sperm DNA integrity profile in different clinical groups. The set-up allowed us to determine that the parameters with less experimental variation in SDF analysis are *Tail DNA*, *Tail Extent Moment*, *Olive Tail Moment* and *Tail Length*, which have verified that the computerized analysis provides additional information to percentage of sperm with DNA damage. DNA fragmentation analysis in 21 controls and 33 infertile patients showed that the miscarriage rate depends on the percentage of sperm with dsSDF but not the intensity of the damage, which is similar in patients with recurrent miscarriage and other clinical groups.

Key words: sperm DNA fragmentation; Comet assay; computerized analysis.

INTRODUCCIÓ

La infertilitat és una malaltia multifactorial on s'estima que aproximadament el 50% dels casos tenen un origen masculí (de Kretser, 1997). El seminograma és la eina bàsica d'anàlisi dels paràmetres seminals però el seu

valor diagnòstic es limitat (Lewis, 2007), pel que actualment s'exploren altres tests enfocats a estudiar els factors genètics. Una de les últimes tecnologies d'anàlisi més prometedores és l'estudi de la fragmentació del DNA espermàtic (SDF), el qual s'ha relacionat inversament amb diversos indicadors de salut reproductiva

com la taxa de fertilització, la d'implantació o la d'avortaments espontanis de repetició (Zini *et al.*, 2008; Lewis i Simon, 2010; Ribas-Maynou *et al.*, 2012a i 2012b). Una reducció de la integritat del DNA s'ha associat amb anomalies cromosòmiques i algunes malalties genètiques en els nounats com càncer infantil, leucèmies o autisme (Aitken *et al.*, 2009; Lewis i Simon, 2010).

Per estudiar la SDF s'han desenvolupat diverses metodologies que permeten quantificar el percentatge d'espermatozoides amb el DNA fragmentat i el dany del DNA nuclear, com l'assaig *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL), el *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA), el *Sperm Chromatin Dispersion test* (SCD) o l'assaig Comet. Ara bé, s'ha evidenciat una gran variabilitat en els resultats d'aquestes tècniques, en gran part perquè encara no han estat estandarditzades i algunes presenten major sensibilitat que d'altres (Ribas-Maynou *et al.*, 2013). Aquella que sembla tenir una major sensibilitat i especificitat per detectar els nivells de fragmentació del DNA és l'assaig Comet, que consisteix en realitzar sobre les cèl·lules una lisi proteica i la descompactació del DNA en una matriu d'agarosa formant un halo de fibres de DNA. Posteriorment s'aplica una electroforesi en cèl·lula única per a que el material genètic fragmentat migri cap al pol positiu, formant una cua similar a un cometa, on la seva llargària i intensitat està directament relacionada a la intensitat del dany del DNA. És la única tècnica que permet una mesura quantitativa del dany del DNA en cada cèl·lula de forma individual (Lewis i Simon, 2010). L'assaig Comet es pot realitzar a pH alcalí, on es detecten trencaments de cadena senzilla, o a pH neutre, que majoritàriament detecta trencaments de cadena doble. Estudis recents han correlacionat la fragmentació de cadena senzilla del DNA espermàtic (ssSDF) amb la capacitat d'embaràs natural i la fragmentació de cadena doble del DNA espermàtic (dsSDF) amb el risc d'avortaments de repetició, a més han permès diferenciar dos perfils d'individus fèrtils segons els nivells de fragmentació de cadena doble que presenten (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a).

L'objectiu d'aquest estudi ha estat estandarditzar l'assaig Comet mitjançant la posada a punt d'un software d'anàlisi computeritzada per a la fragmentació del DNA espermàtic i comprovar el seu valor per al diagnòstic clínic de la infertilitat masculina comparant l'anàlisi convencional i la computeritzada.

MATERIALS I MÈTODES

Obtenció de les mostres espermàtiques

S'han recollit mostres seminals de 21 donants de banc de semen amb fertilitat provada i 38 pacients amb pro-

blemes de fertilitat procedents de centres de reproducció i hospitals de l'àrea de Barcelona; dels quals 13 presenten fallades d'implantació embrionària (FI), 12 presenten avortaments de repetició (AR), 13 idiopàtics (ID). Tots els donants van signar el consentiment informat i l'estudi va ser aprovat pel corresponent comitè ètic. Les mostres van ser obtingudes amb un mínim de 3 dies d'abstinència sexual i criopreservats en test-yolk buffer (14% glicerol, 30% rovell d'ou, 1,98% glucosa, 1,72% citrat sòdic) fins el seu anàlisi. Per a la posada a punt del software van ser utilitzades 5 mostres de pacients (3 FI, 1AR i 1 ID) combinades en una sola mostra per evitar variacions inter-individu. El valor clínic pels diferents paràmetres del software va analitzar-se utilitzant la resta de mostres.

Anàlisi de la fragmentació del DNA espermàtic

Per a l'anàlisi convencional, les mostres seminals de cada individu han estat analitzades mitjançant l'assaig Comet tant en condicions alcalines com neutres d'acord a la metodologia descrita anteriorment (Ribas-Maynou *et al.*, 2012b). Per a l'anàlisi computeritzat, s'han emprat les mateixes extensions cel·lulars, la captació d'imatges s'ha fet mitjançant una càmera Zyla 5.5 (Andor Technology, Ulster, UK) integrada a un microscopi de fluorescència Olympus Provis AX70 (Olympus Corporation, Tokio, JP) i a un ordinador amb el software Komet 7.0.1 (Andor Technology, Ulster, UK), el qual permet obtenir un total de 34 paràmetres basats en la intensitat de llum fluorescent i la forma de la electroforesi de cada cèl·lula individual.

Per a la posada a punt de l'anàlisi informàtic s'han valorat les següents variables: a) temps d'exposició de les captures, b) mida de l'àrea de la regió d'interès (ROI), c) número mínim de cèl·lules a analitzar, d) ubicació de la extensió en el portaobjectes, e) temps de gel·lificació del portaobjectes i f) temps entre la tinció i l'anàlisi.

Per a l'anàlisi de la SDF en grups control i clínics s'han analitzat 100 espermatozoides per a cada mètode Comet, mantenint controlades les variables estudiades (veure Discussió). La valoració s'ha fet mitjançant el mètode convencional (càlcul del percentatge d'espermatozoides amb SDF) i el mètode computeritzat mitjançant els paràmetres *Tail DNA* (TD), *Tail Extent Moment* (TEM), *Olive Tail Moment* (OTM) i *Tail Length* (TL) del software Komet 7 tal i com s'ha justificat a la discussió.

Anàlisi estadística

S'ha utilitzat el programa informàtic SPSS Statistics v22.0 (Statistic Package for Social Science, SPSS Inc,

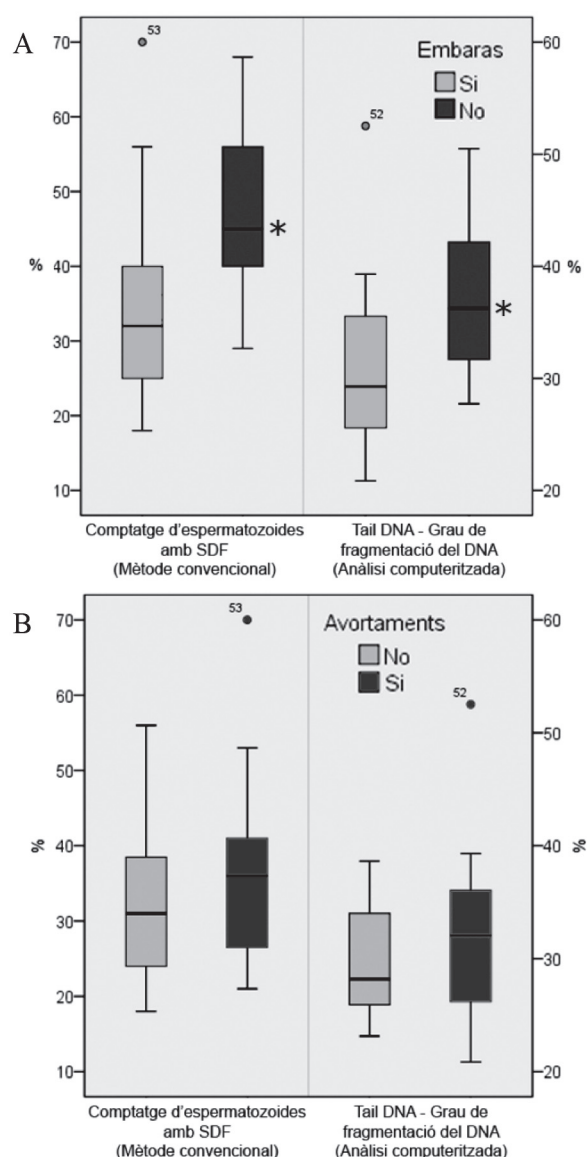


Figura 1. Fragmentació de cadena senzilla del DNA espermàtic: embarassos i avortaments. (A) Comparació del percentatge d'espermatozoides amb ssSDF (esquerra) i el percentatge de DNA a la cua dels Comets (dreta) entre donants/pacients amb embaràs o no. (B) Percentatge d'espermatozoides amb ssSDF (esquerra) i percentatge de DNA fragmentat (dreta) entre pacients amb avortaments o no. *diferències significatives $p < 0,05$.

Chicago, IL, USA) per a realitzar els estudis de normalitat amb els tests Shapiro-Wilk i Kolmogorov-Smirnov, els estudis comparatius amb els tests U de Mann-Whitney, Kluskal-Wallis i Wilcoxon; i els estudis de correlació amb el coeficient de correlació de Spearman. Per a tots els tests estadístics es va considerar un nivell de significació de 0,05.

RESULTATS

Posada a punt del software Komet 7

Dels 34 paràmetres que calcula el software per a cada captura, s'ha determinat que els paràmetres que tenen una menor variació per les variables estudiades en l'anàlisi de la SDF han estat TD, TEM, OTM i TL (resultats sense detallar). Cap d'aquests paràmetres es veu alterat al variar el temps d'exposició de les captures, la ubicació de l'extensió en el portaobjectes o el temps entre la tinció i l'anàlisi de la mostra, i capturant 100 espermatozoides per mostra només es comet un error proper al 5%. Tot i així, aquests quatre paràmetres mostraven variacions si es modificava la mida de la ROI i el temps de preparació del gel electroforètic sobre el portaobjectes, paràmetres estandarditzats al laboratori.

Relació de la SDF amb embarassos i avortaments pel mètode d'anàlisi convencional i el computacional

L'anàlisi convencional de l'assaig Comet, que consisteix en calcular el percentatge d'espermatozoides amb SDF de la mostra, ha posat de manifest que els individus que han donat lloc a un embaràs (donants i pacients amb AR) presenten una mediana de 32% d'espermatozoides amb ssSDF i una mediana de 56% d'espermatozoides amb dsSDF, mentre que els pacients que no aconsegueixen cap sac gestacional (idiopàtics i FI) presenten una mediana de 45% d'espermatozoides amb ssSDF (significativament més elevat que per als que aconsegueixen embaràs, $p < 0.001$) i de 66% amb dsSDF (Taula 1). També s'ha pogut observar que els pacients amb AR presenten un 66% d'espermatozoides amb dsSDF, significativament superior ($p < 0.05$) als 41% de mediana que presenten els donants.

Els resultats de l'anàlisi computacional es mostren a la taula 1. Tots els paràmetres presenten una distribució molt semblant per a cadascun dels grups analitzats i per a l'anàlisi convencional, excepte per al grau de dsSDF en els pacients amb AR, que no presenta diferències amb els donants (Figura 2B). A les figures 1 i 2 es mostren els valors del paràmetre TD com a representatiu dels resultats obtinguts pel mètode computacional i els obtinguts amb el mètode convencional.

DISCUSSIÓ

L'anàlisi computeritzada de la SDF pretén estandarditzar la valoració de l'assaig Comet i millorar el diagnòstic aportant informació addicional a la obtinguda mitjançant l'anàlisi convencional (percentatge de espermatozoides amb SDF). La posada a punt ha permès identificar al-

Taula 1. Percentatge d'espermatozoides amb fragmentació (anàlisi convencional, %Z) i intensitat del dany del DNA que presenten els espermatozoides (anàlisi computacional). Mediane i rangs de l'anàlisi convencional i dels valors dels paràmetres del software per a cada grup clínic. S'indiquen els resultats per al Comet alcalí, ssSDF (S) i per al neutre, dsSDF (D).

		Embaràs		Avortaments	
		No	Si	No	Si
%Z	S	45,00 (40,00 – 56,00)	32,00 (25,00 – 40,00)	31,00 (23,00 – 39,00)	36,00 (26,00 – 42,00)
	D	66,00 (55,00 – 75,00)	56,00 (38,00 – 74,00)	41,00 (33,00 – 74,00)	66,00 (54,00 – 81,00)
TD	S	36,24 (31,68 – 42,17)	29,27 (25,59 – 35,53)	28,19 (25,59 – 35,32)	32,04 (24,81 – 36,61)
	D	15,81 (13,38 – 16,68)	16,28 (13,81 – 19,10)	16,61 (13,26 – 18,70)	16,14 (14,37 – 19,10)
TEM	S	2,10 (1,66 – 2,25)	1,52 (1,32 – 1,94)	1,44 (1,19 – 1,99)	1,69 (1,34 – 1,94)
	D	0,72 (0,53 – 0,82)	0,81 (0,55 – 1,02)	0,82 (0,54 – 1,00)	0,80 (0,61 – 1,21)
OTM	S	0,79 (0,68 – 1,02)	0,62 (0,53 – 0,80)	0,60 (0,53 – 0,79)	0,67 (0,55 – 0,81)
	D	0,27 (0,21 – 0,29)	0,30 (0,23 – 0,37)	0,30 (0,23 – 0,36)	0,29 (0,24 – 0,46)
TL	S	5,46 (5,27 – 5,93)	5,22 (4,82 – 5,43)	5,17 (4,58 – 5,50)	5,25 (4,98 – 5,43)
	D	4,74 (4,00 – 5,30)	4,78 (4,12 – 5,50)	4,82 (4,04 – 5,31)	4,78 (4,22 – 6,01)

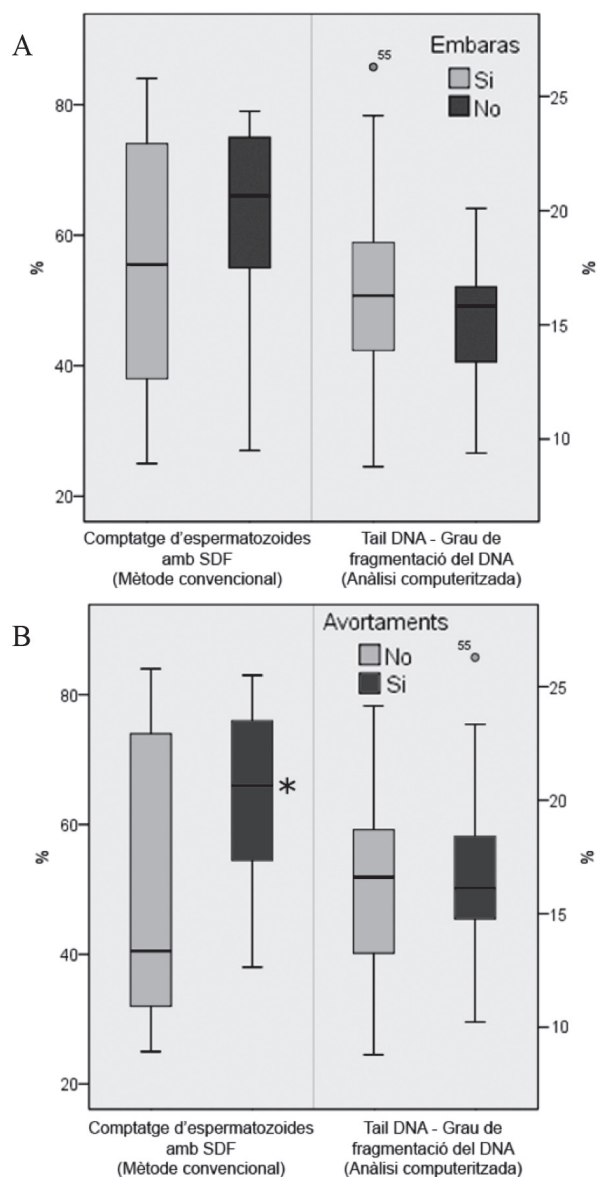


Figura 2. Fragmentació de cadena doble del DNA espermàtic: embarassos i avortaments. (A) Comparació del percentatge d'espermatozoides amb dsSDF (esquerra) i del percentatge de DNA a la cua dels Comets (dreta) entre donants/pacients amb embaràs o no. (B) Percentatge d'espermatozoides amb ssSDF (esquerra) i percentatge de DNA fragmentat (dreta) entre pacients amb avortaments o no. *diferències significatives $p < 0,05$.

guns passos crítics en el protocol i l'anàlisi fet amb el software que cal tenir en compte per tal d'evitar variacions inter-individu. Les diferències trobades segons el temps trigat en la gelificació del portaobjectes indiquen que cal mantenir-lo constant per evitar variacions en els resultats. Les variacions observades utilitzant diferents mides de la ROI quan es capturen les imatges amb el software poden estar causades per la captació de senyals inespecífiques, pel que es recomana ajustar la ROI al mínim possible dels marges del cometa per tal de minimitzar al màxim aquest error en l'anàlisi. Mantenant aquestes dues variables controlades, els paràmetres TD, TEM, OTM i TL són els menys afectats per variables externes i els més eficients per analitzar la intensitat del dany al DNA espermàtic. Els quatre paràmetres escollits han estat utilitzats i recomanats per a estudis de dosimetria biològica o toxicologia genètica en càncer o radiacions ionitzants (Tice *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2013).

L'optimització de l'assaig Comet ha estat i encara és un objectiu important a resoldre. Recentment s'ha proposat estandarditzar els diferents passos de la metodologia, ja sigui homogeneïtzant el protocol de l'assaig automatitzant el procés (HT-Comet) (Albert *et al.*, 2016) o, com el present estudi, incorporant un software d'anàlisi que estandarditzi la valoració dels resultats (Simon *et al.*, 2017). Aquests autors coincideixen a destacar el valor clínic del percentatge d'espermatozoides

amb SDF així com a escollir els paràmetres TD i OTM que també s'han seleccionat en el present treball.

Utilitzant aquests paràmetres per valorar els resultats dels assaig Comet es veu que els pacients que no aconsegueixen un sac gestacional presenten un percentatge d'espermatozoides amb ssSDF i una intensitat del dany de cadena simple al DNA més elevada que els que aconsegueixen embaràs ($p < 0,05$) (Figura 1A), però mostren uns nivells de dsSDF semblants (Figura 2A). Aquests resultats recolzen la hipòtesi de que la ssSDF és informativa de la taxa de fertilitat dels individus de la població, tant si és avaluada mitjançant el percentatge d'espermatozoides afectats com per la intensitat del dany al DNA espermàtic (Lewis i Simon, 2010; Simon *et al.*, 2010). En relació als individus que aconsegueixen embarassos, els pacients amb avortaments presenten un major percentatge d'espermatozoides amb dsSDF ($p < 0,05$) (Figura 2B) però una intensitat de dany de doble cadena similar als donants de fertilitat coneguda (Figura 2A), fet que recolza la hipòtesi de que la dsSDF és informativa de la taxa d'avortaments dels individus de la població (Ribas-Maynou *et al.*, 2012a) i suggerint que podria ser més rellevant la quantitat d'espermatozoides amb dany de cadena doble del DNA que la intensitat d'aquest dany. En aquest sentit, en relació a patir un avortament, pot ser tan deleteri un trencament que afecti un fragment cromosòmic que múltiples trencaments que afectin el mateix fragment. En tots dos casos produeix un efecte similar, de fet, tant petites com grans delecions poden provocar pèrdua de gens importants per al desenvolupament embrionari o reorganitzacions cromosòmiques relacionades amb avortaments de repetició (Varga i Aplan, 2005; Stephenson i Sierra, 2006; Fort i Schust, 2009; Ocak *et al.*, 2013).

Així doncs, l'estandardització de l'assaig Comet alcalí i neutre per a l'anàlisi de la fragmentació del DNA espermàtic millora la informació aportada per al diagnòstic de pacients infèrtils, especialment en la taxa d'embaràs per al Comet alcalí i en la taxa d'avortaments per al Comet neutre.

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha rebut suport econòmic de ISCIII i FEDER (projecte PI14-00119) i de la Generalitat de Catalunya (projecte 2014SGR-0903). S. Garcia és beneficiari de una beca PIF 2016 de la UAB.

BIBLIOGRAFIA

Aitken, R.J. [et al.] (2009). «Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line».

International Journal of Andrology, vol. 32, núm. 1, p. 46-56.

Albert, O. [et al.] (2016). «HT-COMET: a novel automated approach for high throughput assessment of human sperm chromatin quality». *Human Reproduction*, vol. 31, núm. 5, p. 938-946.

de Kretser, D.M. (1997). «Male infertility». *Lancet*, vol. 349, núm. 9054, p. 787-790.

Ford, H.B. i Schust, D.J. (2009). «Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy». *Reviews in obstetrics & gynecology*, vol. 2, núm. 2, p. 76-83.

Lewis, S.E.M. (2007). «Is sperm evaluation useful in predicting human fertility?». *Reproduction*, vol. 134, núm. 1, p. 31-40.

Lewis, S.E.M. i Simon, L. (2010). «Clinical implications of sperm DNA damage». *Human fertility*, vol. 13, núm. 4, p. 201-207.

Ocak, Z. [et al.] (2013). «Association of recurrent pregnancy loss with chromosomal abnormalities and hereditary thrombophilias». *African health sciences*, vol. 13, núm. 2, p. 447-452.

Ribas-Maynou, J. [et al.] (2012). «Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups». *Human Reproduction*, vol. 27, núm. 3, p. 652-658.

Ribas-Maynou, J. [et al.] (2012). «Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet Assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor». *PLoS ONE*, vol. 7, núm. 9, e44679.

Ribas-Maynou, J. [et al.] (2013). «Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay». *Andrology*, vol. 1, núm. 5, p. 715-722.

Simon, L. [et al.] (2017). «Sperm DNA damage output parameters measured by the alkaline Comet assay and their importance». *Andrologia*, vol. 49, núm. 2, e12608.

Simon, L. [et al.] (2010). «Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome». *Human Reproduction*, vol. 25, núm. 7, p. 1594-1608.

Stephenson, M.D. i Sierra, S. (2006). «Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement». *Human reproduction*, vol. 21, núm. 4, p. 1076-1082.

Tice, R.R. [et al.] (2000). «Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing». *Environmental and molecular mutagenesis*, vol. 35, núm. 3, p. 206-221.

Varga, T. i Aplan, P.D. (2005). «Chromosomal aberrations induced by double strand DNA breaks». *DNA repair*, vol. 4, núm. 9, p. 1038-1046.

- Wang, Y. [*et al.*] (2013). «Evaluation of the comet assay for assessing the dose-response relationship of DNA damage induced by ionizing radiation». *International journal of molecular sciences*, vol. 14, núm. 11, p. 22449-22461.
- Zini, A. [*et al.*] (2008). «Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis». *Human reproduction*, vol. 23, núm. 12, p. 2663-2668.

ANÀLISI DEL PERCENTATGE D'ESPERMATOZOIDES MÒBILS PROGRESSIUS PRE I POST-CRIOPRESERVACIÓ/DESCONGELACIÓ I SUPERVIVÈNCIA ESPERMÀTICA EN PACIENTS NORMOZOOSPÈRMICS

Carla Selva Viñals*, Mark Grossmann i Camps, Anna Rabanal Anglada, Cristina Guix Galcerán, Olga Serra Ortiz, Raúl Olivares Vela, Luis Zamora Corzo

Barcelona IVF. www.barcelonaivf.com

08017 Barcelona. laboratorio@bcnivf.com; mark.grossmann@bcnivf.com; anna.rabanal@bcnivf.com

Resum

La criopreservació de mostra seminal és una pràctica rutinària en els centres de reproducció assistida tot i que encara no s'han aconseguit uns protocols òptims que permetin recuperar una elevada concentració d'espermatozoides mòbils. L'objectiu d'aquest estudi és determinar la motilitat pre-criopreservació i post-descongelació i la supervivència d'espermatozoides mòbils progressius. Es tracta d'un estudi retrospectiu que inclou 143 mostres de pacients normozoospermics que han estat criopreservades mitjançant SpermCryoProtecII™ i emmagatzemades en nitrogen líquid.

Els resultats obtinguts mostren una disminució en la motilitat progressiva (23,9% motilitat A+B post-descongelació respecte d'un 53,4% motilitat A+B pre-criopreservació) i una taxa de supervivència d'espermatozoides mòbils del 44,7% post-descongelació.

Paraules clau: Criopreservació; motilitat espermàtica pre-criopreservació; motilitat espermàtica post-descongelació; supervivència espermàtica.

Abstract

Sperm cryopreservation is a daily routine practice in most assisted reproduction centres although optimal and standardized protocols which preserve sperm motility have not been achieved yet. The main goal of the present study is to determine pre-freeze and post-thaw motility and the survival of progressive motile sperm. This retrospective study involves 143 semen samples of normozoospermic patients frozen with Sperm CryoProtecII™ and stored into liquid nitrogen. The results obtained show a decrease in progressive motility (23,9% post-thaw A+B motility versus 53,4% pre-freeze A+B motility) and a motile sperm survival rate of 44,7% after thawing.

Key words: Cryopreservation; pre-freeze sperm motility; post-thaw sperm motility; sperm survival.

INTRODUCCIÓ

Actualment la criopreservació de mostra seminal és una pràctica comuna en els centres de reproducció assistida i a la pràctica clínica. Els motius per decidir criopreservar una mostra poden anar des de la preservació de la fertilitat en situacions de càncer, quimioteràpia o intervenció quirúrgica, fins a casos on hi ha dificultat en la obtenció de la mostra el dia de la inseminació oocitària.

Les mostres es poden mantenir criopreservades sota les condicions adients llargs períodes de temps sense que les seves característiques, com motilitat i viabilitat, es vegin afectades (Rofeim *et al.*, 2005).

Existeixen diferents protocols de criopreservació-descongelació i diferents solucions que contenen crio-

protectors, però en els darrers anys hi ha hagut pocs avenços pel que fa a la millora de la supervivència espermàtica post-descongelació, de manera que la congelació de mostra seminal encara no es troba en el seu punt òptim (Fabozzi *et al.*, 2016; Omes *et al.*, 2013).

L'objectiu d'aquest estudi és determinar la diferència entre la motilitat d'una mostra abans de criopreservar-la i la mateixa mostra després de descongelar; així com establir els valors de supervivència d'espermatozoides mòbils en mostres normozoospermiques.

MATERIAL I MÈTODES

Estudi retrospectiu de 143 mostres seminals analitzades en fresc i després de criopreservar i descongelar.

Els 143 pacients inclosos en l'estudi eren individus amb mostres normozoospermiques, segons els criteris establerts per la OMS (WHO, 2010), en les que es descartava el factor masculí com a causant de l'esterilitat de la parella.

Les mostres eren analitzades en fresc el dia de la criopreservació abans de procedir a realitzar aquest procés, i després re-analitzades el dia de la descongelació. Les mostres van ser descongelades abans d'1 any i posteriorment varen ser utilitzades per a realitzar ICSI.

Comptatge de la mobilitat espermàtica

El comptatge de la mobilitat espermàtica es va realitzar mitjançant cambra Makler i segons els criteris publicats al manual de la OMS. Per valorar el percentatge de motilitat i totes les anàlisis es varen tenir en compte els espermatozoides mòbils progressius o espermatozoides amb mobilitat tipus A + B.

Les mostres es varen valorar un cop liquades a temperatura ambient (mínim 20 minuts després de l'obtenció).

Criopreservació de les mostres seminals

Les mostres es criopreservaren sense processar utilitzant la solució SpermCryoProtecII™ en dilució 1:3. Primerament es va afegir la solució a la mostra, seguidament es varen carregar les palletes (CBS®) de 0,5mL i es varen deixar en vapors de N₂L durant 20 min. Finalment les palletes es varen submergir en nitrogen líquid i emmagatzemar submergides en un tanc de nitrogen.

Descongelació de les mostres seminals

El dia de la inseminació oocitària, les mostres varen ser descongelades en una superfície calefactada durant 7 min i posteriorment es va valorar la motilitat mitjançant la cambra de comptatge. Finalment es varen processar per la posterior ICSI.

Anàlisi estadística

Les dades es van analitzar estadísticament mitjançant estadística descriptiva i *t-test* de doble cua. Els valors

amb $P < 0,01$ varen ser considerats estadísticament significatius.

RESULTATS

Motilitat en mostres fresques versus mostres congelades

S'analitzen un total de 286 mostres (en realitat 143 mostres en 2 moments diferents). La Taula 1 mostra l'anàlisi de la motilitat en percentatges de la mostra en fresc i l'anàlisi de la motilitat de la mateixa mostra un cop congelada i descongelada. Cada fila de les 4 columnes que es llisten es refereix a la mateixa mostra en diferents moments (pre i post-congelació-descongelació, i supervivència).

La mitjana de la motilitat (espermatozoides A+B) de les mostres fresques analitzades és de 53,4% mentre que la mitjana en les mateixes mostres però criopreservades i després descongelades és de 23,9% (Taula 2). El màxim percentatge d'espermatozoides mòbils en fresc és de 85,7% i el mínim és de 19,6%, mentre que en les mostres congelades/descongelades el màxim correspon a un percentatge del 57,9% i el mínim del 3% (Taula 2).

L'anàlisi estadística de la motilitat en fresc comparada amb la motilitat post-descongelació mitjançant *t-test* mostra que hi ha diferències estadísticament significatives entre ambdues, tal i com s'il·lustra a la Figura 1.

Supervivència d'espermatozoides mòbils

La supervivència d'espermatozoides mòbils s'ha calculat a partir del percentatge d'espermatozoides mòbils recuperats post-congelació-descongelació i del percentatge de mòbils abans de la criopreservació (Taula 1).

La mitjana de supervivència d'espermatozoides mòbils és de 44,7% (Taula 3). El rang de supervivències és força ampli, entre el 5,6% i el 74,9% (Taula 3). La menor supervivència rau en la baixa concentració d'espermatozoides mòbils recuperats en aquesta mostra (3% d'espermatozoides mòbils progressius).

Taula 2. Estadística descriptiva de la motilitat A+B en mostres analitzades en fresc i després de congelar/descongelar.

Tipus Mostra	n	Mitjana Motilitat (±SEM)	Mediana	Mínim	Màxim
Mostra Fresca	143	53,4% (±1,1)	52,9%	19,6%	85,7%
Mostra Congelada/Descongelada	143	23,9% (±0,9)	23,7%	3%	5,5%

143 mostres analitzades pre-congelació/descongelació i post-congelació/descongelació.

Taula 1. Resultats del comptatge d'espermatozoides mòbils A+B en les mostres en fresc i en les mateixes mostres després de criopreservar i descongelar. Es mostren 4 columnes amb 3 subcolumnes cada una, cada fila de les 3 subcolumnes representa la mateixa mostra abans (A+B Fresc), després de congelar-descongelar (A+B Crio.) i la supervivència d'espermatozoides mòbils de la mostra després de congelar-descongelar.

A+B Fresc	A+B Crio,	Supervi-vència	A+B Fresc	A+B Crio,	Supervi-vència	A+B Fresc	A+B Crio,	Supervi-vència	A+B Fresc	A+B Crio,	Supervi-vència
64,37%	30,66%	47,63%	38,10%	20,77%	54,51%	50,20%	31,58%	62,91%	62,26%	25,00%	40,15%
51,72%	30,51%	58,99%	37,63%	24,68%	65,59%	44,08%	12,26%	27,81%	61,11%	24,15%	39,52%
50,00%	15,04%	30,08%	54,27%	13,46%	24,80%	63,06%	31,37%	49,75%	73,03%	39,04%	53,46%
56,67%	37,50%	66,17%	46,15%	22,18%	48,06%	75,59%	22,62%	29,92%	73,03%	37,50%	51,35%
47,78%	23,78%	49,77%	54,27%	25,00%	46,07%	43,46%	27,08%	62,31%	37,90%	28,31%	74,70%
59,57%	39,42%	66,17%	54,27%	30,39%	56,00%	79,37%	26,11%	32,90%	84,11%	38,64%	45,94%
55,13%	20,00%	36,28%	58,29%	25,64%	43,99%	74,59%	28,79%	38,60%	30,86%	15,91%	51,56%
36,89%	22,55%	61,13%	56,37%	25,60%	45,41%	63,86%	42,58%	66,68%	54,00%	23,53%	43,57%
41,18%	4,35%	10,56%	71,43%	43,21%	60,49%	45,13%	19,38%	42,94%	57,37%	29,10%	50,72%
50,74%	28,16%	55,50%	72,57%	17,76%	24,47%	52,33%	34,81%	66,52%	47,19%	26,76%	56,71%
37,23%	23,72%	63,71%	39,04%	4,30%	11,01%	60,30%	42,14%	69,88%	60,49%	39,89%	65,94%
62,86%	47,10%	74,93%	59,74%	20,93%	35,04%	60,30%	36,41%	60,38%	62,36%	15,73%	25,22%
50,48%	19,90%	39,42%	51,04%	7,48%	14,66%	68,07%	11,54%	16,95%	63,90%	23,70%	37,09%
40,00%	3,92%	9,80%	59,84%	25,60%	42,78%	58,54%	15,00%	25,62%	50,46%	17,98%	35,63%
41,32%	29,23%	70,74%	85,71%	27,27%	31,82%	70,97%	20,35%	28,67%	57,95%	8,00%	13,81%
81,32%	46,28%	56,91%	19,62%	7,18%	36,60%	52,31%	31,92%	61,02%	53,03%	25,09%	47,31%
61,59%	29,72%	48,25%	52,96%	30,00%	56,65%	70,83%	35,75%	50,47%	38,73%	21,43%	55,33%
38,11%	5,82%	15,27%	70,33%	14,13%	20,09%	35,00%	15,27%	43,63%	78,79%	38,52%	48,89%
52,05%	13,35%	25,65%	39,92%	16,67%	41,76%	25,23%	14,15%	56,08%	78,00%	44,26%	56,74%
43,83%	29,41%	67,10%	42,31%	20,00%	47,27%	39,13%	29,03%	74,19%	50,75%	38,05%	74,98%
40,00%	26,86%	67,15%	56,70%	20,97%	36,98%	64,71%	22,54%	34,83%	37,14%	15,15%	40,79%
50,00%	26,67%	53,34%	45,45%	20,50%	45,10%	53,85%	6,56%	12,18%	69,57%	48,50%	69,71%
39,44%	8,28%	20,99%	45,45%	20,69%	45,52%	80,00%	48,46%	60,58%	57,93%	18,53%	31,99%
51,78%	25,70%	49,63%	47,60%	18,43%	38,72%	68,42%	20,34%	29,73%	56,95%	12,75%	22,39%
40,14%	7,09%	17,66%	32,26%	18,66%	57,84%	61,64%	34,78%	56,42%	27,95%	5,21%	18,64%
42,47%	11,18%	26,32%	59,02%	32,96%	55,85%	68,16%	33,33%	48,90%	77,27%	37,13%	48,05%
46,95%	13,52%	28,80%	48,72%	27,60%	56,65%	49,58%	14,67%	29,59%	68,72%	35,51%	51,67%
37,11%	16,80%	45,27%	64,47%	13,70%	21,25%	68,89%	35,51%	51,55%	59,43%	22,52%	37,89%
42,06%	11,86%	28,20%	37,24%	7,04%	18,90%	63,11%	20,49%	32,47%	54,74%	25,00%	45,67%
32,46%	20,27%	62,45%	50,99%	13,73%	26,93%	60,76%	41,56%	68,40%	60,00%	33,33%	55,55%
25,98%	7,04%	27,10%	36,58%	18,21%	49,78%	55,13%	30,78%	55,83%	41,83%	31,30%	74,83%
62,34%	20,28%	32,53%	36,42%	25,46%	69,91%	50,15%	11,80%	23,53%	55,96%	18,84%	33,67%
35,87%	23,37%	65,15%	43,46%	27,08%	62,31%	75,89%	24,31%	32,03%	57,47%	36,11%	62,83%
35,87%	12,50%	34,85%	36,59%	5,34%	14,59%	49,78%	32,82%	65,93%	48,29%	18,08%	37,44%
51,43%	18,57%	36,11%	81,18%	57,93%	71,36%	53,51%	3,00%	5,61%	57,29%	29,49%	51,47%
38,10%	12,50%	32,81%	48,87%	28,49%	58,30%	45,90%	20,19%	43,99%			

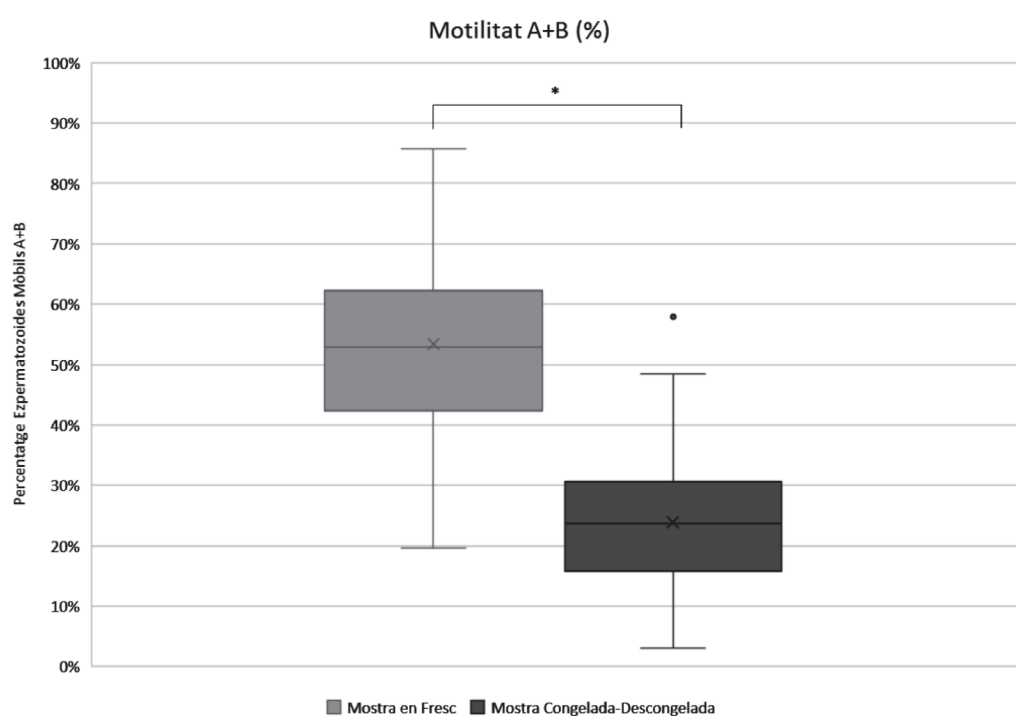


Figura 1. Representació gràfica del comptatge d'espermatozoides amb mobilitat de tipus A + B en les mostres abans de congelar i descongelar i després de congelar-descongelar. * $P < 0,01$.

Taula 3. Taxa de supervivència d'espermatozoides mòbils.

Supervivència Espermatozoides Mòbils	
Mitjana ($\pm$ SEM)	44,7% ($\pm$ 1,4)
Moda	62,3%
Mínim	5,6%
Màxim	74,9%

La Figura 2 mostra la taxa de supervivència d'espermatozoides mòbils de les 143 mostres analitzades agrupada per rangs de percentatge de mòbils recuperats. S'observa que, en la majoria de mostres, sobreviuen entre un 40 i un 60% dels espermatozoides mòbils en fresc.

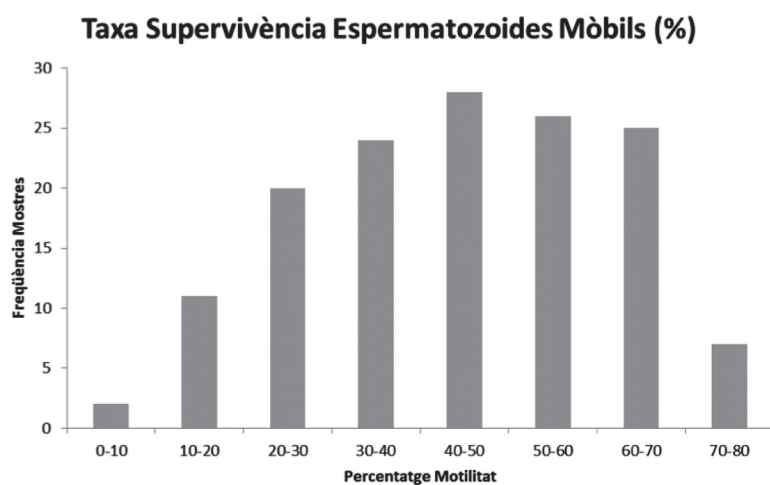


Figura 2. Taxa de supervivència d'espermatozoides mòbils post-descongelació segons freqüència.

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

La criopreservació de les mostres seminals té un efecte deleteri en els espermatozoides humans. En les mostres descongelades s'observa una disminució del percentatge d'espermatozoides mòbils i un augment dels espermatozoides immòbils (Ozkavukcu *et al.*, 2008); juntament a una disminució de la viabilitat espermàtica (Boitrelle *et al.*, 2012). A més, s'observa una alteració en la morfologia dels espermatozoides (Lee *et al.*, 2012) i en la proteòmica espermàtica (Bogle *et al.*, 2017).

En aquest estudi hem seleccionat mostres normozoospermiques per evitar que la qualitat intrínseca de la mostra seminal influís en la supervivència post-descongelació.

En aquest estudi es confirma la disminució del percentatge d'espermatozoides mòbils detectada en la literatura científica revisada, que passa de ser del 53,4% abans de criopreservar la mostra al 23,9% després de descongelar-la. No obstant, la taxa de supervivència d'espermatozoides mòbils obtinguda és del 44,7% front al 35% que es marca com a taxa desitjable en els quaderns d'embriologia clínica publicats per ASEBIR (Cuadernos de Embriología Clínica VI., 2016).

A pesar d'estudiar mostres normozoospermiques, encara s'observa una gran variabilitat en la supervivència dels espermatozoides mòbils descongelats. Malgrat la variabilitat interindividual pròpia de les mostres biològiques, atribuïm aquest fet a la tècnica de criopreservació, que podria ser millorada.

Atesa aquesta variabilitat interindividual considerem que els controls post-descongelació de les mostres segueixen essent necessaris ja que a partir d'aquests resultats no es pot preveure amb exactitud la taxa de supervivència i el percentatge d'espermatozoides mòbils en el moment de la descongelació.

Per altra banda, aquests estudis permeten determinar uns valors òptims amb els quals establir un control de qualitat dins el laboratori i permetran valorar la tècnica i el protocol de criopreservació i descongelació.

De cara al futur, seria interessant analitzar si els espermatozoides mòbils que han sobreviscut presenten efectes negatius degut a la congelació-descongelació, com ara una major fragmentació del DNA (Zribi *et al.*, 2012).

També seria interessant realitzar estudis per determinar si una baixa supervivència d'espermatozoides

post-criopreservació pot afectar l'èxit d'un tractament de reproducció assistida malgrat siguin mostres normozoospermiques en origen, o si el desenvolupament embrionari es modifica segons s'usi mostra congelada o mostra fresca en les inseminacions d'òcits.-

BIBLIOGRAFIA

- ASEBIR (2016) Cuadernos de Embriología Clínica VI. Indicadores de calidad del laboratorio de embriología: definición y especificaciones. ISSN: 1888-8011.
- Bogle, O., [et al.] (2017). «Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process». *Androl*, vol. 5, p.10-22.
- Boitrelle, F., [et al.] (2012). «Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation». *J Androl*, vol. 33, núm 6, p.1371-1378.
- Fabozzi, G., [et al.]. (2016). «Evaluation of the Efficiency of Two Different Freezing Media and Two Different Protocols to Preserve Human Spermatozoa from Cryoinjury», *Int J Reprod Med*, vol 2016, p.1-6.
- Lee, C., [et al.]. (2012). «Kruger strict morphology and post-thaw progressive motility in cryopreserved human spermatozoa» *Androl*, vol. 44, núm 1, p.81-86.
- Omnes C., [et al.] (2013). «Human spermatozoa cryopreservation: comparison of three different freezing protocols», *Cryo Letters*, vol. 34, núm 5, p. 535-543.
- Ozkavukcu, [et al.]. (2008). «Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa», *J Assist Reprod Genet*, vol.25, núm 8, p. 403-411.
- Rofeim, O., [et al.] (2005). «Long-term effects of cryopreservation on human spermatozoa». *Fertil Steril*, vol. 84, núm 2, p. 536-537.
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed. ISBN 978 92 4 154778 9.
- Zribi, N., [et al.]. (2012). «Cryobiology Effect of freezing – thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity». *Cryobiology*, vol. 65, núm 3, p. 326-331.

NOVES PERSPECTIVES EN L'ESTUDI DE LA TERRITORIALITAT CROMOSÒMICA DE CÈL·LULES GERMINALS MASCULINES: ESTUDIS TRIDIMENSIONALS

¹Mireia Solé, ¹Joan Blanco, ²Debora Gil, ³Gothami Fonseka, ³Richard Frodsham, ⁴Oliver Valero, ¹Francesca Vidal, ¹Zaida Sarrate

¹Genetics of Male Fertility Group (<http://gmfgroup.wixsite.com/gmfgroup>). Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Spain. zaida.sarrate@uab.cat

²Computer Vision Center. Computer Science Department. Universitat Autònoma de Barcelona. Cerdanyola del Vallès, Spain. debora.gil@uab.cat

³Cytocell Ltd, Technopark, Newmarket Road, Cambridge CB5 8PB, UK. g.fonseka@cytoCELL.com

⁴Universitat Autònoma de Barcelona, Servei d'Estadística Aplicada, Cerdanyola del Vallès, Spain. oliver.valero@uab.cat

Resum

En el nucli interfàsic de cèl·lules somàtiques, els cromosomes ocupen territoris concrets que tenen un paper fonamental en la regulació i el manteniment del genoma. Tot i que en cèl·lules germinals hi ha dades preliminars que suggereixen la importància de la territorialitat cromosòmica en la funcionalitat cel·lular, les característiques del teixit testicular (presència de diferents tipus cel·lulars amb diferents característiques morfològiques, en diferents estadis de desenvolupament i amb diferent tipus de ploïdia) dificulta la consecució de resultats conclouents. En aquest estudi hem desenvolupat una metodologia d'anàlisi tridimensional de territorialitat cromosòmica en cèl·lules germinals masculines procedents de testicle de ratolins (*Mus musculus*) de la soca C57BL/6J. La metodologia contempla etapes clarament diferenciades: i) Fixació cel·lular optimitzada per preservar l'estructura tridimensional de les cèl·lules; ii) Identificació cromosòmica mitjançant FISH (Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ Murine System; Cytocell) i microscòpia confocal (TCS-SP5; Leica Microsystems), iii) Identificació cel·lular mitjançant immunofluorescència, iv) Anàlisi de les imatges mitjançant seqüències de comandaments Matlab, v) Obtenció de dades numèriques que defineixen els territoris cromosòmics (dades descriptives, posicionament radial i posicionament relatiu dels cromosomes). Aquesta metodologia permet la identificació inequívoca i l'anàlisi dels territoris cromosòmics en totes les etapes de l'espermatogènesi. Els resultats aportaran informació valuosa en relació a les característiques cromosòmiques que determinen el posicionament, les associacions preferents entre cromosomes i la relació entre posicionament i regulació del genoma.

Paraules clau: Territoris cromosòmics, FISH, espermatogènesi, anàlisi tridimensional.

Abstract

In somatic cells, chromosomes occupy specific nuclear regions called chromosome territories which are involved in the maintenance and regulation of the genome. Preliminary data in male germ cells also suggest the importance of chromosome territoriality in cell functionality. Nevertheless, the specific characteristics of testicular tissue (presence of different cell types with different morphological characteristics, in different stages of development and with different ploidy) makes difficult to achieve conclusive results. In this study we have developed a methodology to approach the three-dimensional study of all chromosome territories in male germ cells from C57BL/6J mice (*Mus musculus*). The method includes the following steps: i) Optimized cell fixation to obtain an optimal preservation of the three-dimensionality cell morphology, ii) Chromosome identification by FISH (Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ Murine System; Cytocell) and confocal microscopy (TCS-SP5, Leica Microsystems), iii) Cell type identification by immunofluorescence iv) Image analysis using Matlab scripts, v) Numerical data extraction related to chromosome features, chromosome radial position and chromosome relative position. This methodology allows the unequivocally identification and the analysis of the chromosome territories of all spermatogenic stages. Results will provide information about the features that determine chromosomal position, preferred associations between chromosomes, and the relationship between chromosome positioning and genome regulation.

Key words: Chromosome territories, FISH, spermatogenesis, three-dimensional analysis.

INTRODUCCIÓ

Els cromosomes ocupen regions específiques, no aleatòries, conegudes amb el nom de Territoris Cromosòmics (TC) (Cremer i Cremer 2010). Els mecanismes que estableixen aquest posicionament estan relacionats amb característiques intrínseques dels cromosomes, com la mida i la densitat gènica. Els cromosomes amb una alta densitat gènica i els cromosomes petits es localitzen preferentment a l'interior de l'espai nuclear, mentre que els que tenen una baixa densitat gènica i els que són més grans es localitzen a la perifèria (Hübner i Spector 2010; Sun et al. 2000). Així mateix, a nivell de l'organització interna dels territoris cromosòmics, s'ha trobat correlació amb altres factors com l'activitat de transcripció i el contingut dels nucleòtids de guanina i citosina (revisat per Cremer and Cremer 2010).

El patró de distribució dels cromosomes difereix segons el tipus cel·lular, però és similar entre cèl·lules i teixits que comparteixen vies de desenvolupament i està evolutivament conservat entre espècies (Tanabe et al. 2002). Tant és així que s'ha suggerit una gran implicació de l'organització dels TCs en el manteniment i la regulació del genoma (Cremer et al. 2006), així com en la regulació de l'expressió gènica (Cavalli 2007; Elcock i Bridger 2010; Harewood et al. 2010; Hübner et al. 2013). El posicionament dels cromosomes podria promoure interaccions entre regions específiques del genoma per tal d'activar o reprimir la seva expressió (Cavalli 2007; Hübner et al. 2013). Per tant, l'alteració del posicionament dels cromosomes i en conseqüència, l'alteració de la localització dels gens podria, per una banda, comprometre l'accessibilitat dels factors de transcripció a la cromatina i, per l'altra, dificultar les interaccions físiques entre regions específiques del genoma que actuen de manera coordinada (Reddy et al. 2008; Wijchers et al. 2015).

De fet, s'han observat alteracions en el patró de posicionament dels cromosomes en nombroses malalties. Cremer et al. (2003) descriuen diferents patrons de posicionament dels cromosomes 18 i 19 en línies cel·lulars normals i tumorals. Meaburn et al. (2007) descriuen canvis en els territoris dels cromosomes 13 i 18 en pacients amb mutacions del gen *LMNA*. També, s'ha observat una alteració del patró d'interaccions entre TC en cèl·lules mamàries tumorals (Fritz et al. 2014).

Pel que fa el teixit testicular, hi ha poques dades sobre la posició relativa dels cromosomes durant el transcurs del procés d'espermatogènesi. Tot i això, alguns estudis han demostrat una distribució no aleatòria dels cromosomes en alguns estadis concrets: estudis en dues dimensions en espermatòcits humans mostren una proximitat preferent entre els bivalents 15 i XY en l'estadi de paquí (Codina-Pascual et al. 2006) i metafase I

(Sarrate et al. 2012). Així mateix, l'anàlisi de les relacions de posicionament entre tots els bivalents a l'estadi de metafase I ha evidenciat una distribució

no aleatòria dels cromosomes mantenint agrupacions preferents d'acord amb la mida, la densitat gènica i la morfologia acrocèntrica dels cromosomes (Vergés et al. 2014). Tanmateix, diverses publicacions han informat d'una organització espacial no aleatòria dels cromosomes en els nuclis dels espermatozoides (Foster i Bridger 2005; Hazzouri et al. 2000; Ioannou et al. 2011; Mudrak et al. 2012).

Tenint en compte aquestes observacions, s'ha suggerit que la distribució dels cromosomes en les cèl·lules espermatogèniques podria condicionar el correcte desenvolupament de l'espermatogènesi i, en el cas de la organització dels TCs en els espermatozoides, tenir implicacions epigenètiques en l'expressió gènica de l'embrió (Greaves et al. 2003; Mudrak et al. 2012; Zalensky i Zalenskaya 2007). En aquest sentit, diversos estudis relacionen canvis en la territorialitat dels cromosomes de les cèl·lules espermatogèniques amb problemes de fertilitat. Més concretament, Finch et al. (2008) observen un posicionament alterat dels cromosomes sexuals en individus que presenten problemes de fertilitat. Els cromosomes 15, 18 i X també experimenten un canvi de posicionament en pacients amb un alt nivell d'aneuploidies (Olszewska et al. 2008). A més a més, també s'ha observat un canvi de territorialitat cromosòmica a l'estadi de metafase I en portadors de translocacions robertsonianes (Acloque et al. 2013; Solé et al. 2016) i en nuclis d'espermatozoides humans de portadors de translocacions recíproques (Wiland et al. 2008). Tot i això, els estudis publicats de territorialitat cromosòmica en cèl·lules del teixit testicular són escassos i tan sols avaluen la relació de posicionament de cromosomes concrets, en estadis específics de l'espermatogènesi i mitjançant tècniques bidimensionals (Ioannou et al. 2011; Sarrate et al. 2012; Vergés et al. 2014; Zalenskaya i Zalensky 2004). Malgrat la vàlua dels resultats d'aquests estudis, les anàlisis bidimensionals no permeten concloure el posicionament exacte dels cromosomes en la tridimensionalitat de la cèl·lula, ni la seva progressió durant el transcurs de l'espermatogènesi.

Per tal de superar aquestes limitacions, s'ha desenvolupat una metodologia per avaluar de manera tridimensional el posicionament de tots els cromosomes en tots els tipus cel·lulars que participen en l'espermatogènesi.

MATERIALS I MÈTODES

La metodologia desenvolupada consta de vuit etapes (Figura 1). Es van processar els testicles provinents

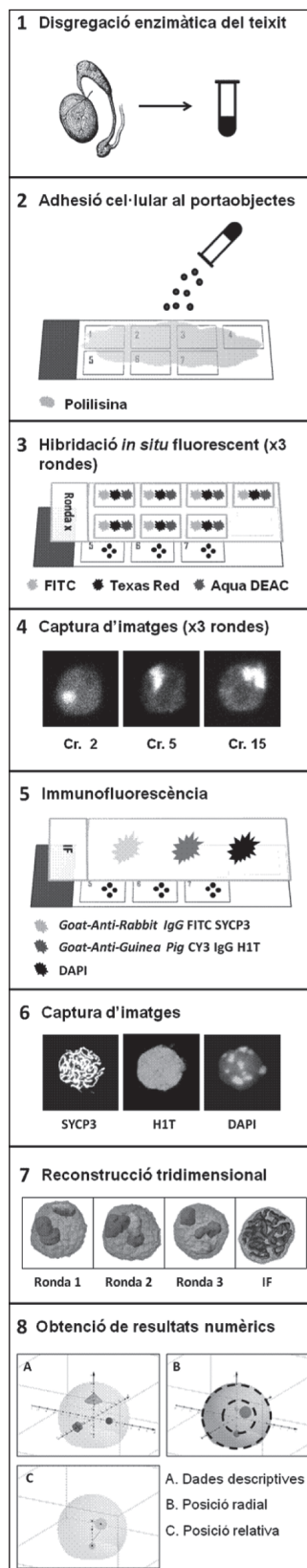


Figura 1: Representació esquemàtica de la metodologia optimitzada.

d'un ratolí (*Mus musculus*) de la soca C57BL/6J. El teixit testicular es va disgregar enzimàticament i les cèl·lules obtingudes es van adherir en portaobjectes polilisinitzats. Posteriorment, es va realitzar un procés de fixació amb paraformaldehid i un tractament de permeabilització amb àcid clorhídric, nitrogen líquid i pepsina. Seguidament, es van dur a terme tres rondes d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH) utilitzant el kit personalitzat *Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome Murine System™* (Cytocell Ltd, Cambridge, UK). Aquest kit utilitza set combinacions diferents de tres sondes de pintat cromosòmic marcades amb un fluorocrom diferent cadascuna (*Aqua DEAC*, *FITC*, *Texas Red*) (Figura 2). Seguidament, i amb la finalitat de distingir els diferents tipus cel·lulars que es poden observar durant l'espermatogènesi, es va identificar la proteïna SYCP3 (synaptonemal complex protein 3) i la histona H1T (testis-specific histone) mitjançant una tinció per immunofluorescència. La identificació es va realitzar mitjançant els anticossos primaris *rabbit* anti-SYCP3 i *guinea pig* anti-H1T, i els anticossos secundaris anti-*rabbit* FITC i anti-*guinea pig* Cy3 (Figura 3). Es van capturar seccions òptiques en sèrie de tots els tipus cel·lulars amb la utilització del microscopi confocal *TCS-SP5* acoblat a un sistema d'anàlisi d'imatges (LAS AF-1.8.1). Finalment, les imatges es van processar mitjançant els softwares ImageJ i Matlab obtenint dades numèriques que inclouen dades descriptives, posicionament radial i posicionament relatiu dels cromosomes.

Ronda 1	 10,9,18	 12,11,19	 X,13,Y	
	 1,4,14	 2,5,15	 3,7,16	 6,8,17
Ronda 2	 6,8,17	 10,9,18	 12,11,19	
	 3,7,16	 1,4,14	 2,5,15	 3,7,16
Ronda 3	 X,13,Y	 1,4,14	 2,5,15	
	 X,13,Y	 6,8,17	 10,9,18	 12,11,19

FITC Texas Red Aqua DEAC

Figura 2: Plantilles del kit *Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome Murine System™* utilitzades per dur a terme la hibridació *in situ* fluorescent. Els números indiquen el cromosoma identificat.

RESULTATS

Morfologia nuclear

La utilització de portaobjectes polilisinitzats va permetre una bona adhesió de les cèl·lules, sense malmetre ni deformar la morfologia cel·lular. A més a més, el seguit de tractaments utilitzats per aconseguir una bona permeabilització dels nuclis no va modificar la seva integritat tridimensional.

Hibridació *in situ* fluorescent

El kit personalitzat *Chromoprobe Multiprobe® Oc-toChrome Murine System™* va permetre identificar tots els cromosomes de ratolí en un sol portaobjectes. La realització de tres rondes successives de FISH va fer possible la identificació de 9 territoris cromosòmics per cèl·lula. Integrant totes les dades es van poder establir relacions de proximitat, dos a dos, entre tots els cromosomes (Taula 1).

Chr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	X	Y
1		1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1
2			1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1
3				1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1
4					1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1
5						1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1
6							1	3	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1
7								1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1
8									1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1
9										3	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1
10											1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1
11												3	1	1	1	1	1	3	1	1	1
12													1	1	1	1	1	3	1	1	1
13														1	1	1	1	1	3	3	3
14																1	1	1	1	1	1
15																	1	1	1	1	1
16																		1	1	1	1
17																			1	1	1
18																				1	1
19																					1
X																					3
Y																					

Taula 1: Nombre de vegades que es combinen dos cromosomes en un mateix nucli.

Immunofluorescència

La identificació de les proteïnes SYCP3 i H1T mitjançant immunofluorescència, juntament amb la tinció de la cromatina amb DAPI, va permetre classificar els tipus cel·lulars en les següents categories: cèl·lules pre-meiotiques, figures meiotiques (profase I, metafase I i II), cèl·lules post-meiotiques i espermatozoides (Figura 3).

Processament de les imatges

La utilització dels softwares ImageJ i Matlab va permetre segmentar les imatges obtingudes i extreure dades numèriques dels territoris cromosòmics en relació al

volum, la proporció respecte el nucli, la posició radial i la posició relativa dels cromosomes.

DISCUSSIÓ

L'aplicació de la metodologia desenvolupada permet determinar el patró de distribució de tots els TC en totes les etapes de l'espermatogènesi. Considerant les nombroses evidències de que la territorialitat cromosòmica té un significat biològic funcional, la caracterització dels TCs durant l'espermatogènesi podria obrir noves perspectives per determinar la relació entre el posicionament dels cromosomes i la regulació i el manteniment del genoma. Així mateix, la caracterització d'un model de territorialitat cromosòmica durant el procés d'espermatogènesi serà una eina útil per determinar les seves implicacions en la fertilitat masculina.

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat finançat pels projectes CF-180034 de la Universitat Autònoma de Barcelona, DPI2015-65286R/SAF2016-77165-P del *Ministerio de Economía, Industria y Competividad* i CERCA de la Generalitat de Catalunya. Agraïm a M.A Handel de Jackson Laboratories per la seva col·laboració.

BIBLIOGRAFIA

- Acloque, H.; [et al.] (2013). «Sperm nuclear architecture is locally modified in presence of a Robertsonian translocation t(13;17).» *PloS. One*, Vol. 8, núm. 10, p. 863-905.
- Cavalli G. (2007). «Chromosome kissing». *Curr. Opin. Genet. Dev.*, Vol. 17, p. 443-450.
- Codina-Pascual M.; [et al.] (2006). «Behaviour of human heterochromatic regions during the synapsis of homologous chromosomes». *Hum. Reprod.*, Vol. 21, p.1490-1497.
- Cremer M.; [et al.] (2003). «Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei». *J. Cell. Biol.*, Vol. 5, núm. 162, p.809-820.
- Cavalli G. (2007). «Chromosome kissing». *Curr. Opin. Genet. Dev.*, Vol. 17, p. 443-450.
- Codina-Pascual M.; [et al.] (2006). «Behaviour of human heterochromatic regions during the synapsis of homologous chromosomes». *Hum. Reprod.*, Vol. 21, p.1490-1497.
- Cremer M.; [et al.] (2003). «Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in

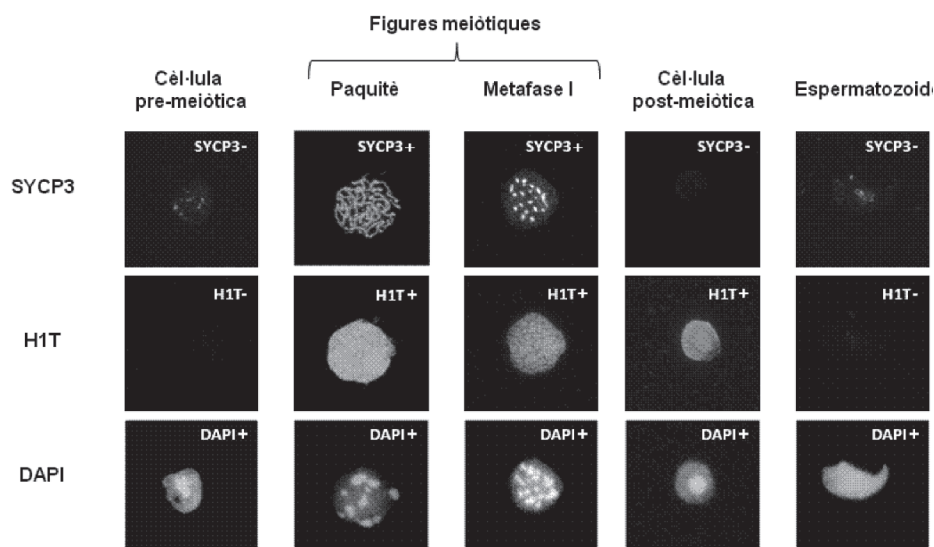


Figura 3: Alguns exemples d'identificació de diferents cèl·lules de l'espermatogènesi mitjançant marcatge per immunofluorescència de les proteïnes SYCP3 H1T i tinció amb DAPI.

- normal and tumor cell nuclei». *J. Cell. Biol.*, Vol. 5, núm. 162, p.809-820.
- Cremer T.; [et al.] (2006). «Chromosome territories--a functional nuclear landscape». *Curr. Opin. Cell Biol.*, Vol. 18, núm. 3, p. 307-316.
- Cremer T., Cremer M.; (2010). «Chromosome Territories». *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 2: a003889.
- Elcock L.S. i Bridger J.M.; (2010). «Exploring the relationship between interphase gene positioning, transcriptional regulation and the nuclear matrix». *Biochem Soc Trans.*, Núm. 38, p. 263-267
- Finch, K.A.; [et al.] (2008). «Nuclear organization in human sperm: preliminary evidence for altered sex chromosome centromere position in infertile males». *Hum. Reprod.* Vol. 23, núm. 6, p. 1263-1270.
- Foster H.A.; [et al.] (2005). «Non-random chromosome positioning in mammalian sperm nuclei, with migration of the sex chromosomes during late spermatogenesis». *J. Cell Sci.*, núm. 118, p.1811-1820
- Fritz, A.J.; [et al.] (2014). «Wide-scale alterations in interchromosomal organization in breast cancer cells: defining a network of interacting chromosomes». *Human Mol. Gen.* Vol. 23, núm. 19, p. 5133-5146.
- Greaves, I.K.; [et al.] (2003). «Conservation of chromosome arrangement and position of the X in mammalian sperm suggests functional significance». *Chromosome Res.*, núm. 11, p.503-512.
- Harewood, L.; [et al.] (2010). «The effect of translocation-induced nuclear reorganization on gene expression». *Genome Res.*, Vol. 20, núm. 5, p.554-564.
- Hazzouri, M.; [et al.] (2000). «Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy». *Mol. Reprod. and develop.* Vol. 55, núm. 3, p.307-315.
- Hübner M.R.; [et al.] (2013). «Chromatin organization and transcriptional regulation». *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 2, núm. 23, p.89-95.
- Hübner M.R i Spector D.L; (2010). «Chromatin dynamics». *Annu Rev Biophys.*, núm. 39, p. 471-489
- Ioannou, D.; [et al.] (2011). «Nuclear organisation of sperm remains remarkably unaffected in the presence of defective spermatogenesis». *Chromosome. Res.*, núm. 19, p. 741-753.
- Kumaran, R.I. i David L.S.; 2008. «A genetic locus targeted to the nuclear periphery in living cells maintains its transcriptional competence». *The Journal of cell biology.*, vol. 180, núm. 1, p.51-65.
- Meaburn, K.J.; [et al.] (2007). «Primary laminopathy fibroblasts display altered genome organization and apoptosis». *Aging cell.* vol. 6, núm. 2, p. 139-153.
- Mudrak, O.S; [et al.] (2012). «Positioning of chromosomes in human spermatozoa is determined by ordered centromere arrangement». *PLoS One.*, núm.7:e52944
- Olszewska, M.; [et al.] (2008). «Positioning of chromosome 15, 18, X and Y centromeres in sperm cells of fertile individuals and infertile patients with increased level of aneuploidy». *Chr. Research.* vol. 16, núm. 6, p. 875-890
- Reddy, K.L.; [et al.] (2008). «Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina». *Nature.* vol. 452, núm. 7184, p. 243-247.
- Sarrate, Z.; [et al.] (2012). «Acrocentric bivalents positioned preferentially nearby to the XY pair in metaphase

- hase I human spermatocytes». *Fertility and Sterility*. vol. 98, núm. 5, p. 1241-1245.
- Solé, M.; [et al.] (2016). «Altered bivalent positioning in metaphase I human spermatocytes from Robertsonian translocation carriers». *J. Assist. Reprod. Gen.* vol. 34, núm. 1, p. 131-138.
- Sun, H.B.; [et al.] (2000). «Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei.» *Biophysical J.* vol. 79, núm. 1, p. 184-190.
- Tanabe, H.; [et al.] (2002). «Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications.» *Mutation research*. vol. 504, núm. 1-2, p. 37-45.
- Vergés L.; [et al.] (2014). «Chromosome size, morphology, and gene density determine bivalent positioning in metaphase I human spermatocytes». *Fertil Steril*. núm. 101, p. 818-824.
- Wijchers, P.; [et al.] (2015). «Characterization and dynamics of pericentromere-associated domains in mice.» *Genome res.* vol. 25, núm. 7, p. 958-969.
- Wiland E.; [et al.] (2008). «Interindividual differences and alterations in the topology of chromosomes in human sperm nuclei of fertile donors and carriers of reciprocal translocations». *Chromosome Res.*, núm. 16, p. 291-305.
- Zalenskaya I.A. i Zalensky A.O.; (2004) «Non-random positioning of chromosomes in human sperm nuclei. *Chromosome. Res.*, núm. 12, p. 163-173
- Zalensky A.O. i Zalenskaya I.A.; (2007) «Organization of chromosomes in spermatozoa: an additional layer of epigenetic information?» *Biochem. Soc. Trans.* núm. 35, p. 609-611.

L'ESTUDI DEL PLASMA SEMINAL MITJANÇANT PROTEÒMICA D'ALT RENDIMENT SUGGEREIX UNA COMUNICACIÓ BIDIRECCIONAL ENTRE L'ESPERMATOZOIDE I EL TRACTE REPRODUCTOR MASCULÍ

Ferran Barrachina¹, Meritxell Jodar¹, Ada Soler-Ventura¹, Josep Maria Estanyol², Juan Manuel Corral³, Josep Lluís Ballescà⁴, Rafael Oliva^{1,*}

¹Grup de Biologia Molecular de la Reproducció i Desenvolupament, Dept. Ciències Biomèdiques, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Casanova 143, 08036 Barcelona, i Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona.

²Unitat de Proteòmica, Centres Científics i Tecnològics (CCiTUB) de la UB, Casanova 143, 08036 Barcelona.

³Departament d'Urologia, IDIBAPS, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona.

⁴Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona.

*roliva@ub.edu

Resum

El plasma seminal sembla tenir un paper molt més important que el de simplement ser un medi de transport dels espermatozoides, sent crucial per a la fertilització i per a la supervivència i funció de l'espermatozoide. Per tal d'avaluar el potencial rol de les proteïnes del plasma seminal en la funció de l'espermatozoide, l'objectiu d'aquest estudi va ser caracteritzar i comparar el proteoma del plasma seminal de diferents subtipus de pacients infèrtils d'acord amb els seus paràmetres seminals (4 pacients normozoospermics (NZ), 4 astenozoospermics (AS), 4 oligozoospermics (OZ) i 4 azoospermics (AZ)) utilitzant el marcatge proteic amb *tandem mass tags* (TMT) i procedint a la seva identificació i quantificació mitjançant espectrometria de masses (LC-MS/MS). Un total de 370 proteïnes van ser identificades en el total de les 16 mostres estudiades, sent les proteïnes relacionades amb el metabolisme, resposta a l'estrès, proteòlisi i sistema immune els processos biològics més enriquits. Les diferències significatives detectades en l'abundància de les proteïnes van ser principalment degudes a canvis en la concentració d'espermatozoides (els pacients OZ i AZ presentaven una abundància de proteïnes menor). No obstant, l'abundància de la proteïna PLA2G2A estava reduïda en pacients AS, pel que semblaria trobar-se relacionat amb la motilitat dels espermatozoides. Particularment, una proteïna principalment expressada en l'epidídim (ECM1) i detectada en el plasma seminal es va correlacionar positivament de manera significativa amb la concentració d'espermatozoides. Aquest resultat podria suggerir que la presència d'espermatozoides influenciaria les secrecions de l'epidídim, el que planteja la possibilitat d'una comunicació bidireccional entre l'espermatozoide i el tracte reproductor masculí.

Paraules clau: plasma seminal, proteòmica quantitativa, marcatge TMT, infertilitat masculina.

Abstract

Seminal plasma seems to be more than a simply medium to carry the spermatozoa, being crucial for sperm survival, function and fertilization. In order to assess the potential role of seminal plasma proteins on sperm function, we characterized and compared the seminal plasma proteome from different subtypes of infertile patients according to their seminal parameters (4 normozoospermic (NZ), 4 asthenozoospermic (AS), 4 oligozoospermic (OZ) and 4 azoospermic (AZ) patients) using tandem mass tags (TMT) protein labelling followed by mass spectrometry (LC-MS/MS). A total of 370 proteins were identified in common along the 16 samples, being the processes related to metabolism, response to stress, proteolysis and immune system highly enriched. The largest differences were mainly due to changes in the sperm concentration (lower protein abundance was found in OZ and AZ patients). However, the PLA2G2A protein abundance was decreased in AS patients, which seems to be related to sperm motility. Remarkably, an epididymally-expressed protein (ECM1) found in seminal plasma was significantly positively correlated with sperm concentration. This result could suggest that the presence of sperm by themselves influence the epididymal secretions, raising the possibility of a bidirectional communication between the sperm and the male reproductive tract.

Key words: seminal plasma, quantitative proteomics, TMT labelling, male infertility.

INTRODUCCIÓ

El plasma seminal està compost per les secrecions provinents del testicle (1-2%), epidídim (2-4%) i les glàndules sexuals accessòries presents en el tracte urogenital masculí, que inclou les vesícules seminals (65-75%), la pròstata (25-30%) i les glàndules bulbouretrals (<1%). Malgrat que la funció més bàsica del plasma seminal és la d'actuar com a medi de transport dels espermatozoides durant el procés d'ejaculació i de trànsit pel tracte femení fins arribar a l'òcit, els components del plasma seminal també són crucials per a la protecció dels espermatozoides i per a la seva supervivència i funció (Camargo *et al.*, 2016). De fet, després de l'espermatoïgenesis, els espermatozoides resultants són cèl·lules germinals immadures sense motilitat i sense l'habilitat per a fertilitzar oòcits per si sols (Jodar *et al.*, 2016). El contacte de l'espermatozoide amb el plasma seminal durant la seva maduració a l'epidídim i durant el trànsit en el tracte genital masculí durant l'ejaculació és crucial per a la seva maduració, supervivència, funció, motilitat, viabilitat i capacitat dels espermatozoides (Brackett *et al.*, 1996; Henault *et al.*, 1996; Pilch *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2010). Així mateix, el contacte del plasma seminal amb el tracte genital femení també prepara al sistema immune femení per tal de tolerar el *conceptus* i també sembla ocasionar canvis cel·lulars i moleculars a l'endometri amb l'objectiu de facilitar el desenvolupament embrionari i la implantació (Robertson, 2005; Moldenhauer *et al.*, 2009).

El plasma seminal humà és una font rica en proteïnes i, aproximadament, la concentració de proteïnes en el plasma seminal és de 35-55 mg/ml (Pilch *et al.*, 2006). L'accessibilitat i l'alta concentració de proteïnes del plasma seminal suggereix que el plasma seminal pot ser una font rica de biomarcadors per a la fertilitat masculina, de la mateixa manera que s'han identificat en l'espermatozoide (Castillo *et al.*, 2011; Azpiazu *et al.*, 2014; Paiva *et al.*, 2015). A més, alteracions de les proteïnes del plasma seminal s'han relacionat amb diversos aspectes implicats en la infertilitat masculina (Drabovich *et al.*, 2014; Giacomini *et al.*, 2015; Gilany *et al.*, 2015; Vilagran *et al.*, 2015).

Per tant, per tal d'avaluar el potencial rol de les proteïnes del plasma seminal en la funcionalitat i integritat dels espermatozoides, l'objectiu del present estudi és caracteritzar i comparar el proteoma del plasma seminal de diferents subtipus de pacients infèrtils d'acord amb els seus paràmetres seminals: (i) 4 pacients normozoospermics (NZ; paràmetres seminals normals), (ii) 4 pacients astenozoospermics (AS; espermatozoides amb motilitat alterada), (iii) pacients oligozoospermics (OZ; baixa concentració d'espermatozoides), i (iv) 4 pacients

azoospermics (AZ; absència d'espermatozoides), mitjançant la identificació de proteïnes per espectrometria de masses (LC-MS/MS) juntament amb un marcatge previ de les proteïnes amb *tandem mass tags* (TMT).

MATERIAL I MÈTODES

Mostres biològiques. Les mostres de semen humà van ser obtingudes, sota previ consentiment informat, de la Clínica de Reproducció Assistida de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona (FIV Clínic). Les mostres seleccionades van ser un total de 16, en les quals es van incloure (i) 4 pacients normozoospermics (NZ), (ii) 4 pacients astenozoospermics (AS), (iii) 4 pacients oligozoospermics (OZ), i (iv) 4 pacients azoospermics (AZ; 2 pacients amb azoospermia obstructiva (OA) i 2 pacients amb azoospermia no obstructiva (NOA)). L'avaluació dels paràmetres seminals es va realitzar seguint les recomanacions de l'Organització Mundial de la Salut (World Health Organization, 2010). La determinació dels paràmetres seminals es va dur a terme mitjançant el sistema informatitzat *Computer-assisted sperm analysis* (Proiser) i també es va realitzar una anàlisi de la vitalitat dels espermatozoides mitjançant el test d'eosina (World Health Organization, 2010).

Aïllament del plasma seminal i quantificació proteica. Les mostres de semen es van centrifugar a 500g per a precipitar i separar els espermatozoides del plasma seminal, seguit d'una segona centrifugació a 1.500g, per tal d'eliminar altres restes cel·lulars. El sobrenedant restant, plasma seminal lliure de cèl·lules, es va filtrar (0,45µm) per a poder assegurar l'eliminació de tot tipus cel·lular. El contingut de proteïnes del plasma seminal filtrat es va quantificar mitjançant el kit de quantificació de proteïna BCA (PierceTM BCA protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) seguint les instruccions proporcionades pel fabricant.

Marcatge isobàric diferencial de les proteïnes del plasma seminal (TMT 10-plex). El marcatge diferencial de les proteïnes per a les 16 mostres independents es va realitzar seguint les instruccions de la casa comercial (TMT 10-plex *Mass Tag Labelling*; Thermo Fisher Scientific). Breument, el marcatge diferencial isobàric amb TMT 10-plex consisteix en un total de 10 isòtops diferents que s'uneixen de manera covalent a l'extrem N- o C- terminal dels residus de lisina de les proteïnes. Aquests diferents isòtops presenten una massa monoisotòpica diferent, la qual pot ser detectada utilitzant espectrometria de masses d'alta resolució, de tal manera que permet la quantificació de les proteïnes de mostres independents. Es va partir d'una concentració de 60µg/µl de proteïna per mostra i, per tal de reduir les proteïnes i trencar els ponts disulfur, es van incubar amb

TCEP 20mM durant 1h a 55°C i, posteriorment, es van alquilar amb iodoacetamida 18,75mM durant 30min. Les proteïnes es van deixar precipitar en acetona a -20°C durant 16h i, tot seguit, la mostra es va centrifugar a 17.500g per 10min. El pèl·let resultant es va resuspendre en 60µl de TEAB 100mM i, amb la finalitat de digerir les proteïnes i obtenir pèptids, es van afegir 3µl de Tripsina (1µg/µl). Posteriorment, una mateixa quantitat de totes les mostres marcades es van barrejar per tal de preparar un control intern (5µl de cadascuna de les 16 mostres es van barrejar per a conformar el control intern). Els pèptids de les diferents mostres (n=16) i el control intern es van marcar amb els diferents reactius/isòtops del TMT 10-plex. Després d'aturar la reacció afegint 5% d'hidroxilamina, el conjunt de mostres marcades amb diferents isòtops es van combinar per a generar dos pools múltiplex (10-plex; 9 tags isobàrics per a marcar 8 mostres + 1 tag control intern). A continuació, es van purificar i concentrar els pèptids dels dos pools mitjançant les Columnes Pierce C-18 (Pierce C-18 Spin Columns, Thermo Fisher Scientific).

Cromatografia líquida – Espectrometria de Masses en tàndem (LC-MS/MS) i identificació de proteïnes. Els pèptids dels dos pools es van separar per mitjà de nano-cromatografia líquida fent servir un *Eksigent nanoLC ultra 2D plus system* (AB Sciex). Els anàlisis per MS/MS es van realitzar utilitzant un *LTQ Orbitrap Velos* (Thermo Fisher Scientific) amb una font d'ionització *nano-electrospray* amb una resolució de 30.000 FWHM en la selecció d'ions a l'Orbitrap. L'adquisició de les dades per MS/MS es va completar utilitzant *Xcalibur 2.1* (Thermo Fisher Scientific) i, per a la identificació dels pèptids marcats amb TMT, es va utilitzar el HCD (*higher energy collisional dissociation*) amb un 40% de CE (*collision energy*). El software emprat per identificar i quantificar les proteïnes va ser el *Proteome Discoverer 1.4* (Thermo Fisher Scientific). Els criteris d'identificació inclouen un mínim d'un pèptid únic, un mínim d'un pèptid per proteïna i un *false discovery rate* (FDR) d'un 1%. Els valors de cada mostra es van normalitzar amb el control intern respectiu.

Anàlisi de les dades. Les proteïnes identificades van ser classificades segons la seva funció mitjançant la informació disponible a la base de dades *UniProt knowledgebase* (UniProtKB/Swiss-Prot, <http://www.uniprot.org>). El llistat de proteïnes identificades també va ser analitzat utilitzant l'eina bioinformàtica *Gene Ontology Consortium* (<http://www.geneontology.org/>) per tal d'identificar els Processos Biològics enriquits (*Gene Ontology*). La comparació estadística entre els diferents grups (NZ, AS, OZ, AZ) es va dur a terme mitjançant una anàlisi Kruskal-Wallis utilitzant el software estadístic *SigmaPlot v.11.0* (Systat Software). Els tests Post-Hoc es van realitzar en les proteïnes diferen-

cials per a observar les diferències entre els diferents grups. Es va establir com a significatiu un p-valor < 0,05. A més, es van realitzar anàlisis de correlació de Spearman comparant l'abundància de les proteïnes amb la concentració d'espermatozoides i es van dur a terme tests de correcció de múltiple comparació (p-valor ajustat a FDR 5%). La identificació tissular de les proteïnes es va realitzar utilitzant el programa *The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org/>), un programa que permet una exploració sistemàtica del proteoma humà basat en l'ús d'anticossos específics.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Proteoma general del plasma seminal

Un total de 370 proteïnes del plasma seminal van ser identificades en el total de les 16 mostres estudiades. Els processos biològics més enriquits de les proteïnes identificades es van trobar relacionats amb el metabolisme (17%), resposta a l'estrès i a l'estrès oxidatiu (15%), processos proteolítics i hidrolítics (12%), sistema immune (10%) i producció d'energia (9%) (Figura 1). En menor proporció també es van identificar processos relacionats amb la fertilització i l'embriogènesi (3%), i amb l'espermatogènesi i la funcionalitat de l'espermatozoide (2%) (Figura 1). De manera similar, altres estudis que analitzen el plasma seminal també han caracteritzat els processos metabòlics i la resposta a l'estrès com els processos més comuns (Batrach *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2013). No obstant, l'anàlisi del proteoma del plasma seminal és molt complexa, ja que la concentració de 10 proteïnes majoritàries s'estima que representen el 80% del proteoma del plasma seminal. Per exemple, les semenogelinas representen un 30% del proteoma del plasma seminal, de tal manera que aquesta alta concentració dificulta la identificació de les proteïnes menys abundants mitjançant espectrometria de masses (Drabovich *et al.*, 2014; Jodar *et al.*, 2016). Per tal de millorar la caracterització del plasma seminal s'haurien d'utilitzar estratègies per a reduir/eliminar les proteïnes més abundants, tals com l'ús de columnes HPLC amb anticossos per les proteïnes més abundants o mètodes per a equalitzar les proteïnes per tal de reduir el rang dinàmic d'aquestes (Jodar *et al.*, 2016).

Alteració en l'abundància de proteïnes presents en el plasma seminal en pacients infèrtils

L'anàlisi estadística (Kruskal-Wallis) va mostrar diferències significatives (p-valor < 0,05) en l'abundància de 7 proteïnes del plasma seminal entre els diferents

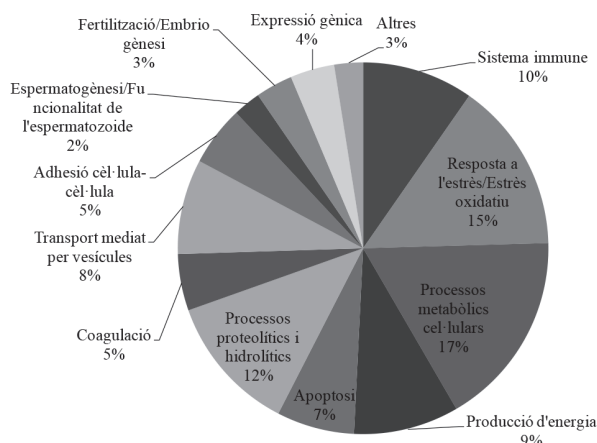


Figura 1. Classificació de les proteïnes identificades en el plasma seminal d'acord amb la seva funció cel·lular. Font d'informació: *Gene Ontology Consortium database*.

subtipus de pacients infèrtils d'acord amb els seus paràmetres seminals (Figura 2). A més, els Tests Post-Hoc (p -valor $< 0,05$) van reflectir que, en la majoria de les proteïnes diferencials, les principals diferències en l'abundància de proteïna eren principalment degudes a canvis en la concentració d'espermatozoides (els nivells de proteïna es troben alterats en els pacients oligozoospermics i azoospermics, pacients que presenten una baixa o nul·la concentració d'espermatozoides, respectivament). No obstant, la proteïna PLA2G2A és l'excepció. L'abundància de la proteïna PLA2G2A es trobava disminuïda en pacients astenozoospermics, pel que semblaria estar relacionada amb la mobilitat dels espermatozoides. La proteïna PLA2G2A pertany a la família de la fosfolipasa A2 (PLA2), igual que la proteïna PLA2G3, la qual hi ha evidència que és necessària per a la motilitat dels espermatozoides (Sato *et al.*, 2010).

Proteïnes correlacionades amb la concentració d'espermatozoides i possible origen

L'abundància de tres proteïnes (NPC2, LDHC i ECM1) es va correlacionar positivament, de manera significativa, després de la correcció de múltiple comparació (p -valor ajustat a FDR 5%; Taula 1). El fet que hi hagi una baixa abundància d'aquestes proteïnes en el plasma seminal de pacients amb absència (AZ) o amb baixa concentració (OZ) d'espermatozoides podria estar reflectint que: (i) Existeix una desregulació de les secrecions de les glàndules sexuals accessòries o, (ii) Existeix una baixa abundància de romanents de l'espermatozoide que puguin provenir d'espermatozoides apoptòtics o del citoplasma residual (gotes citoplasmàtiques de les cues dels espermatozoides).

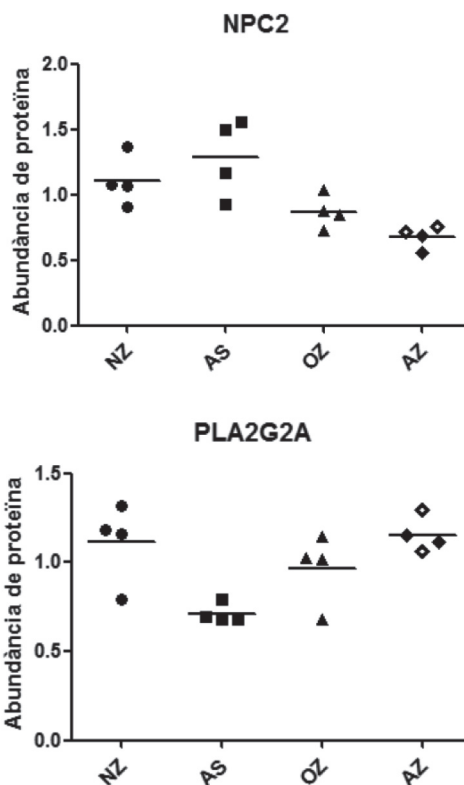


Figura 2. Abundància de proteïnes del plasma seminal (NPC2, PLA2G2A) en els diferents subtipus de pacients infèrtils d'acord amb els paràmetres seminals. (OA: rombes negres; NOA: rombes blancs).

Taula 1. Anàlisi de correlació entre l'abundància de proteïnes en el plasma seminal i la concentració d'espermatozoides.

Nom del Gen	p-valor	p-valor ajustat a FDR	Coefficient de Correlació
LDHC	0,00003	0,007	0,853
NPC2	0,0003	0,034	0,790
ECM1	0,0006	0,048	0,764

De fet, d'acord amb les dades publicades en *The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org/>), la proteïna extracel·lular ECM1 (*Extracellular matrix protein 1*) s'expressa principalment a l'epidídim i no és detectada en el testicle, el que suggereix que hi ha una desregulació en la secreció de l'epidídim en pacients que presenten absència o baix recompte espermàtic. Per contra, l'enzim glicolític LDHC (*L-lactate dehydrogenase C chain*) s'expressa exclusivament en el testicle, suggerint que la LDHC present en el plasma seminal prové de les restes dels espermatozoides. D'altra banda, la proteïna NPC2 (*Epididymal secretory protein E1*) és

un component principal en les secrecions de l'epidídim i sembla estar involucrada en la modificació de la concentració de colesterol present en la membrana de l'espermatozoide durant la seva maduració a l'epidídim (Giacomini *et al.*, 2015). Tot i així, l'origen testicular o extra-testicular de la proteïna NPC2 en el plasma seminal no es pot determinar, ja que aquesta proteïna també es troba present en el testicle.

CONCLUSIÓ

Els resultats obtinguts en aquest estudi suggereixen que la presència d'espermatozoides, per si sols, influeixen en les secrecions de l'epidídim, el que planteja la possibilitat d'una comunicació bidireccional entre l'espermatozoide i el tracte reproductor masculí. L'anàlisi en profunditat d'aquestes proteïnes diferencials del plasma seminal podria conduir a la identificació de noves dianes per a desenvolupar noves teràpies orientades a regular la fertilitat masculina.

AGRAÏMENTS

Aquest estudi es troba subvencionat amb càrrec al projecte del Ministerio de Economía y Competitividad, Fondos FEDER, ISCIII (PI16/00346, PI13/00699), Fundación Salud 2000 (SERONO 13-015) i EUGEN-UB (EU-REP 2014), a RO. FB i MJ es troben subvencionats pel Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU15) i per la Generalitat de Catalunya (PERIS 2016-2020), respectivament.

BIBLIOGRAFIA

- Azpiazu, R. [*et al.*] (2014). «High-throughput sperm differential proteomics suggests that epigenetic alterations contribute to failed assisted reproduction». *Hum Reprod*, vol. 29, núm. 6, p. 1225–1237.
- Batrach, I. [*et al.*] (2012). «Analysis of seminal plasma from patients with non-obstructive azoospermia and identification of candidate biomarkers of male infertility». *J Proteome Res*, vol. 11, núm. 3, p. 1503–1511.
- Brackett, NL. [*et al.*] (1996). «Seminal Plasma of Spinal Cord Injured Men Inhibits Sperm Motility of Normal Men». *J Urol*, vol. 155, núm. 5, p. 1632–1635.
- Camargo, M. [*et al.*] (2016). «Proteomic profile of seminal plasma in adolescents and adults with treated and untreated varicocele». *Asian J Androl*, vol. 18, núm. 2, p. 194–201.
- Castillo, C. [*et al.*] (2011). «Anàlisi del proteoma de nuclis d'espermatozoides humans per cromatografia líquida i espectrometria de masses (LC-MS/MS)». *Biol Repr*, vol. 12, p. 57–60.
- Ding, Z. [*et al.*] (2007). «Identification of sperm forward motility-related proteins in human seminal plasma». *Mol Reprod Dev*, vol. 74, p. 1124–1131.
- Drabovich, AP. [*et al.*] (2014). «Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders». *Nat Rev Urol*, vol. 11, p. 278–288.
- Giacomini, E. [*et al.*] (2015). «Comparative analysis of the seminal plasma proteomes of oligoasthenozoospermic and normozoospermic men». *Reprod Biomed Online*, vol. 30, núm. 5, p. 522–531.
- Gilany, K. [*et al.*] (2015). «Exploring the human seminal plasma proteome: An unexplored gold mine of biomarker for male Infertility and male reproduction disorder». *J Reprod Infertil*, vol. 16, núm. 63, p. 61–71.
- Henault, MA. [*et al.*] (1996). «Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes». *J Reprod Fertil*, vol. 108, p. 199–204.
- Jodar, M. [*et al.*] (2016). «Semen proteomics and male infertility. *J Proteomics*». (*In Press*).
- Moldenhauer, LM. [*et al.*] (2009). «Cross-Presentation of Male Seminal Fluid Antigens Elicits T Cell Activation to Initiate the Female Immune Response to Pregnancy». *J Immunol*, vol. 182, núm. 12, p. 8080–8093.
- Paiva, C. [*et al.*] (2015). «Human sperm motility: A high-throughput differential proteomics approach». *Biol Repr*, vol. 14, p. 9–14.
- Pilch, B. [*et al.*] (2006). «Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma». *Genome Biol*, vol. 7, p. R40.1–R40.10.
- Robertson, SA. (2005) «Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract». *Cell Tissue Res*, vol. 322, p. 43–52.
- Rodriguez-Martinez, H. [*et al.*] (2010). «Spermathecin PSP-I/PSP-II heterodimer induces migration of polymorphonuclear neutrophils into the uterine cavity of the sow». *J Reprod Immunol*, vol. 84, p. 57–65.
- Sato, H. [*et al.*] (2010). «Group III secreted phospholipase A2 regulates epididymal sperm maturation and fertility in mice». *J Clin Invest*, vol. 120, núm. 5, p. 1400–1414.
- Sharma, R. [*et al.*] (2013). «Proteomic analysis of seminal fluid from men exhibiting oxidative stress». *Reprod Biol Endocrinol*, vol. 11, p. 85–100.
- Vilagran, I. [*et al.*] (2015). «Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freeza-

- bility ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker». *Andrology*, vol. 3, p. 345–356.
- Wang, J. [*et al.*] (2009). «Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality». *Asian J Androl*, vol. 11, p. 484–491.
- World Health Organization (2010). «*Examination and processing of human semen*». WHO Lab Man Exam Process Hum Semen.
- Zhao, C. [*et al.*] (2007). «*Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis*». *Fertil Steril*, vol. 87, p. 436–438.

EFFECTE DE LA FOTOESTIMULACIÓ D'OÒCITS PORCINS EN LA MADURACIÓ, LA FECUNDACIÓ I EL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI

Andrea Barceló^{1,*}, Marc Yeste¹, Sergi Bonet¹, Miriam Castillo-Martín^{1,*}

¹Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana (TechnoSperm), Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona, Edifici Jaume Casademont, porta E.

Carrer Pic de Peguera, 15. 17003, Girona.

*u1922676@campus.udg.edu, miriam.castillo@udg.edu

Resum

La fotoestimulació d'espermatozoides de porcí ha demostrat tenir efectes sobre diferents paràmetres, modificant el metabolisme cel·lular i incrementant la taxa de parts i el nombre de garrins totals i vius per part. Per contra, els efectes de la fotoestimulació en oòcits han estat poc estudiats o els resultats obtinguts presenten controvèrsia. L'objectiu d'aquest treball ha sigut avaluar els efectes de la fotoestimulació d'oòcits de porcí en les diferents etapes de la producció *in vitro* d'embrions. En aquest sentit, es van definir dos tractaments; el grup fotoestimulat, irradiats amb llum LED i el grup control, no irradiats. Posteriorment, ambdós grups es van madurar, fecundar i cultivar *in vitro*. El protocol de fotoestimulació utilitzat consistia en 5 minuts de llum, seguits de 5 minuts de foscor i 5 minuts de llum (5-5-5). Es van avaluar la maduració nuclear, la integritat de la membrana plasmàtica, la taxa de penetració i el desenvolupament embrionari. També es va analitzar la viabilitat de les cèl·lules de la granulosa per ambdós tractaments. Els resultats obtinguts no mostren diferències significatives per a la maduració nuclear i la integritat de la membrana plasmàtica, ni tampoc per la penetració i el desenvolupament embrionari quan es comparen els dos grups. A més, no s'han obtingut diferències significatives entre la viabilitat de les cèl·lules de la granulosa irradiades i les no irradiades (control). En conclusió, el protocol 5-5-5 de fotoestimulació no genera efectes significatius (ni positius ni deleteris) en la producció *in vitro* d'embrions porcíns pels paràmetres analitzats en el present estudi.

Paraules clau: Fotoestimulació, oòcits, cèl·lules de la granulosa, producció *in vitro*.

Abstract

Photo-stimulation has been demonstrated to affect boar sperm, modifying their metabolism and increasing reproductive performance (farrowing rates and number of both total and live-born piglets for parturition). In contrast, effects of photo-stimulation on oocytes have been less studied and results reported are controversial. The aim of this study was to evaluate the effects of photo-stimulation porcine oocytes during steps involved in embryo *in vitro* production. Regarding that, two treatments were established; photo-stimulated group, irradiated with LED light and control group, non-irradiated. After that, both groups were *in vitro* matured, fertilised and cultured. Photo-stimulation procedure consisted of 5 min light, 5 min rest and 5 min of further light (5-5-5). Finally, nuclear maturation, plasma membrane integrity, penetration rate and embryo development were assessed. Moreover, viability of granulosa cells was also analysed in both treatments. Results obtained did not show significant differences for nuclear maturation, plasma membrane integrity, penetration rates or embryo development when both groups were compared. Also, no significant differences were observed when viabilities of granulosa cells were compared between irradiated and non-irradiated (control) cells. In conclusion, 5-5-5 photo-stimulation procedure does not trigger significant effects (neither deleterious nor positive) on *in vitro* production of porcine embryos.

Key words: Photo-stimulation, oocytes, granulosa cells, *in vitro* production.

INTRODUCCIÓ

En els últims anys, s'ha observat que la fotoestimulació amb làser a nivells baixos (biofotomodulació) millora diversos paràmetres tissulars i cel·lulars, com el metabolisme (Abdel-Salam *et al.*, 2014). En aquest sentit,

s'ha suggerit que la fotoestimulació podria afavorir l'ús de gàmetes, tant masculins com femenins, en la reproducció assistida. Concretament, Yeste i col·laboradors (2016) van observar que la fotoestimulació d'espermatozoides incrementa la taxa de parts i el nombre de garrins totals i vius per part. D'altra banda, diversos inves-

tigadors s'han focalitzat en l'estudi dels efectes de la fotoestimulació en l'espermatozoide, analitzant paràmetres espermàtics com la viabilitat i la motilitat. En canvi, els efectes sobre la maduració oocitària i el posterior desenvolupament d'aquests han set pobrament estudiats.

La maduració dels oòcits, la fecundació i el desenvolupament dels embrions inclouen canvis nuclears i citoplasmàtics que depenen de diversos factors. En efecte, s'ha descrit que les cèl·lules de la granulosa indueixen les transformacions necessàries per regular el creixement i la maduració, ja que permeten el pas de factors de maduració a l'oòcit mitjançant unions comunicants (Fujiwara *et al.*, 1991). Recentment, Soares i col·laboradors (2014) van observar que el làser Heli-Neó (He-Ne) modula l'activitat mitocondrial de les cèl·lules de la granulosa. En concret, la fotoestimulació per làser He-Ne incrementa el potencial de membrana dels mitocondris d'aquestes cèl·lules però no altera la seva viabilitat (Soares *et al.*, 2014). D'altra banda, estudis previs han vist que la irradiació amb làser afecta negativament el procés de maduració i causa danys nuclears en oòcits de boví (Ocaña-Quero, 1998; Moreno-Millan i Ocaña-Quero, 2009). Tot i això, aquest efecte deleteri en la maduració i en el desenvolupament embrionari no es va observar a l'estudi de Soares i col·laboradors (2014), on aquests paràmetres no eren significativament diferents entre els oòcits de boví irradiats i els control.

A partir d'aquests antecedents, l'objectiu d'aquest estudi és analitzar els efectes de la fotoestimulació en els oòcits de porcí, específicament la maduració nuclear, el dany a la membrana plasmàtica de l'oòcit, la penetració i el desenvolupament embrionari. El treball també ha abordat l'estudi dels efectes de la fotoestimulació en la viabilitat de les cèl·lules de la granulosa.

MATERIAL I MÈTODES

La maduració dels oòcits i la producció d'embrions va ser realitzada segons procediments convencionals (Castillo-Martín *et al.*, 2012).

Obtenció, fotoestimulació i maduració dels COCs

Els complexos cúmulus-oòcits (COCs) van ser aspirats d'ovaris de femelles pre-púber, obtinguts de l'escorxadors i es van seleccionar segons l'aspecte del citoplasma i el número de capes de cèl·lules del cúmulus. Abans de realitzar la maduració, els COCs es van dividir aleatòriament en grup control i grup fotoestimulat. Al segon grup s'hi va realitzar la fotoestimulació amb llum LED, amb un sistema programable (PhastBlue, GenIUL, S.L., Barcelona) durant 15 minuts, alternant 5 minuts de

llum, 5 minuts de foscor i 5 minuts de llum (5-5-5). El rang de longitud d'ona utilitzat (620 nm – 630 nm) es trobava en l'espectre del vermell. Posteriorment, els COCs van ser madurats 22 h en medi NCSU-37 (Petters i Wells, 1993) suplementat amb 0.57 mM cisteïna, 50 μ M β -Mercaptoetanol, 5 μ g/mL insulina, 10% (v:v) fluid fol·licular porcí (PFF), 1 mM dibutiril cAMP (dbcAMP), 10 IU/mL gonadotrofina coriònica equina (eCG) i 10 IU/mL gonadotrofina coriònica humana (hCG). Posteriorment, els COCs van ser incubats en medi de maduració sense dbcAMP i hormones durant altres 22 h.

Producció in vitro d'embrions porcíns

Per dur a terme la fecundació, es van seleccionar espermatozoides provinents de semen fresc (17°C) mitjançant un gradient de densitat discontinu de BoviPureTM. A les 44 h de maduració *in vitro*, els oòcits van ser denudats de les cèl·lules de la granulosa i transferits al medi de fecundació TALP (Rath *et al.*, 1999) suplementat amb 3 mg/mL BSA lliure d'àcids grassos i 1.1 mM piruvat sòdic. Els espermatozoides (1×10^5 espermatozoides/mL) van ser coincubats amb els oòcits denudats (50 oòcits/500 μ L) durant 1 h i en medi de fecundació. Transcorreguda l'hora de coincubació, els oòcits van ser transferits a medi de fecundació fresc. A les 6 h post-inseminació (pi), els presumptes zigots van ser rentats i transferits a medi de cultiu NCSU-23 modificat (Petters i Wells, 1993) i suplementat amb 0.57 mM cisteïna, 50 μ M β -Mercaptoetanol, 5 μ g/mL insulina, 10 μ L/mL Medi Essencial Mínim (MEM), 20 μ L/mL Medi Basal Eagle (BME) i 4 mg/mL BSA. El procés de cultiu es va realitzar en microgotes de 25 μ L de medi NCSU-23 (20-25 embrions/microgota) recobertes d'oli mineral. Totes les incubacions es van dur a terme en una atmosfera amb 5% CO₂, 38.5°C i màxima humitat.

Avaluació de la maduració i la integritat de la membrana plasmàtica dels oòcits

La determinació de la integritat de la membrana plasmàtica i l'estadi de maduració dels oòcits es va dur a terme amb un doble marcatge amb homodímer d'etidi i Hoechst 33342. El primer s'uneix als àcids nucleics dels oòcits no viables on la integritat de la membrana plasmàtica es troba alterada, mentre que el segon marca tots els nuclis. Els oòcits utilitzats per determinar la maduració nuclear i la integritat de la membrana plasmàtica van ser denudats de les cèl·lules de la granulosa a les 44 h de l'inici de la maduració *in vitro*. Posteriorment, els oòcits van ser incubats a 37°C amb 4 μ M homodímer d'etidi-1 d'acord amb el protocol descrit per Pomar i col·laboradors (2004). Després de 15 min, els oòcits es

van fixar amb una solució de glutaraldehyd al 25% en PBS, i posteriorment es van incubar amb Hoechst 33342 (5 µg/mL) i es van transferir a un portaobjectes de vidre. El marcatge es va observar sota microscopi de fluorescència i es van identificar els diferents estadis de maduració nuclear dels òcits: vesícula germinal (VG), metafase I (MI), telofase I/metafase II (TI/MII) i degenerat. Els òcits van ser considerats degenerats quan la cromatina estava marcada amb el Hoechst 33342, marcatge blau, i amb l'homodimer d'etidi, marcatge vermell, indicant que la membrana plasmàtica estava malmesa. També es van considerar degenerats els òcits que no estaven marcats i quan el citoplasma presentava fragmentacions. Els percentatges d'òcits en els diferents estadis es va calcular com la ràtio entre el número d'òcits en un estadi i el número total d'òcits analitzats.

Avaluació de la penetració i el desenvolupament embrionari

Entre les 16 i 18 h pi, una part dels presumptes zigots es van fixar i marcar amb Hoechst 33342. L'avaluació dels paràmetres de fecundació es va realitzar mitjançant el recompte del nombre de pronuclis presents i els caps descondensats sota un microscopi de fluorescència. Els òcits amb més d'un pronucli o un pronucli i un o més caps d'espermatozoide descondensats van ser considerats com a penetrats. La taxa de penetració es va calcular com la ratio entre els òcits penetrats i els òcits inseminats. Els òcits degenerats i immadurs (VG i MI) no es van incloure en el càlcul. Els zigots amb dos pronuclis o un pronucli i un cap d'espermatozoide descondensat van ser definits com a monospèrmics, mentre que els polispèrmics presentaven un pronucli i més d'un cap descondensat, o més de dos pronuclis.

La taxa de divisió embrionària es va valorar a les 48 h pi, i la taxa de formació de blastocists es va determinar a les 144 h pi. El percentatge de divisió i de desenvolupament es van calcular com el número d'embrions amb més de 2 blastòmers i el número d'embrions que van assolir l'estadi de blastocists, respectivament, entre el número d'embrions totals transferits a cultiu.

Anàlisi de la viabilitat de les cèl·lules de la granulosa

Una vegada els òcits van ser desproveïts de les cèl·lules del cúmulus, aquestes es van centrifugar 5 min a 240 g a temperatura ambient, i posteriorment es van resuspendre en PBS. A continuació es van marcar amb SYBR (100 µM), durant 10 minuts a 37°C, i iodur de propidi (12 µM) durant 5 minuts a 37°C segons el protocol de Garner i Johnson (1995), i van ser analitzades amb el citòmetre de flux (citòmetre Cell Laboratory Quanta SC™; Beckman Coulter). El doble marcatge

amb aquests fluorocroms va permetre avaluar la viabilitat de les cèl·lules de la granulosa, les quals presentaven un color vermellós quan eren no viables, i verd quan eren viables.

Anàlisi estadística

L'anàlisi estadística dels resultats es va dur a terme mitjançant un test-T de *Student* per determinar si existien diferències significatives entre el grup control i el grup fotoestimulat per totes les dades: taxa de maduració, penetració i monospèrmia, desenvolupament embrionari i viabilitat de les cèl·lules de la granulosa. El test-T de *Student* es va realitzar amb el programa estadístic IBM SPSS (Versió 23.0; Chicago, Illinois, EUA). El nivell de significació (p) va ser establert a 0.05.

RESULTATS

A partir dels resultats obtinguts, que es mostren a la Taula 1, s'observa que no hi ha diferències significatives entre el percentatge d'òcits que assoleixen l'estadi de telofase I i metafase II del grup exposat a fotoestimulació amb llum LED, i el grup control que no va estar exposat. Pel que fa a la integritat de l'oolema, el percentatge d'òcits degenerats és lleugerament superior, però no significativament distint, en els gàmetes exposats a la llum LED.

D'altra banda, la irradiació dels òcits abans de la maduració *in vitro* no va afectar el percentatge de penetració i el de monospèrmia, i tampoc al desenvolupament embrionari avaluat com percentatge de divisió (48 h pi) i el percentatge de blastocists (144 h pi), ja que no es van observar diferències significatives entre el grup control i el fotoestimulat, tal i com mostra la Taula 2. Pel que fa a l'anàlisi dels resultats de la viabilitat de les cèl·lules de la granulosa, representats a la Figura 1, la viabilitat observada al control i al fotoestimulat (76.22 ± 0.41 vs 71.67 ± 0.06 respectivament) va resultar ser similar, i sense diferències significatives.

DISCUSSIÓ

En aquest estudi s'ha comprovat que la fotoestimulació amb llum LED dels òcits porcins amb el protocol realitzat (5-5-5) no té efectes negatius en la progressió de la meiosi i per tant en la maduració nuclear oocitària.

Aquests resultats concorden amb els estudis realitzats prèviament per Soares i col·laboradors (2014), on els òcits de boví van ser irradiats amb llum làser (He-Ne), i en el qual la maduració nuclear, determinada mitjançant el percentatge d'òcits amb el primer corpuscle

Taula 1. Efecte de la fotoestimulació en la maduració nuclear oocitària i la integritat de l'oolema.

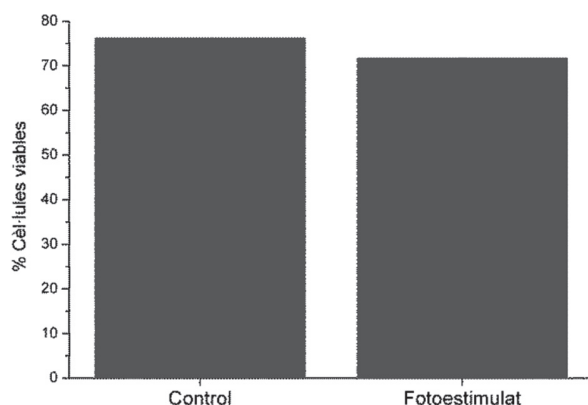
Tractament	Nº oòcits	Percentatge d'oòcits a l'estadi de			
		VG	MI	TI/MIH	Degenerat
Control	334	14.28 ± 2.39	11.30 ± 4.00	70.78 ± 5.15	4.08 ± 1.56
Fotoestimulat	206	10.22 ± 1.56	11.86 ± 4.91	72.25 ± 4.25	4.96 ± 2.40

Els valors mostren la mitjana del percentatge d'oòcits ± l'error estàndard de la mitjana.

Taula 2. Efecte de la fotoestimulació sobre paràmetres de fecundació (% penetració i % monospèrmia) i desenvolupament embrionari.

Tractament	Nº rèpliques	Penetració (%)	Monospèrmia (%)	Divisió (%)	Blastocists (%)
Control	4	53.52 ± 22.84	65.28 ± 21.56	34.00 ± 9.24	4.09 ± 1.87
Fotoestimulat	4	57.08 ± 18.49	50.19 ± 18.80	41.67 ± 13.29	4.96 ± 2.99

Els valors mostren la mitjana del percentatge ± l'error estàndard de la mitjana.

**Figura 1.** Percentatge de cèl·lules de la granulosa viables en el tractament control i el fotoestimulat.

polar extruït a diferents temps, tampoc es veia afectada. Per contra, l'estudi de Moreno-Millan i Ocaña-Quero (2009), també a l'espècie bovina i utilitzant llum làser He-Ne sí que va registrar un efecte significatiu en els processos de maduració amb dany a nivell citoplasmàtic i nuclear per aquells oòcits tractats respecte els no tractats.

A l'espècie porcina, un dels principals inconvenients és l'elevada incidència de la polispermia (50%) que té lloc durant la fecundació *in vitro* en relació a la realitzada *in vivo* (30 - 40%) (Yi *et al.*, 2007). Segons les condicions d'aquest estudi, tampoc s'han registrat efectes de la fotoestimulació en el percentatge d'oòcits penetrats ni en el nombre d'espermatozoides que penetren. El fet que no s'observi un increment en la taxa de

polispermia en els oòcits tractats respecte al grup control indica que la fotoestimulació no altera els processos implicats en el bloqueig de la fecundació polispermica com l'alliberament dels grànuls corticals.

La qualitat dels oòcits és determinant pel desenvolupament embrionari, tant per la divisió

com per la formació de blastocists, i depèn d'una gran ventall de factors. Entre aquests s'inclouen la mida del fol·licle, el metabolisme glicolític relacionat amb un augment del desenvolupament embrionari, la comunicació entre l'oòcit i les cèl·lules de la granulosa, i altres processos citoplasmàtics (Krisher, 2004). En aquest sentit, en el present estudi, la divisió i desenvolupament embrionari tampoc s'ha vist afectat per la fotoestimulació tal i com havien demostrat anteriorment Soares i col·laboradors (2014) determinant la taxa de divisió i de blastocists en l'espècie bovina. Tanmateix, aquests resultats suggereixen que el tractament dels COCs amb llum LED a l'espectre del vermell abans de la maduració no compromet la qualitat dels oòcits i tampoc la seva competència per assolir l'estadi de blastocist.

Per últim, també es va analitzar l'efecte de la fotoestimulació a la viabilitat de les cèl·lules de la granulosa, implicades directament en la maduració oocitària, efecte que no s'ha observat en les nostres condicions. Aquest fet també va en concordança amb els resultats de Soares i col·laboradors (2014), que no van veure una alteració en la viabilitat d'aquestes cèl·lules en boví. Tot i això, a l'estudi mencionat anteriorment, sí que es va registrar un augment de l'activitat mitocondrial d'aquestes cèl·lules. Aquests resultats són similars als obtinguts en gàmetes masculins on també s'ha vist que la fotoestimula-

ció amb llum LED (10 min llum, 10 min fosc, 10 min llum) incrementa significativament el potencial de la membrana mitocondrial (Yeste *et al.*, 2016).

Amb tot, i malgrat l'absència d'efectes deleteris, no s'ha observat cap efecte de millora en cap dels paràmetres analitzats, de manera que són necessaris altres estudis que modifiquin els protocols de fotoestimulació (temps d'irradiació i/o rangs de longitud d'ona) i que avaluïn altres paràmetres com l'activitat mitocondrial per verificar l'efecte de la fotoestimulació en òcits porcins.

En conclusió, la fotoestimulació d'òcits amb llum LED amb el tractament de 5 minuts de llum, seguits de 5 minuts de fosc i 5 minuts de llum no afecta al rendiment dels processos de producció *in vitro* d'embrions porcins.

AGRAÏMENTS

A Frigorífics Costa Brava S.A. pel proveïment d'ovaris per realitzar aquest estudi, i a Estela García, Laia Lladó i Irene Soler pel seu suport tècnic.

BIBLIOGRAFIA

Abdel-Salam, Z.; Harith, M.A. (2015). «Laser researches on livestock semen and oocytes: a brief review». *J Adv Res.*, vol. 6, núm. 3, p. 311-317.

Castillo-Martín, M. [et al.] (2012). «Cryotolerance of *in vitro*-produced porcine blastocysts is improved when using glucose instead of pyruvate and lactate during the first 2 days of embryo culture». *Reprod. Fertil. Dev.*, vol. 24, núm. 5, p. 737-745.

Fujiwara, A. [et al.] (1991). «Activating effects of light irradiation at various wavelength on the respiration in sperm of the echinoid, *Urechis unicinctus*, in the presence of carbon monoxide». *J Biochem.*, vol. 109, núm. 3, p. 486-491.

Garner, D. L.; Johnson, L. A. «Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide». *Biol. Reprod.*, vol. 53, núm. 2, p. 276-284.

Krisher, R.L. (2004). «The effect of oocyte quality on development». *J Anim Sci.*, vol. 82, Suppl. E, p. 14-23.

Moreno-Millán, M.; Ocaña-Quero, J.M. (2009). «Preliminary results of the evaluation of the use of clinical laser He-Ne radiation in the process of bovine 'in vitro' fertilization». *Bulletin UASVM Vet Med.*, vol. 66, núm. 1, p. 495.

Ocaña-Quero, J.M. [et al.] (1998). «Helium-Neon (He-Ne) laser irradiation increases the incidence of unreduced bovine oocytes during the first meiotic division *in vitro*». *Lasers Med Sci.*, vol. 13, núm. 4, p. 260-264.

Petters, R.M.; Wells, K.D. (1993). «Culture of pig embryos». *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, vol. 48, p. 61-73.

Pomar, F.J. [et al.] (2004). «Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study». *Theriogenology*, vol. 63, núm. 8, p. 2254-2268.

Rath, D. [et al.] (1999). «In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer». *J. Anim. Sci.*, vol. 77, núm. 12, p. 3346-3352.

Soares, C.A. [et al.] (2014). «Photobiological effect of low-level laser irradiation in bovine embryo production system». *J Biomed Opt.*, vol. 19, núm. 3, p. 35006-1-35006-9.

Yeste, M. [et al.] (2016). «Specific LED-based red light photo-stimulation procedures improve overall sperm function and reproductive performance of boar ejaculates». *Sci Rep.*, vol. 6, 22569.

Yi, Y.J. [et al.] (2007). «Ubiquitin C-terminal hydrolase-activity is involved in sperm acrosomal function and anti-polyspermy defense during porcine fertilization». *Biol Reprod.*, vol. 77, núm. 5, p. 780-793.

SEGONA BIÒPSIA D'EMBRIONS AMB RESULTATS DE PGS NO CONCLOENTS

Marina Sumarroca^{1,*}, Mònica Parriego¹, Lluc Coll¹, Montserrat Boada¹, Sílvia Mateo¹, Bonaventura Coroleu¹, Marta Devesa¹, Anna Veiga^{1,2}

¹Servei de Medicina de la Reproducció, Departament d'Obstetrícia, Ginecologia i Reproducció, Hospital Universitari Dexeus, Barcelona, Espanya. *marinasumarroca@gmail.com

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

Resum

En el context del diagnòstic genètic preimplantacional, la biòpsia del trofòctoderm de blastocists ha demostrat presentar importants avantatges respecte la biòpsia d'un únic blastòmer en D+3. Una de les més destacables, és la disminució significativa del percentatge d'embrions que queden sense diagnòstic (SD) posteriorment a la biòpsia i la realització de l'anàlisi genètica. Tanmateix, determinades pacients es poden veure especialment afectades per aquest percentatge residual d'embrions SD. L'objectiu d'aquest estudi ha estat determinar si la re-biòpsia i re-vitrificació de blastocists és un procediment vàlid, segur i raonable per ser aplicat en casos en que no ha estat possible l'obtenció de resultats a partir de la primera anàlisi.

Un total de 33 blastocists de 31 pacients van ser descongelats i se'ls hi va realitzar una segona biòpsia i anàlisi. Un 87.9% dels embrions van sobreviure a la descongelació i un 86.2% d'aquests es van re-expandir i van poder ser biopsiats. Dels blastocists re-biopsiats, un 92.0% es van diagnosticar amb èxit, amb una taxa d'euploidia del 69.6%. Vuit blastocists euploides re-biopsiats i re-vitrificats han estat transferits fins a data d'avui, amb una taxa de supervivència i re-expansió post-descongelació del 100%. S'han aconseguit un total de 5 gestacions clíniques: 3 evolutives i 2 que van acabar en avortament espontani. Malgrat que el nombre de blastocists re-biopsiats transferits és encara limitat, els resultats senyalen que l'estratègia de re-biòpsia i re-vitrificació de blastocists SD pot ser una opció vàlida, recomanable i que pot oferir bons resultats. Així doncs, la re-biòpsia d'embrions inicialment SD permet rescatar i transferir embrions euploides, i millorar la taxa d'embaràs acumulada per cicle.

Paraules clau: PGS, blastocist, biòpsia de trofòctoderm, vitrificació.

Abstract

In the context of preimplantation genetic diagnosis, trophoctoderm biopsy has shown to offer significant advantages over blastomere biopsy on D+3. One of the most remarkable ones is the notable decrease in the percentage of undiagnosed embryos after performing the biopsy and genetic analysis. However, patients with few or no euploid embryos can be specially affected by this residual percentage of diagnosis failure. The aim of this study was to assess whether blastocist re-biopsy and re-vitrification is a reasonable and safe procedure to be applied in cases of inconclusive or no results after the first PGS analysis. A total of 33 blastocysts from 31 patients were warmed to perform a second biopsy and genetic analysis. Among them, 87.9% survived after warming, and 86.2% of them re-expanded and could be biopsied again. Out of the re-biopsed blastocysts, 92% could be successfully diagnosed, with an euploidy rate of 69.6%. Eight euploid re-biopsed and re-vitrified blastocysts have been transferred to date, with a survival and re-expansion rate of 100% after warming. Five clinical pregnancies have been achieved with 3 ongoing pregnancies and 2 miscarriages. Although few transfers of re-biopsied and re-vitrified blastocysts have been performed to date, our preliminary results show that the re-biopsy and re-vitrification of undiagnosed blastocysts is a safe and reasonable approach, as it ultimately allows the transfer of euploid embryos and good clinical outcomes.

Key words: PGS, blastocyst, trophoctoderm biopsy, vitrification.

INTRODUCCIÓ

Les millores introduïdes en els darrers anys en els cicles de Fecundació *In Vitro* (FIV) i, en particular, en els cicles de FIV amb diagnòstic genètic amb cribatge d'aneuploidies (PGS), han suposat l'inici d'una nova

era pel PGS (revisat per Sermon et al, 2016) i han permès una millora dels resultats obtinguts (Forman et al., 2013; Schoolcraft et al., 2010; Yang et al., 2014).

Una de les modificacions metodològiques més importants, juntament amb l'aplicació de tècniques d'anàlisi cromosòmica completa, ha estat el canvi en el mo-

ment de la biòpsia de D+3 a l'estadi de blastocist. La biòpsia de trofoectoderm presenta diversos beneficis respecte a la biòpsia d'un sol blastòmer en D+3. Per una banda, s'ha demostrat que, el procediment és menys perjudicial per l'embrió i per tant hi ha menys risc d'afectar-ne la viabilitat (Scott et al., 2013). A més, el fet de seleccionar els embrions per cultiu fins a blastocist prèviament a la biòpsia suposa un increment en el cost-eficiència de la tècnica, ja que el nombre d'embrions a biopsiar és menor (Adler et al., 2014). Finalment, l'anàlisi de múltiples cèl·lules (4-8) respecte l'anàlisi d'un sol blastòmer en biòpsies d'embrions en D+3 s'associa a una major robustesa diagnòstica. Una altra de les avantatges associades al major nombre de cèl·lules disponibles per l'anàlisi en la biòpsia de trofoectoderm és la disminució significativa en el percentatge d'embrions que queden sense diagnòstic concloent després de l'anàlisi genètica (del 10% amb biòpsia de blastòmer fins a menys del 5% amb biòpsia de trofoectoderm) (Forman et al., 2012). Tot i així, les pacients sense o amb pocs embrions euploides, es poden veure especialment afectades per aquest percentatge residual de fallada de diagnòstic.

La desvitrificació i re-biòpsia de blastocists sense diagnòstic concloent (SD) pot representar una solució per a pacients de PGS amb embrions sense diagnòstic que, pel risc augmentat de generar embrions aneuploides, no solen voler assumir la seva transferència sense disposar de diagnòstic.

L'objectiu d'aquest estudi ha estat conèixer si la re-biòpsia i re-vitrificació de blastocists és un procediment justificat i segur que es pot aplicar en casos en què no s'han obtingut resultats a partir de la primera anàlisi de PGS.

MATERIAL I MÈTODES

Estimulació ovàrica, recuperació d'òcits i cultiu embrionari:

Les pacients van ser sotmeses a un tractament inductor de l'ovulació amb agonistes o antagonistes de la GnRH. Tant els protocols per l'estimulació ovàrica com per la monitorització del creixement fol·licular mitjançant ecografia i nivells hormonals d'estradiol en sang perifèrica van ser els emprats habitualment al nostre centre i han estat descrits prèviament (Barri et al., 2002). La recuperació dels òcits es va realitzar sota control ecogràfic transvaginal 36 hores després de l'administració de l'hCG.

Per la manipulació i el cultiu de gàmetes i embrions al laboratori es van utilitzar els medis de la sèrie Global® seguint estrictament les instruccions d'ús recomanades. El cultiu dels embrions es va realitzar en un incubador Embryoscope® amb tecnologia time-lapse, a

37°C de temperatura i concentracions de CO₂ i O₂ del 6% i 5% respectivament.

Biòpsia de trofoectoderm:

Tant per l'obertura de la zona pelúcida en D+3 com per a la biòpsia dels blastocists (D+5/+6 o +7) es va emprar metodologia làser (Veiga et al., 1997, Boada et al., 1998). Tots els embrions que van assolir l'estadi de blastocist i van herniar, es van biopsiar, obtenint-se de 4 a 8 cèl·lules de cada trofoectoderm embrionari. Immediatament després de la biòpsia, els blastocists es van vitrificar emprant els medis i protocols habituals al nostre centre (Solé et al., 2013).

Les cèl·lules biopsiades van rentar-se amb una solució de PBS (Phosphate Buffered Saline) al 0.1% de PVA (Polyvinyl Alcohol) i van dipositar-se en condicions estèrils en tubs de PCR en 1.5 µl de PBS. Van mantenir-se congelades a -80°C fins al moment de l'anàlisi genètica.

Les mostres van ser processades per amplificar tot el genoma (WGA, *Whole Genome Amplification*). Es va utilitzar el kit comercial Sureplex® DNA Amplification (Illumina®) seguint les instruccions descrites pel fabricant. Les mostres de DNA amplificades es van processar per a la seva anàlisi mitjançant arrays de CGH emprant el kit comercial 24Sure® Microarray Pack (Illumina®) seguint el protocol recomanat. Per l'anàlisi dels arrays es va utilitzar un escàner Innopsys 70 i les imatges van ser interpretades emprant el software facilitat per la casa comercial (Bluefuse®, Illumina®). Els embrions van ser classificats com normals, anormals o sense diagnòstic concloent (si no s'havia produït amplificació o els perfils obtinguts no eren interpretables).

Segona biòpsia de trofoectoderm:

Des de gener de 2015 va oferir-se a les pacients de PGS que disposaven d'embrions sense diagnòstic concloent (SD) sotmetre aquests embrions a un segon procés de biòpsia.

Les pacients van rebre informació específica en relació al procediment a realitzar i a la possibilitat de pèrdua embrionària degut a la manipulació addicional. Aquelles que van accedir van signar un consentiment informat.

En tots aquests casos, els blastocists SD es van desvitrificar seguint el protocol habitual del centre. Els blastocists supervivents es van deixar en cultiu fins a la re-expansió i, en els casos en que es va produir, va realitzar-se una segona biòpsia seguida d'una re-vitrificació. La metodologia emprada tant per a la re-biòpsia com per a la re-vitrificació va ser la mateixa utilitzada per dur a terme el primer procediment.

El processat de les cèl·lules biopsiades i l'anàlisi genètica també van realitzar-se emprant els protocols utilitzats prèviament i que ja han estat descrits.

Criotransferència dels embrions euploides:

La preparació endometrial i els procediments de laboratori dels cicles de criotransferència van ser els emprats habitualment en el nostre centre i han estat descrits prèviament (Martínez et al., 2006). La transferència va realitzar-se amb seguiment ecogràfic (Coroleu et al., 2002). El primer control d'embaràs va realitzar-se 10 dies post-transferència.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Van desvitrificar-se 33 blastocists procedents de 31 pacients per dur a terme una segona biòpsia. Van sobreviure 29 blastocists que es van cultivar (29/33, 87.9%), 25 dels quals es van re-expandir (25/29, 86.2%) i es van poder re-biopsiar. Va obtenir-se un diagnòstic concloent de 23 dels blastocists analitzats (23/25, 92.0%), dels quals 16 van resultar euploides (16/23, 69.6%) i es van mantenir congelats per a ús reproductiu.

El motiu del no diagnòstic inicial dels 33 blastocists desvitrificats va ser en 19 casos la manca d'amplificació després d'aplicar el protocol de WGA i en 14 casos la baixa qualitat dels resultats obtinguts.

La taxa d'euploidia obtinguda després de la re-biòpsia dels embrions inicialment SD a causa d'absència d'amplificació genòmica va ser del 50% (7/14). A diferència, la taxa d'euploidia va resultar del 100% (9/9) en els casos de baixa confiança dels perfils obtinguts a partir del DNA amplificat de la primera biòpsia.

A dia d'avui, 8 dels 16 blastocists re-biopsiats caracteritzats com a euploides han estat descongelats per a ús reproductiu. Els 8 blastocists van sobreviure a la descongelació, es van re-expandir després del cultiu *in vitro* i es van transferir a 8 pacients. Es van aconseguir 5 gestacions clíniques, 2 de les quals van acabar en avortament, i les 3 restants evolucionen favorablement i ja han superat el segon trimestre de gestació.

Les nostres dades, han mostrat una taxa de supervivència a la descongelació dels blastocists SD pautats per a re-biopsiar inferior a la observada en els blastocists euploides del nostre programa de PGS (87.9% vs 97.8%). A més, hi ha un cert percentatge de blastocists que tot i sobreviure a la desvitrificació, no van aconseguir re-expandir-se, no resultant aptes per a la re-biòpsia (13.8% dels que sobreviuen a la descongelació). És possible que la causa de no resultat inicial en aquests blastocists fos intrínseca de l'embrió, i vindria associada a una qualitat compromesa dels blastocists que no

permetria l'obtenció d'un resultat concloent després de la primera biòpsia (trofoectoderms amb molt poques cèl·lules, mala qualitat del DNA de les cèl·lules biopsiades...). Seria útil en aquest sentit, doncs, transmetre la informació en relació a la qualitat dels blastocists als pacients per evitar generar falses expectatives. Malgrat tot, la gran majoria dels embrions que van sobreviure a la descongelació, es van re-expandir, i van ser biopsiats per segona vegada, podent ser diagnosticats amb èxit. Així, el percentatge d'embrions que després d'una segona biòpsia romanen no concloents és residual.

Tot i que 16 embrions re-biopsiats han estat caracteritzats com a euploides, fins al moment només se n'han transferit 8. Cal tenir en compte que, en el cas que la pacient disposés d'altres embrions euploides, sotmesos a un únic procediment de biòpsia, es va prioritzar la transferència d'aquests per davant de la transferència dels embrions re-biopsiats.

La taxa de supervivència i re-expansió dels blastocists re-biopsiats en els 8 cicles pautats per a la transferència va resultar del 100%, podent ser transferits tots els embrions descongelats. Els resultats clínics obtinguts després de la transferència d'embrions re-biopsiats resulten satisfactoris tot i que, la baixa casuística disponible fins al moment fa necessari de continuar fent el seguiment de les gestacions procedents d'embrions re-biopsiats.

Per últim, no es pot descartar que l'ús de tècniques diagnòstiques més sensibles, com la seqüenciació massiva, haguessin permès obtenir un diagnòstic concloent a partir de la primera biòpsia en alguns dels embrions que no van poder ser diagnosticats mitjançant la tècnica emprada, sense la necessitat de realitzar una segona biòpsia. No obstant, això no seria possible en la majoria dels casos, ja que el no resultat venia donat per una absència d'amplificació.

CONCLUSIÓ

El nombre d'embrions re-biopsiats que han estat transferits fins a dia d'avui és limitat. Tanmateix, els resultats obtinguts indiquen que la re-biòpsia i re-vitrificació d'embrions que havien quedat sense diagnòstic a partir del primer anàlisi pot ser una aproximació vàlida i recomanable, que ofereix uns bons resultats clínics. Així doncs, el procediment de re-biòpsia permet rescatar euploides amb finalitats reproductives, i en conseqüència, millorar la taxa d'embaràs acumulada per cicle.

REFERÈNCIES

Adler A, Lee HL, McCulloh DH, Ampeloquio E, Clarke-Williams M, Wertz BH, Grifo J (2014) Blastocyst

- culture selects for euploid embryos: comparison of blastomere and trophoectoderm biopsies. *Reprod. Biomed. Online* 28, 485-491.
- Barri PN, Martínez F, Coroleu B, Tur R (2002) The role of GnRH antagonists in assisted reproduction. *Reprod. Biomed. Online* 5 Suppl. 1, 4-19.
- Boada M, Carrera M, De La Iglesia C, Sandalinas M, Barri PN, Veiga A (1998) Successful Use of a Laser for Human Embryo Biopsy in Preimplantation Genetic Diagnosis: Report of Two Cases. *J. Assist. Reprod. Genet.* 15, 302-307.
- Capalbo A, Romanelli V, Cimadomo D, Girardi L, Stoppa M, Dovere L, Dell'Edera D, Ubaldi FM, Rienzi L (2016) Implementing PGD/PGD-A in IVF clinics: considerations for the best laboratory approach and management. *J Assist Reprod Genet* 33, 1279-1286.
- Coroleu B, Barri PN, Carreras O, Martínez F, Veiga A, Balasch J (2002) The usefulness of ultrasound guidance in frozen-thawed embryo transfer: a prospective randomized clinical trial. *Hum. Reprod.* 17, 2885-90.
- Forman EJ, Hong KH, Ferry KM, Tao X, Taylor D, Levy B, Treff NR, Scott RT (2013) In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertility and Sterility* 100, 100-107.
- Forman EJ, Hong KH, Treff NR, Scott RT (2012) Comprehensive Chromosome Screening and Embryo Selection: Moving Toward Single Euploid Blastocyst Transfer. *Semin Reprod. Med.* 30, 236-242.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Toschi M, Espósito F, Fasolino MC (2004) The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability. *Human Reproduction* 19, 1163-1169.
- Magli MC, Pomante A, Cafueri G, Valerio M, Crippa A, Ferraretti AP, Gianaroli L (2016) Preimplantation genetic testing: polar bodies, blastomeres, trophoectoderm cells, or blastocytic fluid?. *Fertility and Sterility* 105, 676-683.
- Martínez F, Boada M, Coroleu B, Clua E, Parera N, Rodríguez I, Barri PN. (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* 21, 2121-5
- Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munné S, Katz-Jaffe MG, Wells D (2010) Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertility and Sterility* 94, 1700-6.
- Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR (2013) Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertility and Sterility*. 100, 624-630.
- Sermon K, Capalbo A, Cohen J, Coonen E, DeRycke M, De Vos A, Delhanty J, Fiorentino F, Gleicher N, Griesinger G, Grifo J, Handyside A, Harper J, Kokkali G, Mastenbroek S, Meldrum D, Meseguer M, Montag M, Munné S, Rienzi L, Rubio C, Scott K, Scott R, Simon C, Swain J, Treff N, Ubaldi F, Vassena R, Vermeesch JR, Verpoest W, Wells D, Geraedts J (2016) The why, the how and the when of PGS 2.0: current practices and expert opinions of fertility specialists, molecular biologists and embryologists. *Molecular Human Reproduction* 0, 1-13.
- Solé M, Santaló J, Boada M, Clua E, Rodríguez I, Martínez F, Coroleu B, Barri PN, Veiga A (2013) How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes. *Hum Reprod.* 28, 2087-2092
- Veiga A, Sandalinas M, Benkhalifa M, Boada M, Carrera M, Santaló J, Barri PN, Ménézo Y (1997) Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the human. *Zygote* 5, 351-354
- Yang Z, Zhang J, Salem SA, Liu X, Kuang Y, Salem RD, Liu J (2014) Selection of competent blastocysts for transfer by combining time-lapse monitoring and array CGH testing for patients undergoing preimplantation genetic screening: a prospective study with sibling oocytes. *BMC Med Genomics*. 22, 1-13.

EFFECTES DE LA FUSIÓ CEL·LULAR I LA DIVISIÓ DIRECTA EN EL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI

Quera Roldán, Mariona*; Florensa Bargalló, Mireia; Esbert Algam, Marga

IVI Barcelona

Ronda General Mitre, 14 08017 Barcelona

mariona.quera@ivi.es, mireia.florensa@ivi.es, marga.esbert@ivi.es

INTRODUCCIÓ

La introducció de la tecnologia *time-lapse* a la embriologia clínica ha suposat un gran avenç, que ha contribuït a ampliar i millorar els coneixements sobre el desenvolupament embrionari. El *time-lapse* ha aportat informació tant del tipus de divisions cel·lulars associades a la citocinesis i cariocinesis, com dels temps en els que tenen lloc aquests fenòmens. A més una de les avantatges d'aquesta tecnologia és que ofereix la possibilitat d'avaluar amb més detall, de forma no invasiva i de manera més flexible el desenvolupament dels embrions.

Edwards i col·laboradors varen ser els primers en relacionar el temps de la primera divisió mitòtica (divisió primerenca) amb millors taxes de gestació, definint la primera divisió mitòtica com la divisió del zigot a un embrió de dos cèl·lules entre les 25-27h (Edwards RG. et al. 1984). Actualment varies publicacions han proposat l'ús de la morfocinètica com a paràmetre complementari per la selecció embrionària (Lemmen JG. et al 2008, Meseguer M. et al 2011, Basile N. et al 2014, Rubio I. et al 2014).

D'altra banda, alguns autors han establert, que el cicle cel·lular ha de durar idealment entre 10 i 12 hores, permetent la replicació completa de tot el genoma i posterior citocinesis (Aguilar J. et al 2014).

La identificació de nous fenòmens que impliquen una divisió anòmala de l'embrió és només possible utilitzant la tecnologia *time-lapse* ja que aquesta informació és perd amb la valoració morfològica clàssica per les seves limitacions, fonamentalment la subjectivitat associada al criteri de l'embrióleg i la observació estàtica i rígida dels embrions (Scott L. et al 2003). Dos dels fenòmens observats són les fusions (F; reducció en el número de cèl·lules durant la citocinesis) i les divisions directes (DD; pas d'una cèl·lula directament a tres o més cèl·lules). L'impacte d'aquests fenòmens durant la divisió cel·lular podria estar relacionat amb la disminució del potencial d'implantació de l'embrió.

En aquest sentit Hickman i col·laboradors van quantificar que el percentatge d'embrions que patien fusions era del 10% i que la taxa d'implantació d'aquests embrions era significativament més baixa (Hickman et al. 2012).

Per altra banda el grup de Rubio va estudiar la divisió directa de les blastòmeres, i va observar que la incidència d'aquest fenomen era del 14% i que la capacitat d'implantació embrionària també es veia compromesa (Rubio I. et al 2012). Altres articles recents han recolzat aquesta teoria (Ando et al. 2012, Liu Y. et al 2014, Desai N. et al 2014, Athayde K. et al 2014, Ciray HN. et al 2014).

JUSTIFICACIÓ

Una bona valoració de la qualitat embrionària és essencial ja que l'objectiu dels tractaments de reproducció assistida és aconseguir un embaràs amb un recent nascut viu sa idealment a partir de la transferència d'un únic embrió.

Per tant, un cop identificats aquests fenòmens el que ens correspon preguntar és: quina o quines en són les possibles causes? I Quins són els efectes?.

L'objectiu d'aquest estudi és avaluar si factors com l'edat materna i la qualitat seminal influeixen en la incidència de la fusió cel·lular i/o la divisió directa i la repercussió d'aquests fenòmens en el desenvolupament embrionari.

MATERIAL I MÈTODES

Estudi retrospectiu on es van analitzar 4518 embrions obtinguts a partir de 702 cicles de fecundació in vitro consecutius fets entre 2013 i 2015 a l'IVI Barcelona. En tots els casos, el mètode d'inseminació va ser l'ICSI. El cultiu i monitorització embrionaris es van realitzar en

un incubador amb sistema *time-lapse* incorporat (Embryoscope®, Vitrolife). Les imatges es van gravar automàticament en set plans focals cada 10 minuts.

Els resultats obtinguts van ser analitzats a partir de models de regressió logística i multinomial.

RESULTATS

Es van observar fusions en 138 embrions (3.05%), divisions directes en 368 (8.14%) i en 104 (2.30%) es van observar els dos fenòmens (fusions i divisions directes).

No es van trobar diferències estadísticament significatives en la mitjana d'edat de les pacients quan es comparava la presència o no de F i/o DV (37.3 ± 2.61 vs. 37.4 ± 4.06 and 37 ± 3.2 vs. 37.5 ± 4.08 respectivament) Fig 1.

En relació a la qualitat seminal, es van estudiar tres grups de pacients en funció de la concentració i mobilitat espermàtica, oligozoospermia, oligoastenozoospermia i normozoospermia. La incidència de F i/o DV era similar en els tres grups estudiats F (29.6, 23.4 i 19.1%) i DV (40.7, 29.8 i 37.4%) Fig 2.

La presència de F o DV afecta negativament al desenvolupament embrionari. La probabilitat que un embrió arribi a l'estadi de blastocist és significativament més baixa (*odds ratio* (OR) 0.49; 0.33, respectivament) i la probabilitat que sigui un embrió no viable augmenta (OR 2.13; 3.94, respectivament).

CONCLUSIONS

Segons els resultats obtinguts, ni l'edat materna ni la qualitat seminal afecten la probabilitat d'experimentar una F o DV. D'altra banda, la presència de fusions i divisions directes es correlaciona amb una baixa taxa de blastocist i una alta probabilitat de ser descartat degut a una mala qualitat embrionària.

REFERÈNCIES

- Aguilar J. et al. (2014). The human first cell cycle: impact on implantation. *Reprod Biomed Online*. 2014 Apr; 28(4):475-484
- Ando H. et al. (2012). Time-lapse embryo observation identifies abnormal cleavage as a poor prognosis on implantation: crumble and twist. *Hum Reprod*. 2012 27 (suppl 2): ii103-ii105
- Athayde Wirka K. et al. (2014). Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. *FertilSteril*. Jun; 101(6):1637-1648

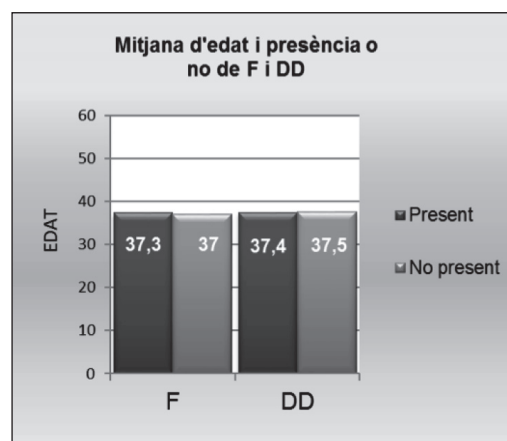


Fig. 1.

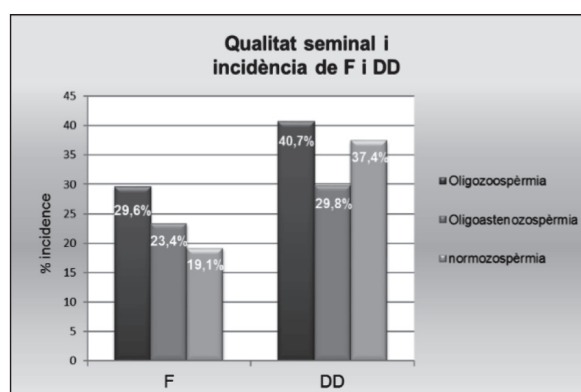


Fig. 2.

Basile N. et al. (2014). Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *FertilSteril*. Mar; 101(3): 699-704.

Ciray HN. et al. (2014). Time-Lapse User Group. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Hum Reprod*. Dec;29(12):2650-2660.

Desai N. et al. (2014). Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reprod Biol Endocrinol*. Jun 20; 12:54

Edwards RG. et al. (1984). Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. Mar;1(1):3-23.

Hickman CFL. et al. (2012). Reverse Cleavage: its significance with regards to human embryo morphokinetics, ploidy and stimulation protocol. *Hum Reprod*. 27 (suppl 2): ii103-ii105.

- Lemmen JG. et al. (2008). Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online* Sep; 17(3):385-91.
- Liu Y. et al. (2014). Prevalence, consequence, and significance of reverse cleavage by human embryos viewed with the use of the Embryoscope time-lapse video system. *FertilSteril*. Nov; 102(5):1295-1300.
- Meseguer M. et al. (2011).. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod*. Oct; 26(10):2658-71.
- Rubio I. et al. (2014). Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *FertilSteril*. 2014 Nov; 102(5):1287-1294.
- Rubio I. et al. (2012). Limites implantation succes of direct-cleaved human zygots: a time-lapse study. *FertilSteril*; Dec; 98(6):1458-1463.
- Scott L. (2003). The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Human Reprod Update* 9:237-249.

RELACIÓ D'AUTORS

Ausió, Joan

Ballescà, Josep Lluís

Barrachina, Ferran

Barceló, Andrea

Benet Català, Jordi

Blanco, Joan

Boada, Montserrat

Bonet, Sergi

Bonilla-Correal, Sebastián

Briz, M. Dolors

Bussalleu, Eva

Castillo-Martín, Miriam

Cerdà, Joan

Chauvigné, François

Coll, Lluç

Coroleu, Bonaventura

Corral, Juan Manuel

Devesa, Marta

Esbert Algam, Marga

Estanyol, Josep Maria

Ferré, Alba

Florensa Bargalló, Mireia

Fonseka, Gothami

Frodsham, Richard

Gadani, Beatrice

Garcia-Bonavila, Estela

García-Peiró, Agustín

Garcia-Segura, Sergio

Gil, Debora

Goudarzi, Afsaneh

Gracia Catalá, Maria

Grossmann i Camps, Mark

Guix Galcerán, Cristina

Iglesia, Alberto de la

Jodar, Meritxell

Khochbin, Saadi

Lara Cerrillo, Sandra

Mallofré, Carme

Martínez-Abadi, Sandra

Mateo, Sílvia

Miro, Jordi

Nigel Finn, Roderick

Noto, Federico

Oliva, Rafael

Olivares Vela, Raúl

Parriego, Mònica

Piferrer, Francesc

Pla, Susanna

Quera Roldán, Mariona

Rabanal Anglada, Anna

Ribas, Laia

Ribas Maynou, Jordi

Ribes, Enric

Rodriguez-Carunchio, Leonardo

Rodriguez-Gil, Joan E.

Rousseaux, Sophie

Sánchez-Baizán, Núria

Sancho, Sílvia

Saperas, Núria

Sarrate, Zaida

Selva Viñals, Carla

Serra Ortiz, Olga

Solé, Mireia

Soler-Ventura, Ada

Sumarroca, Marina

Valero, Oliver

Veiga, Anna

Vidal, Francesca

Yeste, Marc

Zamora Corzo, Luis



Institut
d'Estudis
Catalans