

BAÚL DE LA CIENCIA

La importancia de la contribución paterna en el desarrollo embrionario: los ARN espermáticos

David García Valcarce¹, Florentino Garrido Gonzalez², Elsi Suárez Álvarez², Ángel J. Luengos Martínez², Vanesa Robles Rodríguez¹

¹Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL) y Departamento de Biología Molecular (Área de Biología Celular) de la Universidad de León.

²Centro Ginecológico de León, Clínica San Francisco.

Estudios clínicos han descrito una mayor incidencia de ciertas enfermedades en los nacidos a partir de tecnologías de reproducción asistida tales como los síndromes de Prader-Willi, Angelman o Beckwith-Wiedemann. Aunque los espermatozoides son células transcripcionalmente inactivas, durante los últimos años se ha demostrado que algunos de sus ARN mensajeros pueden tener un importante papel como marcadores de interés clínico (de fertilidad masculina y de éxito en el embarazo). Además, cada vez se encuentran más datos que hacen pensar que estas moléculas tienen un importante papel en las primeras etapas del desarrollo embrionario. Por lo tanto, es crucial conocer si los protocolos rutinarios en las técnicas de reproducción asistida afectan a las poblaciones de transcritos espermáticos y es necesario ahondar en sus verdaderas funciones. En este trabajo se describen las diferentes poblaciones de ARN espermáticas y sus posibles usos como herramientas diagnósticas en clínica.

Palabras clave: ARNm, semen, humano, ARTs, biotecnología.

ARN espermáticos y las tecnologías de reproducción asistida

Las técnicas de fecundación *in vitro* (IVF) e inyección intracitoplasmática (ICSI) han supuesto, desde los inicios de su aplicación en los años 70, una verdadera revolución en el campo de la biomedicina como tecnologías de reproducción asistida (ARTs). Sin embargo, se ha comprobado tras realizar estudios clínicos, que existe una mayor incidencia de ciertos problemas y enfermedades en los nacidos a partir de estas técnicas. Por ejemplo, el bajo peso al nacer se ha relacionado con diferentes factores tales como nacimientos múltiples, edad materna o la propia técnica per se (Maher et al., 2003a). No obstante, algunos de los procedimientos utilizados en ARTs, no han sido contemplados como posibles factores causantes de la aparición de tales problemas médicos. Algunas de las técnicas que son comúnmente utilizadas para la conservación de espermatozoides que posteriormente serán utilizados para IVF, por sí mismas, pueden provocar cam-

bios en la presencia de transcritos, cambios epigenéticos y diversos tipos de daño genético.

A nivel molecular, se ha comprobado que existen alteraciones epigenéticas directamente implicadas en algunas de estas patologías con mayor incidencia en los nacidos a partir de ARTs. Ejemplos de estas perturbaciones son: el síndrome Beckwith-Wiedemann, el síndrome de Angelman o el síndrome de Prader-Willi (Maher et al., 2003b; Carrell et al., 2010).

El síndrome de Beckwith-Wiedemann es un modelo de enfermedad congénita asociada a la impronta genómica resultante de mutaciones o epimutaciones que afectan a los genes en el cromosoma 11p15.5. Asimismo, el síndrome de Angelman puede ser producido por una delección en el cromosoma 15, disomías uniparentales, mutaciones en el gen *UBE3A* o por defectos en la impronta. Del mismo modo, el síndrome de Prader-Willi, muy semejante al de Angelman, es una enfermedad genética producida por la ausencia de la expresión de un alelo localizado en la región 15q11-q13. Todas estas enfermedades presentan una serie de síntomas comunes tales como problemas cognitivos, alteraciones en el desarrollo, capacidad lingüística reducida, falta de atención y de coordinación motriz.

Además de las alteraciones epigenéticas, se ha comprobado que el daño genético es un importante factor a tener en cuenta, ya que se ha visto que es un elemento común entre hombres con problemas de infertilidad y también se asocia con un aumento significativo de pérdidas embrionarias tras IVF e ICSI (Zini et al., 2008). Además de la importancia de preservar la integridad del ADN espermático, durante los últimos años se ha reconocido la gran importancia de las moléculas de ARN presentes en los espermatozoides para el correcto desarrollo embrionario temprano (Boerke et al., 2007). En este artículo nos centraremos en estas poblaciones de ARN espermáticos y en la necesidad de preservarlas, aunque esto supusiera adaptar o modificar algunas de las técnicas empleadas en las ARTs.

El papel de los ARN espermáticos

Los espermatozoides que se liberan en el eyaculado son el resultado de un importante proceso de diferenciación llamado espermatogénesis. La cabeza de estas células solo contiene dos orgánulos con doble membrana: el núcleo hipercompactado y el acrosoma (Boerke et al., 2007). Sin embargo, no encontramos retículo endoplasmático, aparato de Golgi, lisosomas, peroxisomas ni ribosomas. Así pues, nos hallamos ante células altamente diferenciadas, transcripcio-

nalmente inactivas, con el mínimo citoplasma posible y núcleo compactado, como se puede ver en la **Fig. 1**. Su diseño está perfectamente adaptado a su función: la fertilización del ovocito.

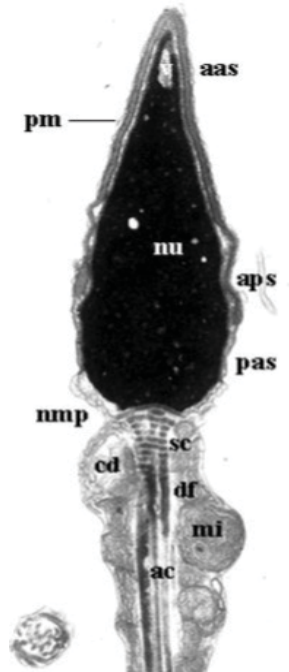


Figura 1. Ultraestructura del espermatozoide humano maduro (aas: segmento anterior acrosomal; pm: membrana plasmática; nu: núcleo; aps: segmento acrosomal posterior; pas: envoltura acrosomal posterior; nmp: poros de la membrana nuclear; sc: columnas segmentadas; cd: gota citoplasmática; df: fibras densas; mi: mitocondria; ac: complejo axonemal). Modificado de Dadoune et al., 2009.

Hoy en día es evidente que el papel del espermatozoide no se reduce únicamente a transmitir el genoma haploide paterno, sino también a proporcionar otras moléculas al cigoto como parte de la contribución multilateral paterna. El macho, además de suministrar el genoma esencial en la fertilización, también aporta orgánulos (centriolo en humanos y primates), proteínas específicas masculinas y ARN (Ostermeier et al., 2004). La presencia de ARN en el espermatozoide está actualmente certificada pero su significado funcional aún sigue siendo cuestión de debate. La cantidad de ARN presente en las células espermáticas maduras es muy baja en comparación con la del ovocito, que contiene grandes cantidades de ARN mensajeros (ARNm) (Stitzel et al., 2007). El bajo número de moléculas (10-20 fg) refleja la proporción significativa de ARN sintetizado antes de la detención de la transcripción en las últimas etapas terminales de la diferenciación espermática. Este ARNm es almacenado de forma estable hasta el momento de ser traducido. Por lo tanto, las moléculas de ARN que están presentes en los espermatozoides maduros, incluyendo los ARN mensajeros, se pueden considerar remanentes. Éstos se mantienen estables hasta el comienzo de la expresión del genoma embrionario (Boerke et al., 2007). Se han publicado estudios en los que se sugiere que este ARNm espermático tiene un significado fun-

cional en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Gur et al., 2006).

El papel de los ARN espermáticos ha sido ampliamente discutido durante cincuenta años y en la actualidad, la comunidad científica ha alcanzado un consenso. El debate comenzó tras la observación inicial de Abraham y Bhargava (Abraham et al 1963) en la que se comprobó que el espermatozoide podía incorporar ribonucleótidos marcados radioactivamente y posteriormente éstos eran activos. Esto fue descartado más tarde, ya que se demostró que tal apreciación era debida a la actividad ribosómica mitocondrial. Posteriormente, la ausencia de actividad transcripcional ha sido reafirmada en esta última década. Del mismo modo, la presencia de ARN ribosómico fue descrita (Betlach et al., 1973) pero nunca fue confirmada. Por el contrario, la existencia de transcritos espermáticos fue establecida por estudios independientes en los que se realizaron transcripción reversa por PCR e hibridación in situ. La veracidad de estas observaciones se demuestra por el continuo aumento del número de estudios independientes que evalúan la presencia de transcritos específicos en los espermatozoides de mamífero (De Ambrogi et al., 2007). Por otro lado, el uso de micromatrices ha incrementado la descripción de los transcritos presentes en estas células (Dadoune et al., 2005). De este modo, se han empezado a conocer qué ARNm existen en los espermatozoides. Además, se ha visto que estas células poseen ARN antisentido y microARN (Amanai et al., 2006). Es interesante destacar que en un estudio reciente se ha publicado que los transcritos que se encuentran en el espermatozoide maduro correlacionan con zonas hipometiladas del genoma y están relacionadas con genes importantes para el desarrollo, factores de transcripción y loci biosintéticos o de metabolismo (Wu et al., 2011). La demostración de Ostermeier y colaboradores (2004) en la que se confirmó la entrega del ARN espermático al ovocito en el momento de la fertilización ha sido esencial para el desarrollo de las hipótesis acerca del papel crítico de estas moléculas en el desarrollo embrionario. Los diferentes cometidos que pueden tener las diversas poblaciones de ARN espermáticos están por confirmar. Como se resume en la **Fig. 2**, se pueden suponer diferentes papeles para estos ARN: funciones estructurales, funciones empaquetadoras del genoma paterno y/o funciones esenciales para el desarrollo embrionario temprano.

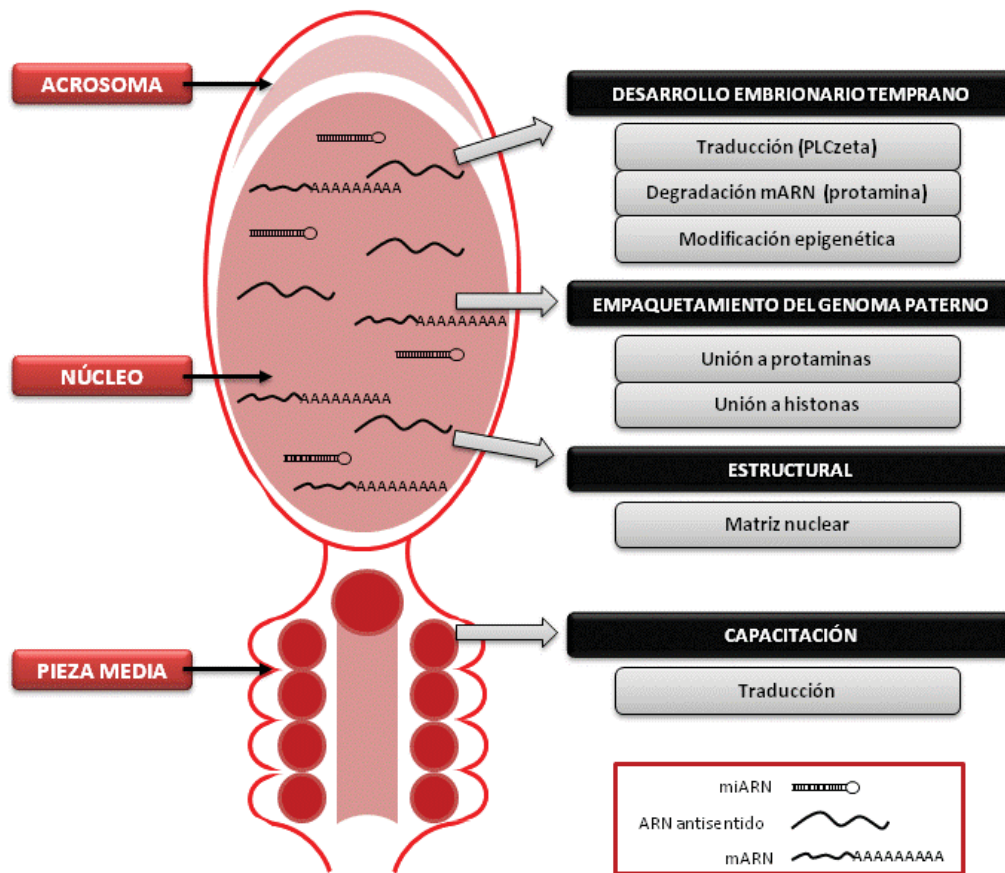


Figura 2. Funciones del ARN espermático. Diferentes propuestas funcionales para las poblaciones de ARN presentes en el espermatozoide maduro: mARN, antisentido y micro-ARN (miARN). El mARN podría ser traducido en el desarrollo embrionario temprano, por ejemplo, PLC- ζ . Algunos mRNA serían degradados, como por ejemplo las protaminas. Los ARN antisentido y los microARN estarían relacionados con modificaciones epigenéticas y modularían la expresión génica embrionaria temprana. El ARN espermático puede tener también un papel estructural formando parte de la matriz nuclear e interviniendo en la compactación cromosómica. El ARN localizado en la pieza media puede ser traducido, en los ribosomas mitocondriales, bajo determinadas condiciones, como por ejemplo, durante la capacitación. Esquema basado en una imagen de un artículo (Lalancette et al., 2008).

No obstante, no todos los ARN retenidos en el espermatozoide tienen una función que afecte a la embriogénesis y algunos serán degradados. Hayashi y colaboradores (2003) compararon el perfil de varios ARN paternos, entre ellos, las protaminas 1 y 2 en embriones de ratón derivados de inyección intracitoplasmática de espermátidas redondas (ROSI) y de ICSI observando la desaparición de los transcritos paternos durante las etapas tempranas de la embriogénesis.

Dicho grupo corroboró la ausencia de los ARN desde el estadio de 4 células, sugiriendo, por lo tanto, que algunos de los ARN entregados al ovocito murino son desechados durante las etapas iniciales del desarrollo embrionario. La destrucción de aquellas moléculas de ARN asociadas a la compactación del material genético del espermatozoide, como por ejemplo, las protaminas, es esperada y lógicamente, requerida.

Considerando la cantidad y la diversidad de transcritos que son proporcionados por parte del espermatozoide, se espera que al menos algunos de ellos sean necesarios para desempeñar alguna función biológica. Un claro ejemplo de esto es la fosfolipasa C zeta (PLC- ζ), que señala la activación del ovocito a través de una serie de oscilaciones en la concentración del catión calcio tras la fertilización (Swann et al., 2004). El transcrito de esta proteína ha sido detectado en el esperma humano (Platts et al., 2007). Quizás su traducción tras la fertilización asegura esta respuesta prolongada.

El ARN espermático también puede tener un papel como modificador epigenético en los primeros estadios embrionarios. Rassoulzadegan y colaboradores (2006) inyectaron microARN de espermatozoides en ovocitos de ratón fertilizados para ver el efecto generado. Se comprobó la aparición de un fenotipo mutante heredable por parte de la descendencia. Fue imposible corroborar tal mutación por genotipado. Estos datos apoyan de forma contundente la idea de que el ARN espermático puede actuar como modificador epigenético.

La importancia de la integridad de la matriz nuclear espermática para el éxito de la fertilización ha sido probada en ratón (Ward et al., 2000). También ha sido confirmada la conjetura formal que considera al ARN como parte de la matriz nuclear (Miller et al., 2005).

Los transcritos espermáticos como marcadores de interés clínico

La aplicación y el uso de los transcritos espermáticos como marcadores del estatus de fertilidad masculina sigue siendo un tema en constante evolución. La idea de considerar estos ARN como indicadores de calidad, parte de la hipótesis que define la espermatogénesis como un proceso preciso y orquestado que proporcionaría, de forma natural, una batería conservada de transcritos en varones sanos. Esta hipótesis sigue siendo evaluada con cada avance tecnológico. Y así ha ocurrido con el uso de las micromatrices de alta resolución, que están permitiendo a la comunidad científica comenzar a diseccionar los elementos moleculares que toman parte en la infertilidad masculina (Platts et al., 2007). Los grandes estudios de transcriptómica que se han realizado en muestras humanas

han permitido examinar el grado de covarianza entre transcritos de hombres fértiles y estériles. Estos estudios han empezado a revelar una serie de prometedores marcadores clínicos de infertilidad masculina. Es por esto que se ha sugerido realizar el análisis del perfil de ARNm presente en el espermatozoide como herramienta diagnóstica para la fertilidad masculina y como factor pronóstico del éxito de la fecundación (García-Herrero et al., 2010; García-Herrero et al., 2011).

En un interesante trabajo realizado por científicos del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) y la Universidad de Valencia (García-Herrero et al., 2010), se encontraron 741 transcritos exclusivos de muestras seminales que producían embarazo y 976 que solo estaban presentes en aquellas muestras seminales que no lo hacían. El mismo grupo de investigación, comparando el perfil del transcriptoma entre espermatozoides que logran embarazo y los que no lo hacen, vía ICSI, encontró un alto número de transcritos con expresión diferencial o incluso exclusiva en ambos grupos. Además, se realizó un estudio de rutas metabólicas y un análisis ontogénico con los datos obtenidos de las micromatrices, lo que les permitió conseguir una mejor interpretación de los datos. Este estudio propone un grupo de genes como marcadores potenciales del éxito del embarazo y otro grupo considerado como marcador potencial de fertilidad. Pero además, estos ARNm del espermatozoide también parecen jugar un papel importante en el desarrollo embrionario temprano. Se ha comprobado, por ejemplo, que hay una relación entre los niveles de ARNm de las protaminas PRM1 y PRM2 en el espermatozoide y la calidad de los embriones (Depa-Martynow et al., 2007) y se ha contemplado la posibilidad de que la ausencia de algunos de estos ARN presentes en el espermatozoide pudieran contribuir a una muerte embrionaria temprana (Gil Villa et al., 2007).

Transcritos espermáticos e infertilidad masculina

En la actualidad, uno de los proyectos llevados a cabo dentro de nuestro grupo de investigación tiene como objetivo valorar el impacto a nivel molecular de algunas de las técnicas empleadas en ARTs y desarrollar métodos diagnósticos que garanticen la total seguridad de las mismas. Además, nos interesa ahondar en el papel concreto que pueden jugar estos transcritos en las primeras etapas del desarrollo embrionario.

Dentro del marco de este proyecto, y en colaboración con el Centro Ginecológico de León, realizamos un estudio diferencial de las poblaciones de transcritos presentes en muestras seminales de hombres sanos y hombres con patolo-

gías seminales diagnosticadas. En reproducción, se utilizan distintos términos para hacer referencia a la calidad seminal: normozoospermia (semen normal), oligozoospermia (muestras con concentraciones espermáticas por debajo de los valores establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS)), astenozoospermia (movilidad por debajo de los valores establecidos por la OMS), terazoospermia (cantidad de células morfológicamente anormales superior a los límites de la OMS) y oligoastenoteratozoospermia (perturbaciones de más de dos de los tres factores en un mismo caso).

En el estudio que resumimos a continuación, nos centramos en pacientes con astenozoospermia diagnosticada. La astenozoospermia es una alteración del semen del hombre que se caracteriza por la baja movilidad de los espermatozoides. Se considera astenozoospermia cuando el número de espermatozoides que se desplazan en el eyaculado es menos de la mitad (50%) o bien cuando los que se desplazan con trayectoria rectilínea y velocidad de $25 \mu\text{m/s}$ es inferior al 25%. Esto puede provocar un problema de infertilidad. Los valores que se consideran normales en cuanto a movilidad son 50% o más de espermatozoides móviles con desplazamiento, o bien valores iguales o superiores al 25% de espermatozoides móviles con trayectoria rectilínea y velocidad de $25 \mu\text{m/s}$. Las alteraciones de la movilidad y la forma de los espermatozoides generalmente son de origen desconocido y no tienen tratamiento específico, a pesar de que en ocasiones pueden ensayarse tratamientos antioxidantes como la vitaminas C y E.

En nuestro estudio, partimos de muestras donadas, bajo consentimiento informado, de varones jóvenes y normozoospermicos, y por otro lado, de eyaculados donados por pacientes diagnosticados como astenozoospermicos llegados desde el Centro Ginecológico de León. Tras realizar la extracción de ARN de las muestras se sintetiza el ADN complementario utilizando un kit comercial. Los oligonucleótidos diseñados para realizar PCR cuantitativa (qPCR) de los transcritos de estudio son analizados por PCR convencional en gradiente de temperatura y electroforesis para optimizar las temperaturas de anillamiento en cada transcrito. Además se realizan las curvas de eficiencia antes de desarrollar el ensayo final. Tras la qPCR, obtenemos los valores Ct (threshold cycle) que es un parámetro que podemos correlacionar de forma directa con la cantidad de transcritos presentes en los espermatozoides. Puesto que la cantidad de transcritos en los espermatozoides es baja (comparándolo con células transcripcionalmente activas), se puede apreciar que los valores de Ct aparecen en ciclos tardíos en el programa de amplificación. Esto es debido a que en los espermatozoides solo tenemos transcritos remanentes del proceso de espermatogénesis.

Como ejemplo de las diferencias que hemos encontrado en la cantidad de transcritos espermáticos entre individuos normo y astenozoospermicos, hemos representado los resultados de dos transcritos que podrían ser marcadores potenciales de calidad seminal y éxito de embarazo: BCL2-interacting killer (*bik*); NM_001197.4, y adducin 1 alpha (*add1*); NM_001119.4. Tal como se observa en la **Fig. 3** existe un retraso estadísticamente significativo en el Ct de la muestra de individuos astenozoospermicos: para *bik* alrededor de 29,75 en normozoospermicos frente a 32,94 en los donantes astenozoospermicos y en el caso de *add1* en torno a 26,68 frente a 31,23, respectivamente.

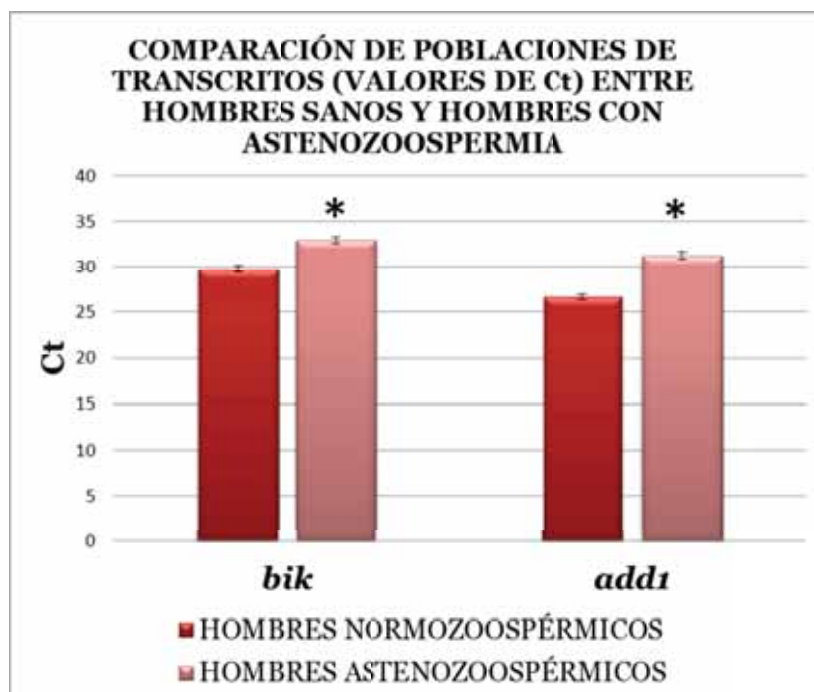


Figura 3. Comparación de las poblaciones de transcritos (Ct) entre hombres normozoospermicos y hombres astenozoospermicos. *bik*: BCL2-interacting killer (ejemplo de transcrito identificado como potencial marcador de calidad espermática); *add1*: adducin 1 alpha (ejemplo de transcrito identificado como potencial marcador de éxito de embarazo). Población n=3. Las barras de error se corresponden con error típico.

Podemos concluir, por tanto, que conocer el impacto a nivel molecular de las ARTs sobre el espermatozoide (concretamente las modificaciones en la presencia de determinados transcritos relevantes) redundará sin duda en mejorar la eficiencia y la seguridad de las técnicas de reproducción asistida.

Bibliografía

- Abraham, K.A. y Bhargava P.M. 1963. The uptake of radioactive amino acids by spermatozoa. The intracellular site of incorporation into proteins. *Biochemical Journal*. 86: 308-313
- Amanai, M., Brahmajosyula M. y Perry A.C. 2006. A restricted role for sperm-borne microRNAs in mammalian fertilization. *Biology of Reproduction*. 75: 877-884.
- Betlach, C.J. y Erickson R.P. 1973. A unique RNA species from maturing mouse spermatozoa. *Nature*. 242: 114-115.
- Boerke, A., Dieleman S.J. y Gadella, B.M. 2007. A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology*. 68 Suppl 1: S147-55.
- Carrell, D.T. y Hammoud, S.S. 2010. The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. *Molecular Human Reproduction*. 16: 37-47.
- Dadoune, J.P., Pawlak A., Alfonsi M.F. y Siffroi J.P. 2005. Identification of transcripts by macroarrays, RT-PCR and in situ hybridization in human ejaculate spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*. 11: 133-140.
- De Ambrogi, M., Spinaci M., Galeati G. y Tamanini C. 2007. Leptin receptor in boar spermatozoa. *International Journal of Andrology*. 30: 458-461.
- Depa-Martynow M., Kempisty B., Lianeri M., Jagodzinski P.P. y Jedrzejczak P. 2007. Association between fertilin beta, protamines 1 and 2 and spermatid-specific linker histone H1-like protein mRNA levels, fertilization ability of human spermatozoa, and quality of preimplantation embryos. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 45 Suppl 1: S79-85.
- García-Herrero S., Garrido N., Martínez-Conejero J.A., Remohi J., Pellicer A. y Meseguer M. 2011. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reproductive Biomedicine Online*. 22: 25-36.
- García-Herrero S., Meseguer M., Martínez-Conejero J.A., Remohi J., Pellicer A. y Garrido N. 2010. The transcriptome of spermatozoa used in homologous intrauterine insemination varies considerably between samples that achieve pregnancy and those that do not. *Fertility and Sterility*. 94: 1360-1373.
- Gil Villa, A.M., Cardona-Maya W.D. y Cadavid Jaramillo A.P. 2007. Early embryo death: Does the male factor play a role? *Archivos Españoles de Urología*. 60: 1.057-68.
- Gilbert, I., Bissonnette N., Boissonneault G., Vallee M. y Robert C. 2007. A

- molecular analysis of the population of mRNA in bovine spermatozoa. *Reproduction*. 133:1073-1086.
- Gur, Y. y Breitbart H. 2006. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes & Development*. 20:411-416.
- Hayashi, S., Yang J., Christenson L., Yanagimachi R. y Hecht N.B. 2003. Mouse preimplantation embryos developed from oocytes injected with round spermatids or spermatozoa have similar but distinct patterns of early messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*. 69:1170-1176.
- Lalancette, C., Miller D., Li Y. y Krawetz S.A. 2008. Paternal contributions: New functional insights for spermatozoal RNA. *Journal of Cellular Biochemistry*. 104:1570-1579
- .Maher, E.R., Afnan M. y Barratt C.L. 2003a. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: Epigenetics, imprinting, ART and icebergs? *Human Reproduction*. 18: 2508-2511.
- Maher, E.R., Brueton L.A., Bowdin S.C., Luharia A., Cooper W., Cole T.R., et al. 2003b. Beckwith-wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *Journal of Medical Genetics*. 40: 62-64.
- Miller, D., Ostermeier G.C. y Krawetz S.A. 2005. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends in Molecular Medicine*. 11:156-163.
- Ostermeier, G.C., Miller, D., Huntriss, J.D., Diamond, M.P. y Krawetz, S.A. 2004. Reproductive biology: Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*. 429:154.
- Platts, A.E., Dix, D.J., Chemes, H.E., Thompson, K.E., Goodrich, R., Rockett, J.C., et al. 2007. Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Human Molecular Genetics*. 16:763-773.
- Rassoulzadegan, M., Grandjean, V., Gounon, P., Vincent, S., Gillot, I. y Cuzin, F. 2006. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature*. 441 469-474.
- Stitzel, M.L. y Seydoux, G. 2007. Regulation of the oocyte-to-zygote transition. *Science*. 316:407-408.
- Swann, K., Larman, M.G., Saunders, C.M. y Lai, F.A. 2004. The cytosolic sperm factor that triggers Ca^{2+} oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLCzeta. *Reproduction*. 127:431-439.
- Ward, W.S., Kishikawa, H., Akutsu, H., Yanagimachi, H. y Yanagimachi, R. 2000. Further evidence that sperm nuclear proteins are necessary for embryogenesis. *Zygote*. 8:51-56.

Wu, S.F., Zhang, H. y Cairns B.R. 2011. Genes for embryo development are packaged in blocks of multivalent chromatin in zebrafish sperm. *Genome Research*. 21: 578-589.

Zini, A., Boman, J.M., Belzile, E. y Ciampi, A. 2008. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: Systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*. 23:2663-2668.



David García Valcarce se licenció en Biotecnología en la Universidad de León (2011) y realizó el Máster en Metodología de Investigación en Biología Fundamental y Biomedicina (2012). Este trabajo forma parte de su tesis de máster, dirigida por la Dra. **Vanesa Robles Rodríguez**, investigadora Ramón y Cajal de la ULE. Vanesa Robles se doctoró en la Universidad de León (2004) y realizó dos estancias postdoctorales en la Universidad de Algarve (Portugal) y en el Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona CMR(B). Durante el periodo pre y postdoctoral, ha realizado varias estancias en centros de investigación y universidades extranjeras (MBL, Woods Hole, MS, USA;

University of Alberta, Canada, University of Newfoundland, Canada; University of Bedfordshire Luton, UK; University of Salento, Italia) y ha participado en más de 10 proyectos de investigación siendo investigadora principal de 2 de ellos. Fruto de su labor investigadora, posee 47 publicaciones científicas (artículos en revistas SCI, libros y capítulos de libro), 42 comunicaciones a congresos, en su mayor parte internacionales y es revisora habitual de 12 revistas científicas. En la actualidad realiza su actividad investigadora en el Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL) y está adscrita al área de Biología Celular del Departamento de Biología Molecular, donde imparte docencia.

El Dr. **Florentino Garrido González** (ginecólogo) y los biólogos **Elsi Suárez Álvarez** y **Ángel José Luengos Martínez**, forman parte del Equipo Médico del Centro Ginecológico de León (Clínica San Francisco). La unidad de Reproducción asistida de dicho centro nace en el año 1997 y en la actualidad ofrece numerosos servicios entre los que se encuentran: inseminación artificial, fecundación in vitro, microinyección espermática y diagnóstico genético preimplantacional, entre otros.

