

Tesis Doctoral

El Heparán Sulfato y la descondensación del núcleo espermático humano: estudio de su rol específico en dicho proceso y caracterización molecular de la interacción Heparán Sulfato-ADN-Protaminas

Julianelli, Vanina Laura

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Julianelli, Vanina Laura. (2012). El Heparán Sulfato y la descondensación del núcleo espermático humano: estudio de su rol específico en dicho proceso y caracterización molecular de la interacción Heparán Sulfato-ADN-Protaminas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Julianelli, Vanina Laura. "El Heparán Sulfato y la descondensación del núcleo espermático humano: estudio de su rol específico en dicho proceso y caracterización molecular de la interacción Heparán Sulfato-ADN-Protaminas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**El Heparán Sulfato y la descondensación del núcleo espermático humano:
estudio de su rol específico en dicho proceso y caracterización molecular de la
interacción Heparán Sulfato-ADN-Protaminas.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Química Biológica

Vanina Laura Julianelli

Director de Tesis: Dr. Juan Carlos Calvo

Director Asistente: Dra. Lucrecia Piñeiro de Calvo

Consejero de Estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo: Laboratorio de Química de Proteoglicanos y Matriz Extracelular, Instituto
de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

Buenos Aires, Marzo 2012

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Lucrecia y Juan Carlos Calvo (**Lucre y JC**). Con ustedes aprendí y sigo aprendiendo día a día, no solo los secretos del espermatozoide y cuestiones científicas. Me escuchan, aconsejan, guían, aceptan y valoran mi opinión. No son solamente mis jefes, son mis segundos padres. Esta es una buena oportunidad para agradecerles todo lo que han hecho por mí, desde consolarme hasta invitarme en las vacaciones. Gracias por darme la oportunidad de compartir todos estos años con ustedes, ¡los quiero mucho!

A mi familia, por apoyarme incondicionalmente sin entender exactamente qué hago y qué me motiva. A mi **mamá** por creer que todo lo puedo. A **Javi** y **Lupi** por su fe en mi y su apoyo. A **Leo**, porque junto con Lu, me permitieron ser tía de **Bruno** y experimentar el amor más puro que se pueda tener.

A mis hermanas del corazón **Guada** y **Romi**, con quienes comparto la vida desde hace 30 años, con todo lo que eso implica. Si detallo cosas que pasamos juntas, estos agradecimientos serían más largos que la tesis en sí. Romi, agradezco tu inocente certeza de que voy a recibir el Nobel algún día (eso es tener fe ciega en una amiga). Guada, gracias por haber estado siempre ahí, al pie del cañón (y por hacerme tía de Flor).

A **Gabi** y **Barbi** por haber compartido tantas horas de estudio y tantas otras cosas. Gabi, más allá del pasado, tu compañía incondicional hoy es invaluable.

A **Vicky**, mi otra amiga de la facultad, con quien compartí fines de semana de estudio, paseos domingueros y noches de juegos de mesa con amigos. Estuviste siempre, sos una amiga de fierro, gracias por ayudarme para que la tesis quede más linda. A **Pablo**, porque también sos de fierro y me enriquezco con nuestras diferencias.

A **Martín**, por acompañarme, aconsejarme, escucharme y hacer que las horas (los años) que compartimos en la biblioteca no pesen y se transformen a veces en sesiones de terapia, otras en charla-debate y otras en sesiones de stand-up. ¿Sabes cuánto te quiero?

A **Moni**, porque a pesar de no vernos seguido, confiamos en que la otra está en los momentos clave. A **Clari** y **Marcia** por ser mis amigas de tanto tiempo.

A **Pao**, si bien no hace mucho tiempo que nos conocemos, rápidamente descubrí en vos a una amiga. . A **Nat** y **Emi**, por hacer que las meriendas sean más que eso y por el apoyo durante la escritura de la tesis.

A **Gabriel**, por su cariño a distancia.

A Anahí (**Ani**), por ser mi compañera de salidas, de viajes y sobre todo por ser mi amiga.

A **Mónica Cameo**, por darme la primera oportunidad en su laboratorio.

A **Liliana**, por ayudarme en los primeros pasos del doctorado.

A las chicas del laboratorio de la facu: **Ceci, Vani y Juli**, gracias por las horas compartidas en la época que trabajaba allá y por hacer que en cada encuentro hoy sienta que las veo a diario. Vani, fuiste la primera que me enseñó en un laboratorio, y el tiempo hizo que seamos amigas.

A las chicas del labo: **Virginia y Paula** por darme una mano siempre que lo necesité; **Sabri y Flor**, por compartir el día a día y bancarme los momentos de mal humor. A todas, gracias por hacer fácil la convivencia.

A **Barbi**, con tu dulzura me apoyaste siempre y me demostraste tu cariño. ¡También te adoro!

A **Meli**, con quien compartimos material, el microscopio durante horas contando espermatozoides y lluvias interminables en una choza del Caribe, todo con risas, que no es poco.

A **Marina**, sos la mejor compañera que se pueda desear. El tema de trabajo nos obligó a trabajar codo a codo, pero de ahí en más, el resto de las cosas vinieron sin obligación. Gracias por enseñarme y ayudarme con los experimentos, con las figuras de la tesis, por confiar en mí, apoyarte y apoyarme. ¡Que equipo, el de reproducción de los Calvo!

A **Vale, Carli y Ani**, por hacer de la escritura de la tesis algo llevadero y hasta placentero, por las horas de terapia y el estrés compartido. Vale, siempre poniéndole onda, y analizando las cosas desde un lado más sencillo, ¡qué bueno fue escucharte en momentos de crisis! Ani, siempre aprendo algo de vos, porque no tenés problema en decirme mis defectos, pero también me demostrar tu cariño (cosa que hacen los amigos). Carli, gracias por enseñarme a usar el PhotoShop y quedarte horas ayudándome a instalar un programa rebelde, resignando tiempo de tu tesis para que yo avance con la mía, solo un ejemplo de cómo sos.

Mariel, porque aprendí a quererte después de compartir las vacaciones en Brasil, agradezco como transmitís tus conocimientos y como compartís todos los detalles de una técnica haciendo que parezca fácil, muestra de tu ausencia de egoísmo.

Ari, ¡sos tan dulce, y siempre dispuesta a ayudar!, te quiero.

A todos los del pasillo: **Inés, Juani, Gabi, Ceci, Isa, Aleja, Leo y Lara**. Gracias por compartir los almuerzos, alegrarse por las becas, acompañar en los momentos difíciles, compartir un mate o dar un abrazo en el momento justo. Cada uno de ustedes hace que ir a trabajar todos los días, no sea un trabajo.

A **Susana y Ana**, de la biblioteca de la FCEyN, por entender que el doctorado era mi prioridad, sin que vaya en desmedro de mi trabajo allí.

A **Cristian Alvarez Sedó** del CEGYR, por mostrarse interesado en colaborar con nosotros, proveernos muestras y por hacer la microscopia electrónica de esta tesis.

A los donantes de muestra que me permitieron realizar esta tesis.

A la Universidad de Buenos Aires, por formarme gratuitamente.

Al IBYME, por permitirme realizar mi doctorado en un placentero lugar de trabajo.

A la Fundación Ciencias Exactas y Naturales por darme la oportunidad inicial para dedicarme a esto. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al CONICET, por las becas otorgadas.

Y más que un agradecimiento, una dedicatoria especial al que me enseñó a no bajar los brazos y me alentó a dedicarme a lo que me gusta. El que no está físicamente pero está presente en mis pensamientos y va a estar siempre en mi corazón. A quien admiré, respeté y quise. Con tristeza de que hoy no pueda ver mis logros, **¡a mi PAPA!**

Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP/AMP	adenosin di fosfato/monofosfato
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosin trifosfato
CS	condroitín sulfato
DS	dermatán sulfato
DTT	1,4-ditiotreitol
EDTA	etilén-diamina-tetra-acético
EP	espacio perivitelino
FAD/FADH ₂	Flavin adenina dinucleotido
GHX	glutación peroxidasa
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
HA	ácido hialurónico
Hep	heparina
HS	heparán sulfato
HTF	fluido tubario humano
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoide
mBBr	monobromobimane
MII	metafase II
MM	materiales y métodos
NA	naranja de acridina
NADP	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

P1	protamina 1
P2	protamina 2
PBS	buffer fosfato salino
PL	protamine-like
RL	radicales libres
ROS	especies reactivas de oxígeno
SDS	dodecil sulfato de sodio
SOD	superóxido dismutasa
SS	puentes disulfuro
Trx	tiorredoxinas
UA	unidades arbitrarias
VG	vesícula germinal
WHO	Organización Mundial de la Salud
y col.	y colaboradores

Resumen

EL HEPARÁN SULFATO Y LA DESCONDENSACIÓN DEL NÚCLEO ESPERMÁTICO HUMANO: ESTUDIO DE SU ROL ESPECÍFICO EN DICHO PROCESO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN HEPARÁN SULFATO-ADN-PROTAMINAS

A diferencia de las células somáticas, el espermatozoide posee su cromatina empaquetada principalmente por protaminas en lugar de histonas. Las protaminas son proteínas pequeñas y básicas, debido a su alto contenido de residuos lisina, arginina y cisteína. Las cisteínas forman puentes disulfuro intra e intercatenarios, lo que le proporciona al núcleo espermático gran estabilidad y resistencia para poder atravesar el tracto masculino, el femenino y llegar con su ADN intacto hasta el sitio de fecundación. Una vez que el espermatozoide penetra en el ovocito, es imprescindible que se produzca la descondensación de su cromatina, es decir el desempaquetamiento del ADN para poder reemplazar las protaminas por histonas ovocitarias. La descondensación de la cromatina consiste en dos eventos, deben reducirse los puentes disulfuro (tiorreducción) y removerse las protaminas. Las moléculas involucradas en estos procesos son el glutatión reducido (GSH) y el heparán sulfato (HS) ovocitarios. Hasta el momento se consideraban eventos independientes y sucesivos: primero el GSH tiorreduce las protaminas, y luego el HS las remueve. Sin embargo, nuestros resultados indican que estos procesos podrían ser simultáneos y cooperativos.

El objetivo de esta tesis fue avanzar en el estudio del mecanismo de la descondensación de la cromatina del espermatozoide humano in vitro en presencia de heparina (análogo estructural del HS) y GSH y su extrapolación al mecanismo in vivo durante la fertilización. Al coincubar espermatozoides humanos o núcleos espermáticos aislados con heparina y GSH, se produce un mayor porcentaje de descondensación de la cromatina, con respecto a la incubación en forma secuencial con los mismos agentes, independientemente del orden de los mismos. Utilizando naranja de acridina como técnica para evaluar en forma indirecta el estado de tiorreducción de los núcleos espermáticos, se observa que la heparina colabora con el GSH en la tiorreducción, durante la descondensación. Estos resultados fueron confirmados utilizando monobromobimane como método directo para evaluar tiorreducción.

Los resultados aportados por esta tesis indican que la tiorreducción producida por el GSH, y la remoción de las protaminas producida por la heparina, durante la descondensación de la cromatina de espermatozoides humanos in vitro, ocurriría en forma simultánea, y no secuencial, ya que ambos factores cooperarían entre sí.

**HEPARAN SULFATE AND NUCLEAR SPERM DECONDENSATION IN HUMANS:
STUDY OF ITS SPECIFIC ROLE IN THIS PROCESS AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF HEPARAN SULFATE-DNA-PROTAMINES INTERACTION.**

Unlike somatic cells, sperm have a highly packed chromatin due to the presence of protamines instead of histones. Protamines are small basic proteins, very rich in cysteine, lysine and arginine. Cysteine residues form disulfide bonds, both intra and interchain, rendering the sperm nucleus high stability and resistance during transit along the male and female reproductive tracts, thus enabling the spermatozoon to arrive at the fertilization site intact. Once the sperm penetrates the oocyte, chromatin decondensation must occur, implying the unpacking of DNA through the replacement of protamines by oocyte histones. Decondensation comprises two steps: disulfide bonds must be reduced (thioreduction) and protamines must be removed. The molecules involved in these steps are reduced glutathione (GSH) and heparan sulfate (HS) from the oocyte. Until now, these events were considered independent and consecutive: first GSH thioreduced protamines and, then HS removed them. Our results indicate otherwise, suggesting that both processes could be simultaneous and cooperative.

The aim of this thesis was to advance in the study of the mechanism of nuclear decondensation of human sperm *in vitro*, using heparin (HS structural analog) and GSH and the extrapolation to the *in vivo* mechanism during fertilization.

A higher degree of decondensation was observed upon coincubating of human sperm or isolated nuclei with heparin and GSH, compared to sequential incubation with the same agents, regardless of the order in which they were added. Use of an acridine orange staining technique as a means to indirectly evaluate the thioreduced status of sperm chromatin, revealed that heparin enhanced GSH thiol reducing activity, suggesting the existence of a cooperative effect between both reagents during decondensation. These results were confirmed by direct thiol reduced status evaluation through labeling of free thiols in sperm chromatin with monobromobimane.

The results presented herein indicate that protamine thiol reduction by GSH and removal of protamines by heparin during chromatin decondensation of human sperm *in vitro*, occur simultaneously rather than sequentially, since a cooperative effect could be observed between both decondensing agents.

Indice

<i>Agradecimientos</i>	2
<i>Abreviaturas</i>	6
<i>Resumen</i>	9
<i>Indice</i>	12
<i>Introducción</i>	16
Protagonista principal: El espermatozoide	19
Flagelo del espermatozoide	21
Cabeza del espermatozoide.....	24
Espermatogénesis	27
Protagonistas secundarias: Las Protaminas	30
Fecundación	35
Descondensación del núcleo espermático	37
Evidencias “in vitro”	41
¿Qué pasa “in vivo”?	43
Importancia clínica del estudio de la descondensación de cromatina espermática	49
<i>Hipótesis</i>	51
<i>Objetivos</i>	51
Objetivo principal	51
Objetivos específicos	51
<i>Materiales y Métodos</i>	52
1. Obtención de muestras de espermatozoides humanos	53
2. Procesamiento de las muestras de semen	54
3. Obtención de fracción altamente mótil y capacitación espermática	55
4. Obtención de núcleos aislados de espermatozoides	55
5. Ensayo de descondensación estándar	56
6. Comparación del efecto en la descondensación de espermatozoides lavados y núcleos espermáticos aislados de dos agentes reductores de los puentes disulfuro: GSH y DTT	57
7. Efecto del uso secuencial de agente reductor de puentes disulfuro y aceptor de protaminas en la descondensación de espermatozoides lavados y núcleos espermáticos aislados	58
8. Efecto del tiempo de exposición al tiorreductor	59

9. Determinación del estado de tiorreducción de las protaminas espermáticas.	59
i) Método indirecto: Tinción con Naranja de Acridina (NA)	59
ii) Marcación directa de los grupos tiol con monobromobimane.	61
10. Detección de la presencia de protaminas en los sobrenadantes de descondensación	63
11. Microscopía electrónica	65
12. Análisis estadístico.....	66
<i>Resultados</i>	69
Capítulo 1: Ensayo de descondensación de espermatozoides “in vitro”	69
Concentración de heparina.....	69
Concentración de DTT	70
Capítulo 2: Efecto del uso secuencial de tiorreductor y aceptor de protaminas en la descondensación de espermatozoides lavados y núcleos espermáticos aislados	73
GSH como tiorreductor.....	73
En espermatozoides lavados	73
En núcleos espermáticos aislados	74
DTT como tiorreductor	75
En espermatozoides enteros.....	75
En núcleos espermáticos aislados	75
¿Existe un efecto diferencial del tiempo de exposición al tiorreductor sobre la descondensación de espermatozoides in vitro de acuerdo con la naturaleza del tiorreductor?.....	76
GSH como tiorreductor.....	77
DTT como tiorreductor.....	78
Capítulo 3: Evaluación del estado de tiorreducción de la cromatina espermática	80
Método indirecto: tinción con Naranja de Acridina.....	80
Método directo: tinción con monobromobimane.....	85
Capítulo 4 Detección de la presencia de protaminas en los sobrenadantes de descondensación	89
Capítulo 5: Microscopía electrónica	92
<i>Discusión</i>.....	98
<i>Bibliografía</i>	113

Introducción

La condensación del ADN en la cromatina de células eucarióticas cumple distintas funciones dependiendo del tipo celular considerado o del estado metabólicamente activo de la célula en cuestión. Por ejemplo, en las células somáticas, la condensación sirve para permitir el empaquetamiento de los diversos números de cromosomas en la entidad nuclear en un volumen muy inferior al requerido, ya que la longitud de los cromosomas, sumada, puede superar en millones de veces el diámetro de la organela. También en el caso de las células somáticas, el estado condensado de la cromatina permite funciones regulatorias en cuanto a su funcionalidad, facilitando o dificultando tanto la duplicación de la molécula de ADN como su transcripción. En estas células, la condensación de la cromatina se consigue con el enrollamiento del material nucleico alrededor de moléculas básicas, las proteínas histonas que, con su alta carga positiva permiten un correcto empaquetamiento del ADN por complementariedad con la alta carga negativa de esta molécula. Los complejos supramoleculares resultantes, conocidos como nucleosomas, interaccionan entre sí a través de las colas de las histonas para dar lugar a estructuras más superenrolladas que llevan a la estructura clásica de los cromosomas. Lejos de ser un ordenamiento estático, este posee alta movilidad debido a la interacción con diversas proteínas que lo modifican, dejando disponibles distintas porciones del material genético para su transcripción. Esta versatilidad estérica se ve acompañada por modificaciones en las histonas que incluyen acetilación, metilación, fosforilación o combinación de ellas, que preparan al material genético para su utilización.

Algo bastante diferente ocurre en la gameta masculina, el espermatozoide, donde la condensación cromatínica presenta características muy diferentes a las mencionadas en el párrafo anterior. El intercambio de las histonas por otras proteínas más básicas en relación carga:masa, las protaminas, durante el proceso de espermatogénesis, lleva a un tipo de condensación mucho más denso que cumple un objetivo protector, a la vez que deja a este material genético prácticamente impenetrable para los procesos de transcripción y duplicación. Esta cromatina, así inerte, posee una resistencia única y fundamental frente a las especies reactivas de oxígeno que pudiesen estar presentes durante su viaje por el tracto genital masculino y, luego femenino, hasta el sitio de

fecundación en la Trompa de Falopio, como también protege de posibles daños físicos al ADN espermático.

A diferencia de la manera en que interacciona el ADN con las histonas en una célula somática, en el caso de la cromatina espermática este ADN es empaquetado en estructuras que dependen no solamente de la interacción entre cargas opuestas, sino de la formación de puentes disulfuro intracatenarios e intercatenarios entre las protaminas presentes. Estas proteínas poseen un alto contenido de residuos cisteína que pueden formar un elevado número de puentes disulfuro, otorgando una mayor estabilidad a la estructura condensada y, a la vez, estableciendo requerimientos muy específicos para su descondensación dentro del ovocito, una vez ocurrida la fecundación.

Una vez que el espermatozoide ha penetrado la membrana plasmática del ovocito, debe ocurrir la descondensación del material genético para permitir la interacción con el complementario femenino en el proceso conocido como singamia. Debido a la naturaleza única de la condensación de la cromatina en el espermatozoide, para que la misma pueda descondensarse y convertirse en la estructura relativamente laxa que permitirá su funcionalidad completa, como pronúcleo masculino, deberán ocurrir dos procesos complementarios pero bien diferentes en cuanto a la química involucrada.

Por un lado, los puentes disulfuro de las protaminas deberán romperse para liberar la estructura tensionada y por otro, deberán intercambiarse las protaminas más libres con las histonas ovocitarias hasta que la mayoría haya sido reemplazada y, finalmente, se constituya la cromatina estructuralmente típica de las células somáticas, con nucleosomas en complejos de ADN e histonas.

Desde un punto de vista redox, para que exista ese proceso de ruptura de los puentes disulfuro se debe establecer una dupla reductor:oxidante que permita la generación de los grupos sulfhidrilo libres de las cisteínas en las protaminas. El antioxidante natural presente en las células es el glutatión (GSH) que, puesto en presencia de los puentes disulfuro de las protaminas es capaz de reducirlos. Sin embargo este proceso no parece ser tan simple debido a la evidencia que indica que, en ausencia de GSH, los propios grupos sulfhidrilo libres de cisteínas vecinas y no involucradas en puentes disulfuro, también podrían desencadenar esa reacción redox. El organismo evitaría esta pérdida de estabilidad prematura a través de la participación de iones Zn^{2+} , presentes en las

secreciones de los conductos excurrentes, que forman complejos con los sulfhidrilos libres en las protaminas. Tan es así que la utilización de agentes quelantes como el EDTA puede llevar adelante la descondensación de la cromatina *in vitro*, en ausencia de agentes tiorreductores, aunque de una manera menos eficiente.

De acuerdo a lo establecido en la literatura científica hasta el momento de escritura de este trabajo de tesis doctoral, a la reducción de los puentes disulfuro le seguiría la interacción de las protaminas con alguna molécula “aceptora” que facilitara la remoción de las mismas con el correspondiente intercambio por las histonas ovocitarias. Esta molécula aceptora tendría, eventualmente, la particularidad de poseer alta carga negativa y por lo tanto podría competir con el ADN por la interacción con las protaminas. Tal vez también colaboraría con el reemplazo por histonas, poseyendo otro sitio de interacción para estas proteínas.

Sin embargo se debe tener en cuenta que, un proceso tan lineal como el descrito precedentemente, en el que a la reducción de puentes disulfuro de las protaminas siga un intercambio por las histonas ovocitarias con la colaboración de una molécula aceptora podría verse alterado, en función de una mayor eficacia, por el entorno presente en el sitio donde ocurre la descondensación de la cromatina.

Al hablar de reacciones de óxido-reducción es común recurrir a las tablas de potenciales de reducción y observar si la dupla buscada cumple con los requerimientos energéticos como para que se realice el intercambio electrónico y, muchas veces, el resultado indica la imposibilidad de la misma o sugiere que la eficiencia con que la misma podría ocurrir sería muy baja y, tal vez, incompatible con la fisiología del sistema. Al hacer esto, generalmente se olvida el entorno y cómo el mismo es capaz de modificar esos valores tabulados. Los casos clásicos pueden encontrarse en las reacciones que involucran al FAD/FADH₂ y cómo el ambiente proteico en que se encuentra como grupo prostético modifica el valor de su potencial de reducción de manera muy notable. Una vez más, la célula nos recuerda la célebre frase del filósofo español José Ortega y Gasset: “yo soy yo y mis circunstancias”

Surge, por lo tanto, la posibilidad que la presencia de esta molécula “aceptora” e “intercambiadora” de protaminas por histonas cumpla un papel mucho más importante y fundamental que ser simplemente el paso siguiente a la reacción de reducción generada

por la dupla GSH:puentes disulfuro de las protaminas, en una manera totalmente disociada del paso previo.

La presencia de reacciones cooperativas entre moléculas parece condecir más con la realidad del complejo entramado de caminos metabólicos que encontramos en toda célula, que una simple sucesión de etapas no relacionadas más que por la continuidad espacial y, por lo tanto, constituye el fundamento de este trabajo de Tesis Doctoral.

Protagonista principal: El espermatozoide

Espermatozoide: (Del gr., semilla, -zoo animal). Gameto masculino, destinado a la fecundación del óvulo (Diccionario de la Real Academia Española, RAE).

La función primaria del espermatozoide es proveer el pronúcleo masculino haploide al ovocito fecundado, con el fin de crear un individuo diploide. El éxito de esta función primordial depende de una serie de procesos secundarios: el espermatozoide debe conservar su ADN, trasladarse hacia el sitio de fecundación y ser capaz de reconocer y fusionarse al ovocito receptivo. En los vertebrados superiores, la complejidad de este hecho se ha incrementado debido a la fecundación interna y a las adaptaciones funcionales y estructurales de las envolturas del ovocito. En los humanos, debe comenzar su camino desde la vagina, hacia la ampolla de la trompa de Falopio donde tiene lugar la fertilización, un complejo camino a través de un medio extraño y potencialmente hostil. Además durante el curso de este pasaje el espermatozoide debe completar un proceso de maduración funcional llamado capacitación (Curry y Watson, 1995).

La capacitación consiste en una serie de eventos que involucran la reorganización de componentes de la superficie celular y cambios en el metabolismo celular y patrones de motilidad. Es un prerequisite para poder penetrar las envolturas del huevo y fusionarse con el ovocito. Es decir que para que ocurra la fertilización, deben ocurrir en forma coordinada el pasaje del espermatozoide a través del tracto reproductivo femenino, la capacitación y la ovulación de tal forma que el espermatozoide y el ovocito se encuentren juntos en condiciones receptivas en la ampolla de la trompa de Falopio (Bedford, 1983;

Rodriguez-Martinez y *col.*, 2001; Tienthai y *col.*, 2004; Hunter 2008; Patrat y Serres, 2009).

Para llevar adelante estas diversas funciones, el espermatozoide ha desarrollado una morfología altamente especializada con variados componentes estructurales a la medida de aspectos específicos de su función.

El espermatozoide está formado por una **cabeza** que contiene el ADN y las estructuras para el reconocimiento de la zona pelúcida y la fusión al ovocito, y el **flagelo** donde se produce la energía para iniciar y mantener la motilidad. A su vez estas partes pueden ser divididas en compartimientos celulares, cada uno con su función (Curry y Watson, 1995) (Figura 1).

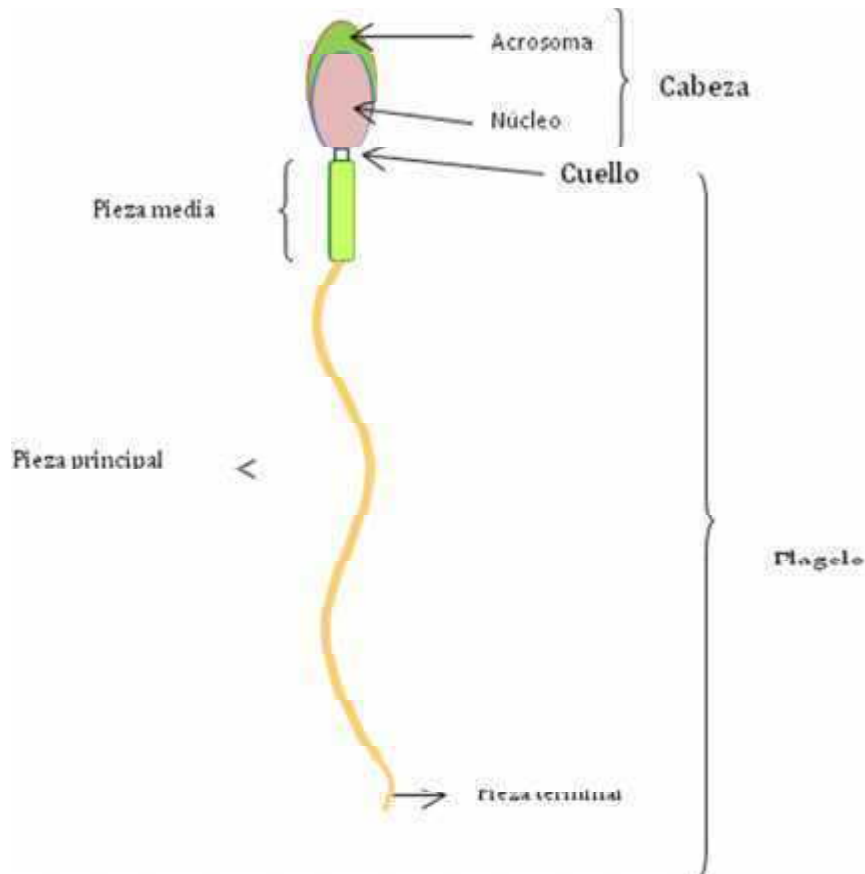


Figura 1. Esquema de espermatozoide humano donde se representa la cabeza con acrosoma y núcleo, el cuello y el flagelo con pieza media, principal y terminal (Modificado de Matsumoto, 1996).

Flagelo del espermatozoide

El flagelo puede ser dividido en cuatro regiones: **pieza conectora**, **pieza media**, **pieza principal** y **pieza terminal**, cada una con diferente anatomía relacionada con su función (Figura 1).

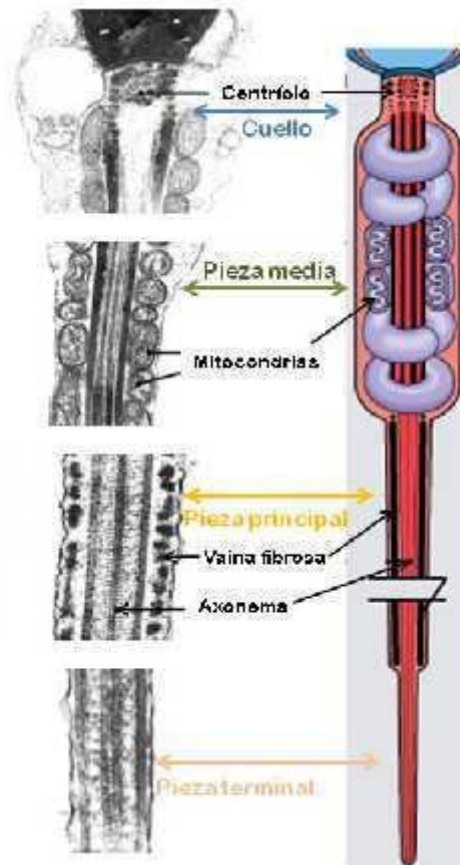


Figura 2. Flagelo espermático. Izquierda imágenes de microscopía electrónica en sus diferentes secciones, derecha esquema donde se representa cuello, pieza media, pieza principal y pieza terminal (modificado de Stevens y Lowe, 2004).

El **axonema** o filamento axial se extiende a lo largo de todo el flagelo a través de las cuatro regiones y constituye el aparato motor de la cola del espermatozoide (Figura 2). El axonema se encuentra organizado con el patrón clásico 9+2, es decir dos microtúbulos centrales rodeados por nueve dobletes de microtúbulos formados por dos subunidades; la

subunidad A completa y la B incompleta. El componente estructural de los microtúbulos es la tubulina (Farrell, 1982).

Extendiéndose desde cada túbulo A hacia el túbulo B del doblete adyacente hay pares de proyecciones de dineína y a su vez los nueve dobletes periféricos están conectados cada uno a su vecino inmediato por una proteína compuesta, la nexina (Figura 3).

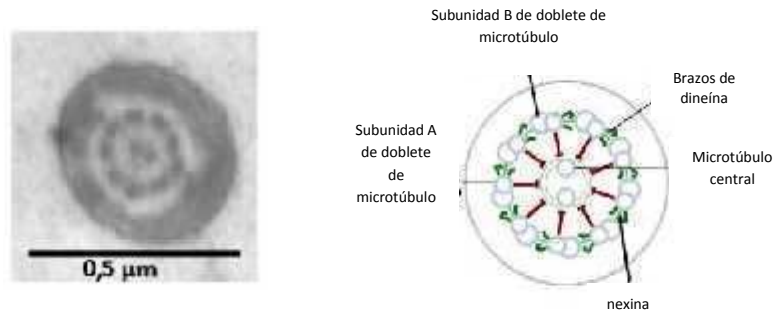


Figura 3. Izquierda: corte transversal de flagelo en imagen de microscopía electrónica tomada por Lic. Cristian Alvarez Sedó. Derecha: esquema de corte transversal de flagelo donde se representa el axonema formado por un par de microtúbulos centrales, 9 pares de microtúbulos periféricos formados por tubulina, nexina uniéndolos y brazos de dineína.

La **pieza conectora** forma un segmento que liga el flagelo y la cabeza. Sus principales componentes son capitulum (una estructura fibrosa con forma de cúpula) y las columnas segmentadas. El capitulum es el sitio donde se posiciona el centriolo proximal, en ángulo recto al eje del flagelo. La unión entre la cabeza y la cola está mediada por filamentos de capitulum y la placa basal en la superficie caudal del núcleo, permitiendo cierta flexibilidad al cuello.

Cada doblete de microtúbulos se asocia con una fibra densa que surge en el extremo distal de las columnas segmentadas. Las fibras cubren el axonema del espermatozoide en euterios formando las fibras densas externas.

La **pieza media** se extiende desde el extremo distal de la pieza conectora hasta el annulus, una banda circunferencial que marca la unión de la pieza media y la pieza principal. La característica más importante de la pieza media es la presencia de **vaina mitocondrial** que consiste en mitocondrias cubriendo de punta a punta el axonema en

forma helicoidal. El espermatozoide humano tiene una hélice compuesta de 11 a 15 giros, con un promedio de dos mitocondrias en cada giro (Phillips, 1970). En realidad, la vaina mitocondrial del espermatozoide humano a menudo tiene una apariencia desorganizada en contraste con el arreglo sumamente regular observado en otras especies de mamíferos. La estructura interna mitocondrial es similar a la observada en otros tipos celulares, sin embargo las mitocondrias espermáticas son inusuales en cuanto a la gran estabilidad de sus membranas externas. La gran estabilidad de las mitocondrias a cambios osmóticos y tratamientos con detergentes podría estar relacionada con la presencia de puentes disulfuro (Wallace y col., 1983). La significancia funcional de esta alta estabilidad no es clara pero serviría para resistir la compresión y el estiramiento durante el batido flagelar. La membrana interna de la mitocondria es el sitio de producción de energía de los espermatozoides y la posición de las mitocondrias alrededor del flagelo favorece el rápido suministro de ATP al axonema para la motilidad espermática (Favard y Andre, 1970).

El segmento más largo del flagelo es la **pieza principal**, que se extiende desde el annulus hasta el extremo proximal de la pieza terminal, con un largo de aproximadamente 55 μm . Se caracteriza por la presencia de vaina fibrosa, un citoesqueleto alrededor del axonema y fibras densas externas. Las proteínas que constituyen la vaina fibrosa contienen gran cantidad de puentes disulfuro, convirtiéndola en una estructura sumamente estable. La función de la vaina fibrosa sería similar o complementaria a la de las fibras densas externas, controlando y restringiendo el movimiento flagelar (Curry y Watson, 1995).

Más allá del extremo de la vaina fibrosa se encuentra la **pieza terminal** del flagelo. Los microtúbulos del axonema terminan en esta región, siguiendo un patrón regular aunque con variaciones. Primero los brazos de dineína desaparecen y la subunidad A toma apariencia de hueco (Pedersen, 1972) y al terminar los microtúbulos centrales, dos pares externos se mueven hacia adentro para ser rodeados por el resto. Luego hay una sucesiva terminación de los túbulos que van quedando en la punta del flagelo (Curry y Watson, 1995).

Cabeza del espermatozoide

Las funciones de la cabeza del espermatozoide son contener y conservar el ADN de la célula y entregarlo en el momento de la fertilización fusionándose con el ovocito. Para ello, el ADN debe mantenerse en forma estable hasta que sea requerido para la formación del pronúcleo masculino.

El espermatozoide debe ser capaz de penetrar las envolturas del ovocito para alcanzar la superficie del mismo. Debe haber mecanismos especie-específicos para el reconocimiento espermatozoide-ovocito y permitir la fusión de membranas. La cabeza del espermatozoide contiene pocas estructuras para desarrollar estas funciones, aparte del **núcleo** la única gran organela en la región de la cabeza es el **acrosoma** y la **vaina postacrosomal** (Figura 4).

El reconocimiento espermatozoide-ovocito es primordialmente una función de la membrana plasmática de la cabeza. La organización básica de la cabeza espermática es común a todos los espermatozoides de mamíferos pero el tamaño y forma, tanto del núcleo como del acrosoma y de la cabeza en sí misma, es extremadamente variable entre especies. Para el espermatozoide humano la forma es descrita como pleomórfica, y presenta un rango muy heterogéneo de apariencias haciendo que la definición de una forma y tamaño normal sea extremadamente difícil. Sin embargo la cabeza de un espermatozoide considerado normal mide alrededor de 4,5 μm de largo y 3 μm de ancho, y es ligeramente aplanada.

El **acrosoma** es una vesícula unida a la membrana que forma una cubierta tipo capuchón en la parte anterior del núcleo. En el espermatozoide de humano es relativamente pequeña y cubre dos tercios del núcleo pero no se extiende más allá de su borde anterior. La membrana acrosomal externa se apoya directamente en la membrana plasmática y es continua en los márgenes posteriores con la acrosomal interna. Las dos membranas quedan paralelas circunscribiendo un espacio lleno de matriz acrosomal, que contiene enzimas hidrolíticas de las cuales las dos mejor caracterizadas son hialuronidasa y acrosina (Siegel y *col.*, 1987). Las enzimas son liberadas durante la reacción acrosomal, el principal evento excitotico de la vida del espermatozoide.

El **segmento ecuatorial** es una región situada en el borde posterior del capuchón acrosomal, donde no hay enzimas de la matriz acrosomal. En humanos, tiene forma de

medialuna, se extiende hasta un cuarto del largo del acrosoma y permanece intacto luego de la reacción acrosomal, momento en el que la membrana acrosomal externa se fusiona con la plasmática para mantener la integridad celular. La región de membrana plasmática que recubre el segmento ecuatorial es el sitio de reconocimiento espermatozoide-ovocito y el punto fundamental de la fusión de membrana, sin embargo la fusión ocurre luego de la reacción acrosomal, indicando que durante la misma se producirían cambios a nivel de membrana en esta región (Yanagimachi, 1988). El segmento ecuatorial del acrosoma está ubicado en un lugar estratégico para estabilizar la región crítica de membrana, particularmente durante la penetración de la zona pelúcida luego de la reacción acrosomal.

Directamente debajo del acrosoma y separándolo del núcleo hay una fina capa de material perinuclear. Estabilizado por puentes disulfuro, el material perinuclear forma una continua capa recubriendo el núcleo y parece unir el acrosoma al núcleo. Este material forma la **vaina post acrosomal**, compuesta de dos regiones distintas, separadas por un surco poco profundo en la membrana plasmática: una región anterior compuesta por material denso y una región posterior de material granular. Hasta el momento no se le ha asignado funcionalidad a la vaina post acrosomal.

La membrana plasmática que se encuentra por arriba del acrosoma en la región anterior del espermatozoide está involucrada principalmente en dos procesos, el reconocimiento y unión a la zona pelúcida, y la fusión con la membrana del acrosoma durante la reacción acrosomal. Para ambos procesos ocurren cambios importantes durante la capacitación espermática (Cross y Overstreet, 1987)

La cromatina del **núcleo** del espermatozoide consiste en ADN asociado a proteínas muy básicas llamadas protaminas, de las que se hablará en detalle más adelante. Las protaminas mantienen el ADN en un empaquetamiento muy apretado gracias a los puentes disulfuro que forman entre tioles libres.

El núcleo contiene un número haploide de cromosomas, una mitad de cada par cromosómico; además, el ADN está completamente inactivo y no se replica hasta que las protaminas son reemplazadas luego de la entrada del espermatozoide al ovocito.

La forma del núcleo es específica de cada especie, está determinada por el genotipo del espermatozoide y en la mayoría de las especies muestra un alto grado de uniformidad. Los espermatozoides humanos son una excepción a esa regla mostrando una gran variedad de formas nucleares que van desde las formas alargadas hasta los núcleos redondeados, lo que hace difícil definir morfológicamente al núcleo normal. La heterogeneidad de la forma nuclear podría estar ligada a la heterogeneidad en la condensación de la cromatina, dado que muchos núcleos tienen numerosas vacuolas y áreas condensadas pobremente. Está en discusión si estas vacuolas y otros defectos en la condensación podrían afectar la fertilidad del espermatozoide (Hammadeh y *col.*, 1999).

La membrana nuclear carece por completo de poros nucleares, lo que refleja probablemente la naturaleza inerte del núcleo espermático, junto con una cromatina altamente condensada y ausencia de cualquier función sintética (Bedford y Hoskins, 1990).

El **anillo posterior** es una unión circunferencial entre la membrana plasmática y la cobertura nuclear. El anillo posterior, igual que el annulus del flagelo, es una barrera física entre los dominios de membrana que representa el mayor punto de separación entre el flagelo y la cabeza (Curry y Watson, 1995).

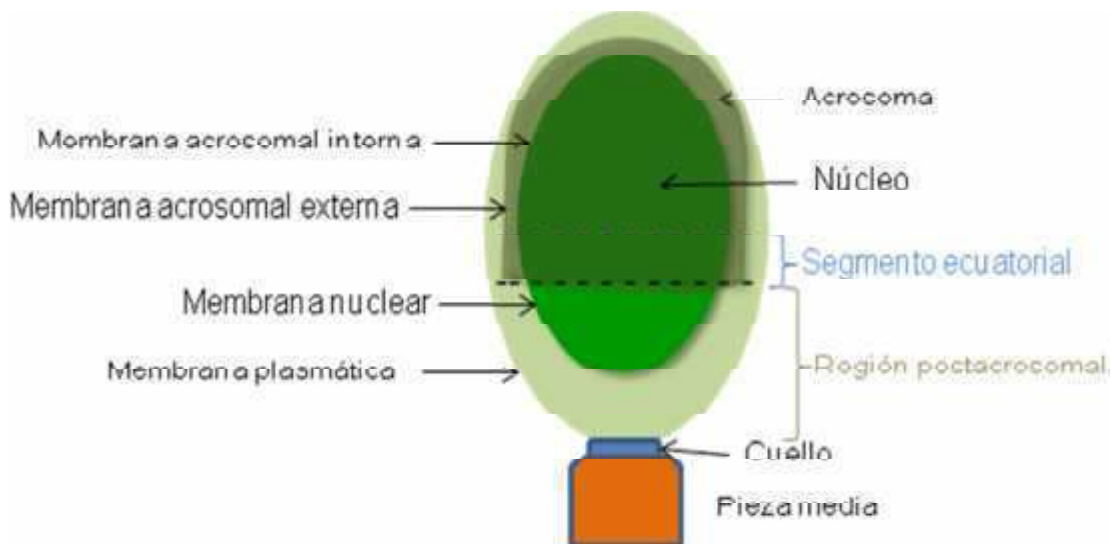


Figura 4. Esquema que representa la cabeza de un espermatozoide humano. Se observa: acrosoma, núcleo, segmento ecuatorial, región post acrosomal y cuello, y las membranas acrosomal externa e interna, nuclear y plasmática.

Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso de diferenciación celular que lleva a la producción de espermatozoides. Es probablemente uno de los procesos de diferenciación celular más complejo de los mamíferos y ocurre en los túbulos seminíferos del testículo.

Los túbulos seminíferos están rodeados de tejido intersticial que contiene nervios, vasos sanguíneos y linfáticos, células de Leydig y células sanguíneas. El final de los túbulos seminíferos se abre a la *rete testis*, localizada cerca del epidídimo en humanos y roedores, al cual se conecta a través de los ductos eferentes. El epidídimo es un único tubo enrollado sobre sí mismo, serpenteante, que desemboca en el vaso deferente. Cubriendo al epidídimo y al testículo se encuentra la túnica albugínea. (Figura 5) (Barratt, 1995).

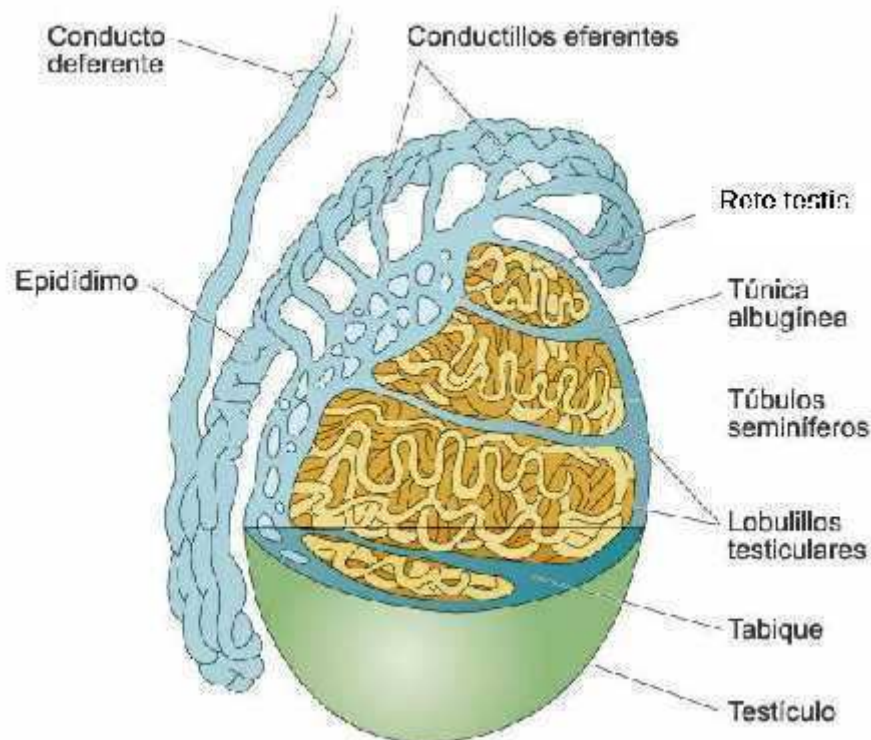


Figura 5: Modificada de Barrat, 1995. Representación de testículo donde se observa la túnica albugínea que penetra formando tabiques, que delimitan los lobulillos testiculares formados por túbulos seminíferos. También se representa el epidídimo y conducto deferente.

El interior de los túbulos seminíferos está tapizado por un epitelio compuesto por células germinales y células de Sertoli.

Las células de Sertoli cumplen un papel fundamental en la espermatogénesis debido a que forman uniones estrechas entre sí y esto proporciona un microambiente para la diferenciación de las células germinales. Contactan además con todos los demás tipos celulares. La porción basal permite acceder a sustancias que se encuentran en la circulación. Las espermatogonias reposan entre las células de Sertoli y la membrana basal, mientras que otras células (espermaticitos, espermátides, etc) se sitúan entre las células de Sertoli o embebidas en su citoplasma. Se forman así dos compartimientos en los túbulos seminíferos, un compartimiento basal y un compartimiento adluminal por encima de las uniones (barrera hemato-testicular). La espermatogonia existe en el compartimiento basal y otros estadios de la espermatogénesis en el compartimiento adluminal (Figura 6) (Barratt, 1995).

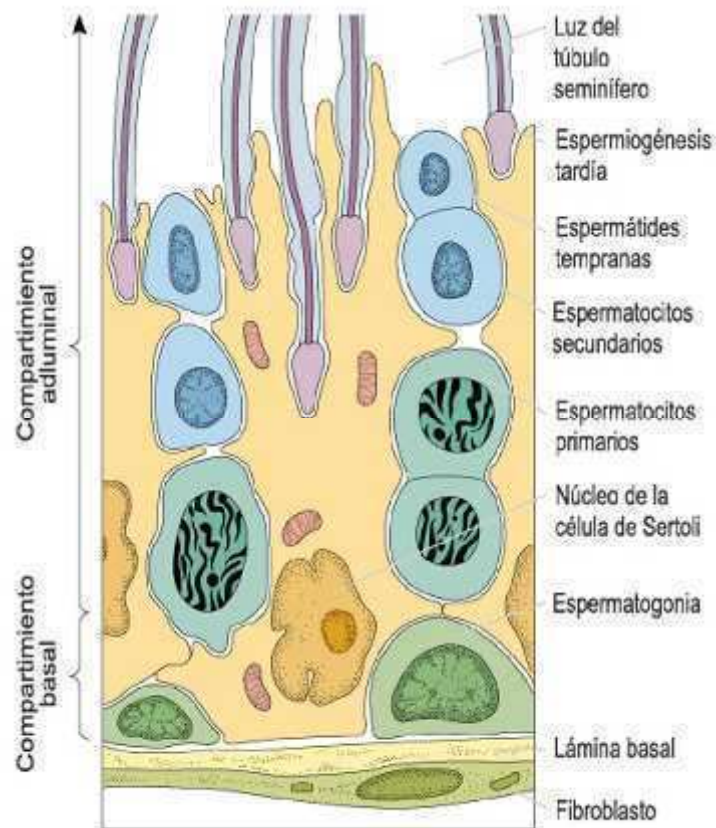


Figura 6: Modificada de Barrat, 1995. Sección transversal de túbulo seminífero donde se observan los distintos estadios de espermatogénesis.

Las células germinales no se dividen hasta luego de la pubertad. La **espermatogonia**, que es diploide, se divide mitóticamente para producir más espermatogonias o se diferencia para producir **espermatoцитos primarios**. Los espermatoцитos se dividen por meiosis para formar cuatro **espermátides** haploides. Durante estas divisiones ocurren dos eventos que tienen importantes consecuencias genéticas: hay una separación al azar de cromosomas homólogos y el entrecruzamiento del material genético, lo que produce la diversidad genética necesaria para la supervivencia de las especies (Barrat, 1995).

El desarrollo de espermátides para producir **espermatozoides** se conoce como **espermiogénesis** y es un proceso realmente destacado en el que se producen cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que llevan desde una célula simple hasta un espermatozoide altamente diferenciado (Figura 7). Este proceso toma aproximadamente 22 días en el humano y está muy sincronizado e integrado, de modo tal que pequeñas desviaciones pueden producir infertilidad (Bustos-Obregon y col., 1975; Barrat, 1995).

Al principio, la espermátide es una célula simple en la que tienen lugar muchos cambios que formarán el citoesqueleto básico del espermatozoide. La cromatina del núcleo se condensa, las cisternas del aparato de Golgi se fusionan para formar el acrosoma que migra al núcleo y se reparte por la superficie nuclear formando el sistema acrosomal, los dos centríolos migran en dirección opuesta al acrosoma en formación, uno se alinea radialmente formando el axonema en la futura cola y el otro se localiza en ángulo recto y forma la pieza conectora que une la cola al núcleo. El axonema de la cola se alarga y las mitocondrias se dividen. Cuando la espermiogénesis termina, las extensiones citoplasmáticas con la célula de Sertoli se rompen y se libera el espermatozoide. La síntesis de ARN y proteínas es máxima durante la meiosis y disminuye abruptamente hasta niveles indetectables durante la espermiogénesis (Bustos-Obregon y col., 1975; Barrat, 1995).

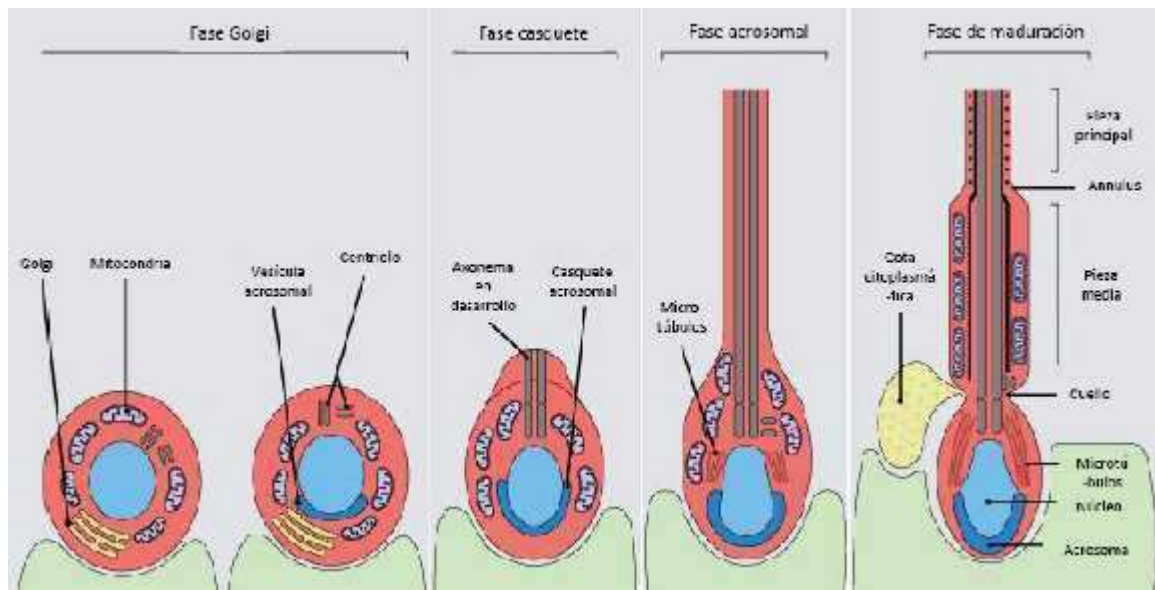


Figura 7: Esquema que representa los estadios de espermiogénesis (modificado de Stevens y Lowe, 2004).

Protagonistas secundarias: Las Protaminas

Durante la **espermiogénesis** el núcleo cambia sus estructuras somáticas como nucleosomas, por la estructura nucleoprotamina de los espermatozoides de mamíferos. El ADN se compacta al reemplazar las histonas nucleares por protaminas específicas de espermatozoides. Las histonas son reemplazadas primero por proteínas de transición y luego por proteínas pequeñas (50-60 aminoácidos), básicas, ricas en cisteína y arginina, llamadas **protaminas**. Las protaminas no funcionan como proteínas estructurales, proporcionando un núcleo alrededor del cual se envuelve el ADN, sino que neutralizan la columna fosfodiéster de la molécula de ADN, minimizando la repulsión entre segmentos vecinos de ADN, permitiendo su condensación, transformando el núcleo en una estructura altamente condensada, químicamente inerte y transcripcionalmente inactiva (Pogany y col., 1981). Esta neutralización de las cargas negativas del ADN espermático a través de complejos con protaminas favorece una configuración beta plegada, lo que concuerda con la apariencia laminar que se observa en preparaciones por criofractura (Balhorn, 1982; Curry y Watson, 1995).

En los mamíferos, el núcleo espermático contiene una estructura única, el anillo nuclear. El ADN del núcleo espermático parece estar anclado a este anulus. El ADN compacto

forma un toroide de 50 kilobases aproximadamente, en forma de “doughnut” con el bucle de cromatina superenrollada que se mantiene en su lugar por enlaces disulfuro formados por la oxidación de grupos sulfhidrilo presentes en las protaminas (Calvin y Bedford, 1971; Ward y Coffey, 1991; Ward, 1993). Esta estructura es mucho más pequeña que el solenoide normal de los bucles típicos de los núcleos de las células somáticas (Figura 8).

La descondensación del ADN utiliza glutatión para reducir los puentes disulfuro de las protaminas (Perreault y *col.*, 1984; 1988). Cuando los enlaces se rompen, los bucles de las “doughnuts” se despliegan y de esa forma posibilitan a los factores ovocitarios descondensar la cromatina y formar el pronúcleo masculino (Zirkin y *col.*, 1982).

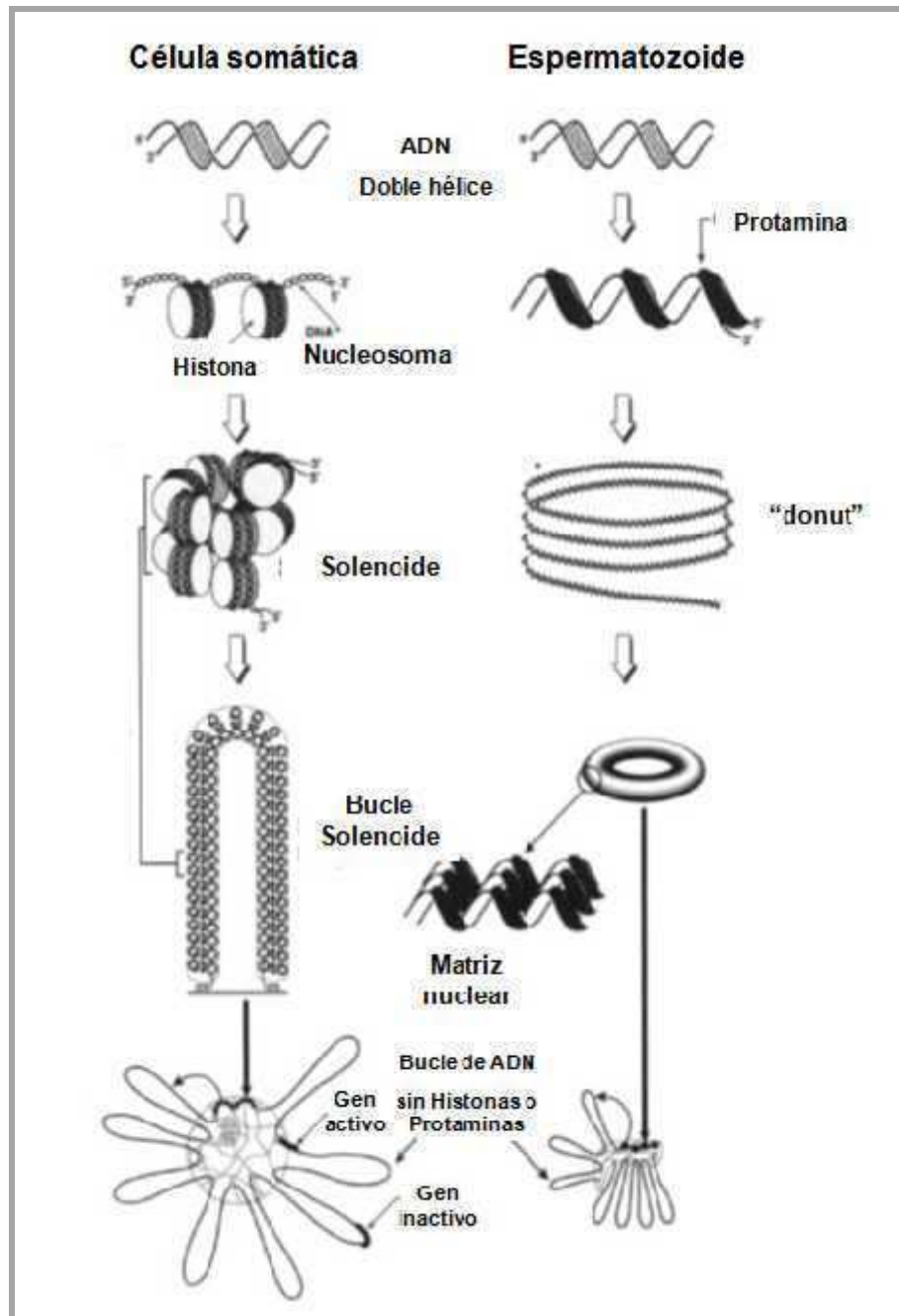


Figura 8: Niveles equivalentes de empaquetamiento en células somáticas y espermatozoides. En las células somáticas, el ADN se encuentra compactado en solenoides con 6 nucleosomas por vuelta y están anclados a la matriz nuclear en intervalos de 60000 pares de bases. Los genes activos tienden a estar asociados con la matriz nuclear. En el núcleo del espermatozoide, las protaminas se unen al ADN, neutralizando sus cargas

negativas y enrollan el complejo en círculos. Estos círculos se unen en estructuras con forma de “doughnuts”. Cada “doughnut” representa un bucle de ADN unido a la matriz nuclear (modificado de Ward, 1993).

El ADN de los espermatozoides de mamíferos es el ADN eucariota que se encuentra empaquetado más apretadamente, estando al menos seis veces más condensado que el ADN en cromosomas mitóticos, lo que le permite ocupar un pequeño volumen (Ward y Coffey, 1991).

El carácter básico de las protaminas es suficiente para neutralizar la carga de los ésteres fosfato del esqueleto de ADN y así permitir un empaquetamiento muy apretado de la cromatina. El alto contenido en cisteína permite la formación de puentes disulfuro cruzados intra e intermoleculares entre los tioles libres. Este entrecruzamiento (formación de -S-S-) se intensifica durante el pasaje a través del epidídimo, confiriéndole gran resistencia a la disrupción química y física. (Bedford y *col.*, 1973; Calvin y Bedford 1971; Calvin 1976; Pellicciari y *col.* 1983).

La estabilidad proporcionada por los puentes disulfuro, se verá incrementada por la presencia de zinc (proveniente del plasma seminal), que se une a los sulfhidrilos libres de las protaminas, y de esta manera impide el intercambio entre estos residuos y los puentes disulfuro ya formados (Kvist y Eliasson, 1980; Yanagimachi, 1994; Björndahl y Kvist, 2010)

A diferencia de las histonas en los núcleos somáticos que se encuentran altamente conservadas entre especies, las nucleoproteínas espermáticas muestran diferencias interespecíficas. Los tres tipos de proteínas básicas espermáticas: las histonas (H), las proteínas tipo protamina (PL “protamine-like”) y las protaminas (P), están bien representadas en los vertebrados. En mamíferos se han descrito dos tipos de protaminas, la protamina 1 (P1) y la familia de protaminas 2 (P2) que en el curso de la evolución en este grupo de vertebrados han experimentado una transición hacia proteínas ricas en cisteína que ha mejorado la eficiencia del empaquetamiento del ADN nuclear (Balhorn y *col.*, 1977; Bower y *col.*, 1987; Ausió y *col.*, 2007)

Las P1 tienen un alto contenido de cisteína y arginina y se encuentran presentes en espermatozoides de todas las especies de vertebrados estudiados (McKay y *col.*, 1985; Gusse y *col.*, 1986; Bellvé y *col.*, 1988; Oliva y Dixon, 1991; Chauvière y *col.*, 1992; Yoshii y *col.*, 2005, Balhorn, 2007). En cambio las P2 están presentes en algunas especies

incluyendo humano y ratón (Kolk y Samuel, 1975; Pongsawasdi y Svasti, 1976; Thanphaichitr y *col.*, 1978; Gusse y *col.*, 1986; Balhorn y *col.*, 1987), formadas por componentes P2, P3 y P4, contienen histidina además de cisteína y arginina y pueden unir Zn^{2+} con quien formarían estructuras tridimensionales del tipo “dedos de zinc”, a través de las cuales interactuarían con el ADN (Bench y *col.*, 2000; Pradeepa y *col.*, 2007).

La cantidad de protaminas en relación al ADN es constante entre especies, pero la relación P1/P2 es variable (Corzett y *col.*, 2002) y está aparentemente vinculada con el tiempo necesario para que pueda llevarse a cabo la descondensación nuclear. Aquellas especies que contienen P2 además de P1 descondensarían más rápido, sugiriendo que P1 y P2 difieren en el grado de estabilidad que confieren a la cromatina (Perreault y *col.*, 1987; Perreault, 1990).

En humanos, se ha relacionado la alteración de la proporción P1/P2 o la ausencia de P2 con infertilidad (Balhorn y *col.*, 1988; Belokopytova y *col.*, 1993, Ausió y *col.*, 2007; Torregrosa y *col.*, 2006). Más específicamente se han relacionado los cambios en la expresión de P1 y P2 con la infertilidad en el hombre encontrándose, además, mutaciones en los genes de las protaminas en algunos pacientes infértiles. En ratones transgénicos con defectos en la expresión de protaminas también se observaron defectos estructurales en el núcleo espermático y diferentes grados de infertilidad. También hay evidencias de que niveles alterados de protaminas resultarían en un aumento en la susceptibilidad al daño en el ADN espermático, causando infertilidad (Oliva, 2006).

Si bien, durante la espermatogénesis, se produce el reemplazo de histonas por proteínas de transición y luego por protaminas, esto no ocurre en el 100% de los casos. Aproximadamente un 15% de las histonas permanecen en los espermatozoides eyaculados (Tanphaichitr y *col.*, 1978; Chevaillier y *col.*, 1987; Gatewood y *col.*, 1987). Variaciones en la cantidad de histonas que permanecen en los espermatozoides dan como resultado espermatozoides con sus núcleos inmaduros (Kramer y *col.*, 1997). Se observó también que el eyaculado de hombres infértiles contiene mayor proporción de núcleos inmaduros que los hombres con fertilidad comprobada (Foresta y *col.*, 1992; Auger y *col.*, 1993).

La deficiencia de protaminas podría relacionarse con una mayor exposición a las especies reactivas de oxígeno (ROS) o a una mayor fragmentación del ADN por la pobre compactación (Agarwal y *col.*, 2004; Shamsi y *col.*, 2008).

Fecundación

Fecundar: (Del lat. *fecundāre*). Unir la célula reproductora masculina a la femenina para dar origen a un nuevo ser (RAE). Tan sencillo... y tan complejo.

Para que se produzca la fecundación en los mamíferos, las gametas deben interactuar en un proceso complejo, que en el humano se produce en la ampolla de las trompas de Falopio, donde el ovocito se encuentra recién ovulado y arrestado en metafase II.

Lo primero que debe ocurrir cuando se encuentran las gametas, es que el espermatozoide deberá atravesar las barreras que rodean al ovocito para, finalmente, ingresar al ooplasma.

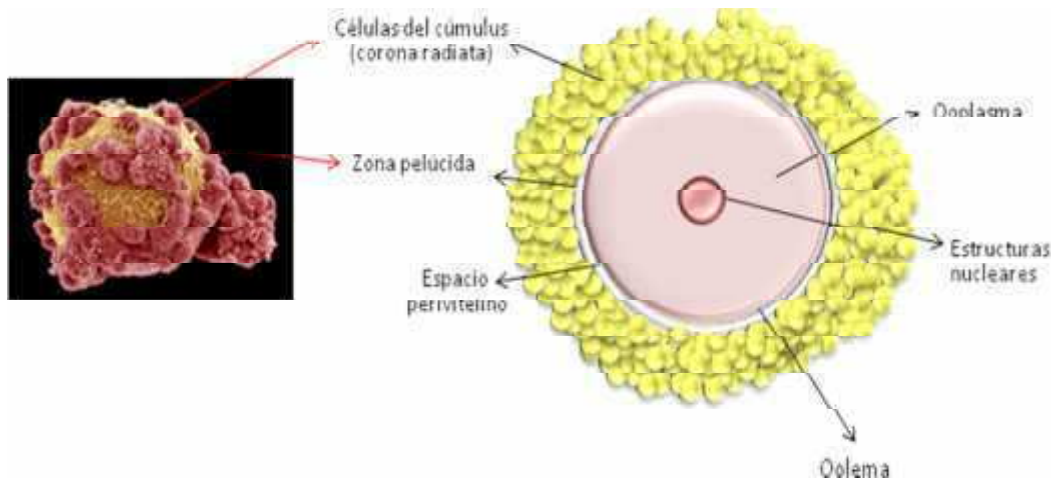


Figura 9: Izquierda, foto de ovocito cubierto por la zona pelúcida y rodeado de células del cúmulus (tomada de internet). Derecha, esquema que representa las capas que rodean el ovocito. Se observa: estructuras nucleares, ooplasma, oolema rodeado por el espacio perivitelino y la zona pelúcida. Más externamente, la densa masa de células del cúmulus que habitualmente rodean el ovocito.

La primer barrera con que se encuentra el espermatozoide al llegar al ovocito es la corona radiata, formada por las células del cúmulus (Figura 9), y su matriz extracelular cuyo componente principal es el ácido hialurónico (Russell y Salustri, 2006).

Actualmente se encuentra en discusión de qué manera los espermatozoides aptos logran atravesar el cúmulus. Es probable que el espermatozoide se abra paso gracias a la combinación de dos factores: uno enzimático, donde la hialuronidasa presente en el acrosoma espermático degrada la matriz extracelular de las células del cúmulus, facilitando el movimiento del flagelo al generar un cambio en la viscoelasticidad y un factor mecánico que consiste en la hiperactivación que logra el espermatozoide durante su pasaje por el oviducto (Green, 1988; Yanagimachi, 1994; Bedford, 1998; Kim y *col.*, 2008). Luego de atravesar el cúmulus, el espermatozoide se encuentra con la zona pelúcida. El espermatozoide tiene en su membrana, receptores para ligandos específicos de la zona pelúcida, particularmente para la ZP3. La unión ligando-receptor dispara un mecanismo mediado por proteína G, que produce un aumento del calcio intracelular y lleva a la reacción acrosomal, en la que se libera el contenido del acrosoma, formado principalmente por proteasas que degradan la matriz extracelular (acrosina, proteasas tipo tripsina, peptidasas tipo colagenasas, etc., Honda y *col.*, 2002).

La reacción acrosomal tiene al menos dos funciones, la penetración a través de la zona pelúcida y la adquisición de capacidad fusogénica por parte del espermatozoide que le permitirá luego fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Yanagimachi, 1994).

Esta fusión de las membranas espermática y del ovocito ocurre cuando la cabeza del espermatozoide ya reaccionado apoya su segmento ecuatorial sobre la membrana plasmática del ovocito, produciéndose un reconocimiento específico a través de uniones ligando receptor (Bedford y *col.*, 1978; Moore y Bedford, 1983). Al fusionarse las membranas, se internaliza totalmente el espermatozoide (Yanagimachi, 1994) y se disparan dos procesos en el ovocito. En primer lugar, un aumento del Ca^{2+} intracelular libre a través de inositol trisfosfato, que produce la liberación de los gránulos corticales del ooplasma al espacio perivitelino (reacción cortical) cuyo contenido volverá refractaria a la zona pelúcida impidiendo el ingreso de otro espermatozoide, evitando así la polispermia (Szollosi, 1967; Jaffe, 1983; Turner y *col.*, 1986). Por otro lado, el ovocito retoma la meiosis (detenido hasta ese momento en metafase II), y al culminar la misma, se producirá la extrusión del segundo corpúsculo polar y la formación del pronúcleo femenino.

Una vez dentro del ovocito, el espermatozoide sufre también importantes cambios ultraestructurales. El primer cambio visible es la descondensación de la cromatina, que se produce en los primeros minutos después de la penetración del ovocito (Berrios y Bedford, 1979; Jager, 1990), e implica la sustitución de la mayoría de las protaminas espermáticas por histonas provenientes del ovocito.

La descondensación de la cromatina espermática es necesaria para que se pueda formar el pronúcleo masculino (Tesarik y Kopecny, 1989; Lassalle y Testart, 1991). Una vez formados los pronúcleos femenino y masculino, se fusiona el material genético de ambas gametas (singamia) para completar el número de cromosomas necesarios para crear el genoma del embrión. En primer lugar se disgregan las membranas de los pronúcleos y los cromosomas homólogos de los dos pronúcleos se organizan en el centro del huso mitótico para comenzar la primera división celular de un nuevo individuo. Y ahí comienza otra historia...

Descondensación del núcleo espermático

Volviendo unos pasos hacia atrás, una vez que el espermatozoide humano penetró en el ovocito, el primer cambio ultraestructural que tuvo lugar en el núcleo espermático y que precedió a su descondensación fue en realidad la desintegración de la membrana nuclear, que comienza a nivel del segmento ecuatorial y procede hacia adelante y hacia la región posterior.

El proceso de descondensación comprende dos eventos esenciales: la reducción de los puentes disulfuro (-S-S-) de las protaminas a sulfhidrilos libres (SH), y el intercambio de las protaminas del espermatozoide por histonas del ovocito. Se ha establecido claramente que *in vivo*, la tiorreducción (reducción de los puentes disulfuro) la lleva a cabo el glutatión (GSH) presente en forma abundante en el ovocito maduro en una gran variedad de especies de mamíferos incluyendo la humana (Perreault y col., 1984; Calvin y col., 1986; Liu y Baker, 1992; Sutovsky y Schatten, 1997) y sería el paso limitante de la velocidad de descondensación nuclear espermática (Zirkin y col., 1982; Perreault, 1987). Tradicionalmente, la reducción de los puentes disulfuro y el intercambio de protaminas por

histonas, fueron considerados eventos secuenciales durante la descondensación nuclear (Perreault y *col.*, 1984; Zirkin y *col.*, 1985).

El glutatión es un tripéptido (γ -Glu-Cys-Gly) que contiene un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato (Figura 10).

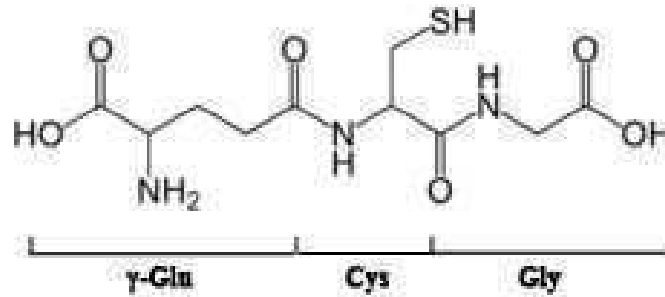
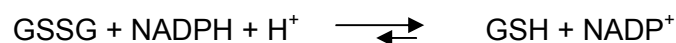


Figura 10: Estructura química del glutatión reducido, agente fisiológico que participa en la descondensación de la cromatina espermática

El glutatión existe en los estados reducido (GSH) y oxidado (GSSG). Más del 90% del total de glutatión intracelular se encuentra como GSH, y el balance entre GSH y GSSG se mantiene a través de un rápido reciclado de GSSG a GSH vía la enzima glutatión reductasa (Meister y Anderson, 1983). Hay evidencias de que los ovocitos regenerarían y mantendrían el GSH en estado tiol de manera similar al resto de las células (Wiesel y *col.*, 1981). En los ovocitos de mamíferos, la relación intracelular entre GSH y GSSG es muy alta y el GSSG se reduce a GSH inmediata o rápidamente, por lo que el glutatión medido se encuentra mayoritariamente en forma reducida (Perreault y *col.*, 1984).

Glutatión reductasa



El glutatión reduce los puentes disulfuro formados por las cisteínas dentro de las proteínas, actuando como donador de electrones. En el proceso, se convierte a su forma oxidada glutatión disulfuro (GSSG).

La concentración de GSH en ovocitos maduros ovulados en Metafase II es de 8 a 10 mM, (Calvin y *col.*, 1986) mientras que en estadio de vesícula germinal (VG), es de alrededor de 4 a 6 mM. (Perreault y *col.*, 1988) (Figura 11). Este aumento en las concentraciones de

GSH durante la maduración del ovocito se debe a la síntesis del mismo y es un requisito fundamental para la fertilización y desarrollo normal del embrión. Una vez maduro, se frena la síntesis y los valores elevados de GSH se mantienen por medio de la glutatión reductasa (Luberda, 2005).

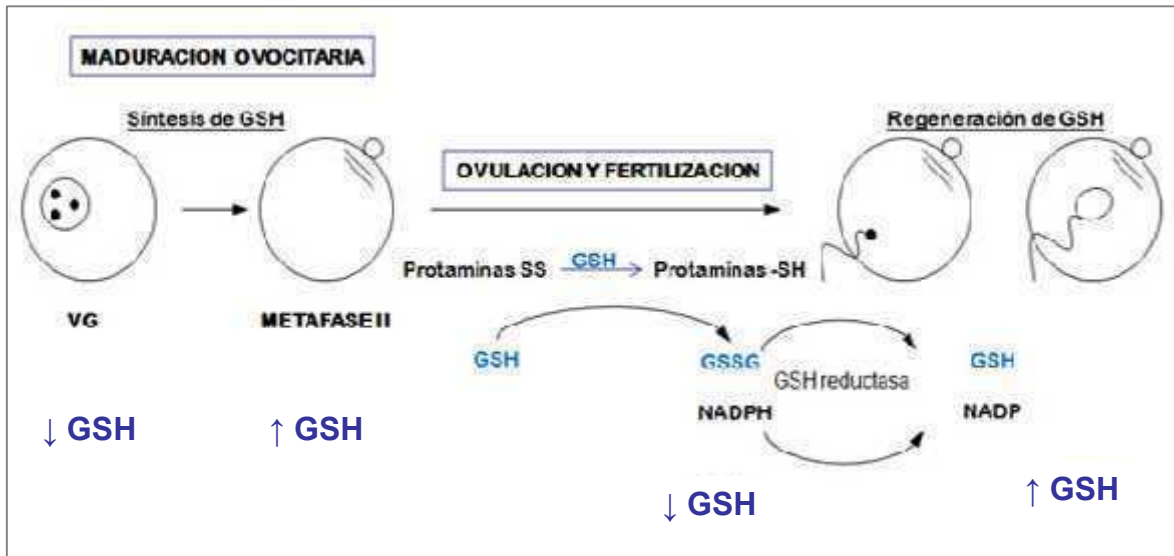


Figura 11. Hipótesis de la adquisición de la capacidad para descondensar del núcleo espermático durante la maduración ovocitaria en mamíferos. La estimulación de la síntesis de GSH luego de la ruptura de la vesícula germinal resulta en un nivel relativamente alto de GSH intra-ovocitario, en ovocitos en metafase II. En el momento de la fertilización el GSH se oxida a GSSG como consecuencia de la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas; luego es regenerado por medio de la GSH reductasa (modificado de Perreault, 1990).

La cantidad de GSH presente en VG sería suficiente para tiorreducir en 30 minutos las protaminas de espermatozoides de hámster (Perreault 1988), sin embargo, el ooplasma de ovocitos en este estadio, es incapaz de descondensar espermatozoides *in vitro*. Esta dificultad para descondensar deja de manifiesto la necesidad de otra molécula (que estaría ausente o insuficiente en este estadio) para llevar adelante la descondensación (Maleszewski, 1992).

En el ovocito maduro, la cantidad de GSH debería ser suficiente para mantener los puentes disulfuro de las protaminas en su forma reducida (SH) mientras dura la descondensación de la cromatina y así permitir que las histonas ovocitarias tengan acceso a la cromatina del espermatozoide reemplazando a las protaminas.

Usui y Yanagimachi (1976) observaron diferencias en la capacidad del ovocito para descondensar la cromatina espermática de acuerdo con el estadio en que se encontraba el ovocito y propusieron que los factores necesarios para la descondensación estarían ausentes o se encontrarían inactivos en la mayoría de los estadios y se activarían solo en algún punto de la maduración ovocitaria (Figura 12).

Tipo de ovocito	Estadio ovocitario en el momento de la inseminación (hs. Post hCG)	1 hora luego de la inseminación		3 horas luego de la inseminación	
		Núcleo ovocitario	Núcleo espermático	Núcleo ovocitario	Núcleo espermático
Ovario inmaduro	VG (0)	VG		Cond. VG ~ Prometafase I	
	Prometafase I (4)	Promet (I)		Prometafase I ~ Metafase I	
	Met I ~ Ana I (8)	Anafase I		Telofase I ~ Masa crom	
	Met. II (12)	Anafase II		Promúcleo temprano	
Oviductal maduro	Met. II (16)	Telofase II		Promúcleo	
Fertilizado en oviducto	I célula, promúcleo	Promúcleo		Promúcleo	
	I-célula, antes del 1° clivaje	Prometafase, 1° clivaje		Prometafase ~ Tel, 1° clivaje	
	II-células	Interfase		Interfase	

Figura 12: Cambios en el núcleo espermático al incorporarse al interior de ovocitos en diferentes estadios de maduración y desarrollo temprano. VG: vesícula germinal; VG Cond: vesícula germinal condensada que contiene cromatina condensada; Promet: prometafase; Met: metafase; Ana: anafase; Tel: telofase; Masa crom: masa de cromatina; EN: nueva envoltura nuclear (Tomado de Usui y Yanagimachi, 1976, modificado por Marina Romanato, Tesis Doctoral, FCEyN, UBA y utilizado con su permiso).

También se observó que los ovocitos de porcinos, una vez fertilizados, presentan un descenso de los niveles de GSH, lo que indicaría una disminución de la síntesis, un aumento de la degradación de GSH, o la utilización del mismo en la descondensación (Yoshida y *col.*, 1993).

Para descondensar la cromatina de espermatozoides *in vivo*, no es suficiente la tiorreducción de las protaminas. Aunque éste sea un evento clave en el proceso, debe ocurrir además el intercambio de las protaminas espermáticas por histonas del ovocito (Perreault y *col.*, 1984; Usui y Yanagimachi, 1976). Para este intercambio, sería necesaria la presencia de una macromolécula con fuerte carga negativa que funcione como aceptora de las protaminas, compitiendo con el ADN espermático

En 1978, Laskey y *col.* demostraron la presencia en ovocitos de *Xenopus laevis*, de una proteína ácida que participa del ensamblaje de los nucleosomas a partir de las histonas y del ADN, la nucleoplasmina (Prado y *col.*, 2004). En 1991, Philpott, demostró que esta proteína, presente en el citoplasma de huevos de *Xenopus* (Philpott y *col.*, 1991; Philpott y Leno, 1992), era intermediaria en la descondensación de la cromatina en espermatozoides en esa especie. También se ha demostrado esta función para la nucleoplasmina en *Drosophila melanogaster* y *Mytilus californianus* (Ohsumi y Katagiri, 1991; Philpott, 2000; Kawasaki y *col.*, 1994; Rice y *col.*, 1995).

En mamíferos, incluido el hombre, la nucleoplasmina no sería la responsable de la descondensación de la cromatina de los espermatozoides, ya que Burns y *col.*, en 2003 demostraron que en hembras de ratones “knock-out” para nucleoplasmina, los espermatozoides pueden descondensar su cromatina sin problemas.

¿Cuál podría ser entonces la molécula responsable *in vivo* del intercambio de protaminas del espermatozoide por histonas ovocitarias durante la descondensación de la cromatina, en mamíferos?

Evidencias “in vitro”

La descondensación de la cromatina espermática puede ser inducida *in vitro* de varias formas, utilizando agentes farmacológicos o agentes fisiológicos. Algunos de los agentes farmacológicos que pueden utilizarse son la mezcla de dodecilsulfato sódico y ditioneitol

(SDS/DTT) o la de SDS y ácido etilendiaminotetraacético (SDS/EDTA) (Liu y *col.*, 1987; Gopalkrishnan y *col.*, 1991), entre otros.

Entre los agentes fisiológicos que se han utilizado para inducir la descondensación de espermatozoides humanos, se encuentran los extractos ovocitarios de erizo de mar, sapo y ratón (Delgado y *col.*, 1982; Gordon y *col.*, 1985; Brown y *col.*, 1987; Maleszewski, 1990), hecho que sugeriría que las moléculas que intervienen en la descondensación de la cromatina *in vivo* no serían específicas de especie. Otra combinación de agentes fisiológicos capaz de inducir la descondensación de la cromatina en espermatozoides humanos *in vitro*, es la dupla heparina y GSH (Reyes y *col.*, 1989).

La **heparina** es una cadena de polisacáridos con peso molecular entre 4 y 40 kDa que actúa como inhibidor de la trombina, fundamental para la coagulación de la sangre. Es un glicosaminoglicano formado por la unión de ácido-D-glucurónico o ácido L-idurónico a la N-acetil-D-glucosamina (GlcA-GlcNAc) (Figura 13), disacárido que se repite de 12 a 50 veces y se caracteriza por tener la más alta densidad de carga de todas las moléculas biológicas conocidas (Cox y Nelson, 2004; Hanger-Mcwhirter y *col.*, 2000). En condiciones fisiológicas los grupos éster y amida fosfato se encuentran desprotonados, lo que atrae contraiones cargados positivamente formando sales de heparina, forma en que se comercializa.

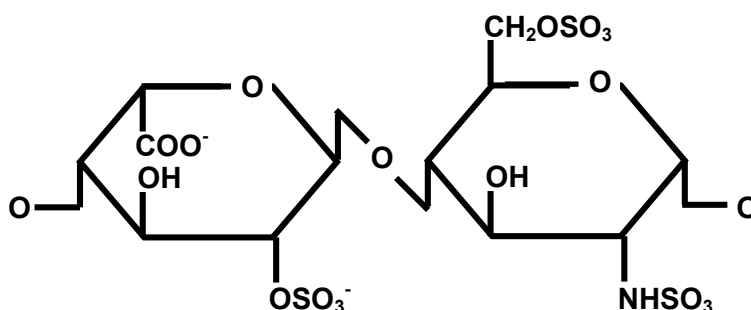


Figura 13: Estructura química de la heparina en su forma disacáridica más común: ácido idurónico 2-O sulfatado y glucosamina 6-O, N-sulfatada, IdoA(2S)-GlcNS(6S)

En 1937, Chargaff y Olson, observaron que la salmína (protamina de salmón), ejercía un efecto sobre la actividad anticoagulante de la heparina, atribuyéndolo a la fuerte afinidad de la heparina por las protaminas produciendo un complejo insoluble (Portmann, 1949).

Sin embargo, no se ha dilucidado completamente el mecanismo de acción de la heparina y su interacción con las protaminas durante la descondensación del núcleo espermático.

Para algunos autores, la heparina se une a receptores de membrana del espermatozoide (Delgado y col. 1982; Handrow y col., 1984; Hurst y col., 1988), desestabilizándola (Delgado, 1998), haciéndola permeable (Reyes, 2002), lo que permitiría así la entrada de otros compuestos como por ejemplo el GSH.

En 1999, Delgado y colaboradores, utilizaron nucleones como modelo para estudiar la descondensación *in vitro*. Los nucleones son estructuras de cromatina altamente organizada, aislada a partir de espermatozoides de diferentes especies, sin membranas, organelas ni proteínas ajenas al núcleo espermático. Con la utilización de estas estructuras, postularon que heparina y GSH inducirían la descondensación de núcleos espermáticos a través de un mecanismo de neutralización de las cargas iónicas de la cromatina (Delgado, 2001), es decir mediante una interacción directa de la heparina sobre la cromatina, sugiriendo que se trataría de un fenómeno meramente electrostático.

Sin embargo, en nuestro laboratorio se demostró, utilizando distintas heparinas químicamente modificadas, que si bien la actividad descondensante *in vitro* de la heparina era independiente del peso molecular de la misma en el rango de 3000 a 18800 Da, se veía fuertemente afectada por la sulfatación de la molécula, no solo por alterar la carga neta, sino por cambiar la ubicación de las cargas en la unidad disacáridica (Romanato y col, 2003). La localización de estas cargas determina las interacciones electrostáticas entre grupos cargados y, en consecuencia, la modificación de la sulfatación de la molécula genera cambios conformacionales y estos, a su vez, modifican su actividad biológica. Se dedujo entonces que la actividad descondensante *in vitro* de la heparina estaría relacionada con las características estructurales de la molécula y no solamente con la carga neta de la misma (aniónica) que le permite competir con el ADN por las protaminas

¿Qué pasa “in vivo”?

Para algunos autores, la heparina sería responsable de la descondensación de la cromatina también *in vivo* (Lalich y col., 1989; Montag y col., 1992) pero, dado que la

única célula capaz de sintetizar heparina *in vivo* es el mastocito, la presencia de heparina en el complejo cúmulus-ovocito es poco probable (Feyerabend y *col.*, 2006; Enerbäck, 1989; Nader, 1989). Sin embargo, hay evidencias de que en este sitio hay otros glicosaminoglicanos (GAGs) en diferentes especies (Gebauer y *col.*, 1978; Ball y *col.*, 1982; Bellin y Ax, 1984; Salustri y *col.*, 1989). También se advierte la presencia de GAGs en el tracto genital femenino, particularmente en el fluido folicular de varias especies (Yanagishita y *col.*, 1979; Reyes y *col.*, 1984; Thérien y *col.*, 2005) incluyendo la humana (Bellin y *col.*, 1986).

Dentro de los glicosaminoglicanos presentes en el complejo cúmulus-ovocito el candidato natural para la función de aceptor de protaminas durante la descondensación espermática *in vivo* es el heparán sulfato (HS) ya que es un análogo estructural de la heparina y presenta acción biológica equivalente en la mayoría de los sistemas biológicos estudiados (Delgado y *col.*, 1982; Jackson y *col.*, 1991; Rosemberg y *col.*, 1997; Yanagishita y Hascall 1992a).

Es así que en nuestro laboratorio se estudió la capacidad descondensante *in vitro* de los diferentes GAGs presentes en el complejo cúmulus-ovocito: ácido hialurónico (HA), condroitín sulfato (CS), heparán sulfato (HS) y dermatán sulfato (DS) (Jackson y *col.*, 1991; Bellin y *col.*, 1986; Eriksen y *col.*, 1997, Romanato y *col.*, 2008). Se observó que el único de estos glicosaminoglicanos que producía efectos descondensantes *in vitro* similares a la heparina, era el HS (Romanato y *col.*, 2003) (Figura 14).

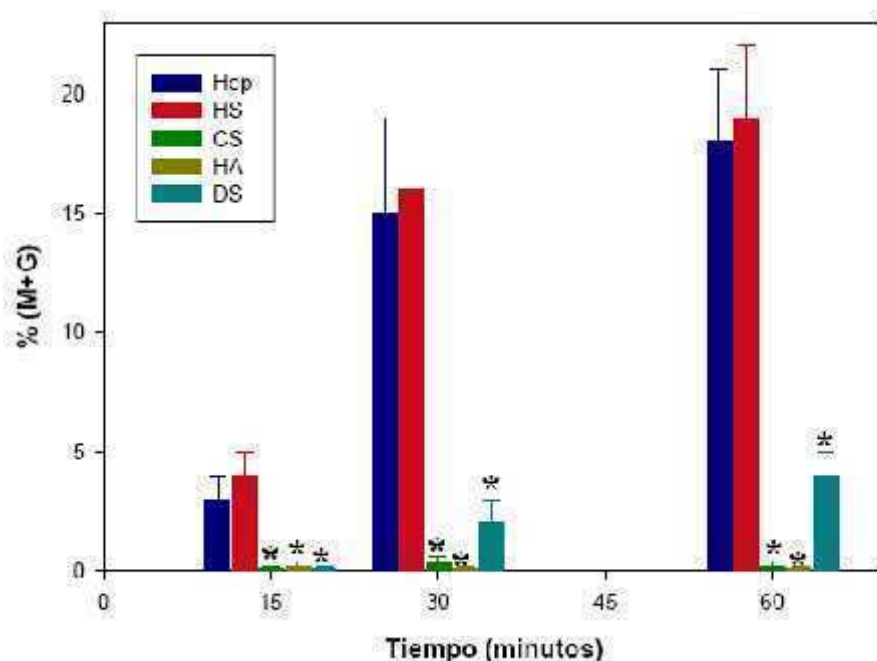


Figura 14: Porcentaje de descondensación de espermatozoides incubados con Heparina (Hep), Heparán sulfato (HS), Condroitín Sulfato (CS), Acido Hialurónico (HA) y Dermatán Sulfato (DS) en función del tiempo de incubación. Extraído de Tesis Doctoral de Marina Romanato (FCEyN, UBA; 2009), con su autorización.

El hecho que el heparán sulfato mostrara actividad descondensante similar a la heparina a pesar de estar menos sulfatado y poseer menor carga negativa, refuerza la idea que la actividad biológica está vinculada a la estructura de la molécula, más que a su carga negativa neta.

Estos experimentos y otros que aquí no se han detallado llevaron a nuestro laboratorio a proponer que el HS estaría funcionando como aceptor de protaminas durante la descondensación del espermatozoide humano *in vivo*.

Cabe señalar en este punto que, si bien no se ha especificado, todos los experimentos de descondensación realizados en nuestro laboratorio que se han mencionado hasta aquí, se llevaron a cabo en presencia de GSH, ya que como se dijera previamente, este tiorreductor es necesario para la descondensación nuclear espermática *in vivo*. Para ello contamos con un modelo de descondensación *in vitro* en presencia de heparina y GSH, modificado de Reyes y *col.* (1989), en el que se incuban los espermatozoides o núcleos espermáticos aislados con los agentes descondensantes y luego se determina el porcentaje de espermatozoides descondensados mediante observación al microscopio con contraste de fase (Romanato y *col.*, 2003; Romanato y *col.*, 2005).

Estudios de inmunocitoquímica, utilizando un anticuerpo anti heparán sulfato, también llevados a cabo en nuestro laboratorio, permitieron demostrar la presencia del GAG en el ooplasma de ovocitos maduros de ratón (Figura 15) y humanos (Figura 16), como así también en el espacio perivitelino y en células del cúmulus (Romanato y *col.*, 2008; Julianelli y *col.*, 2011).

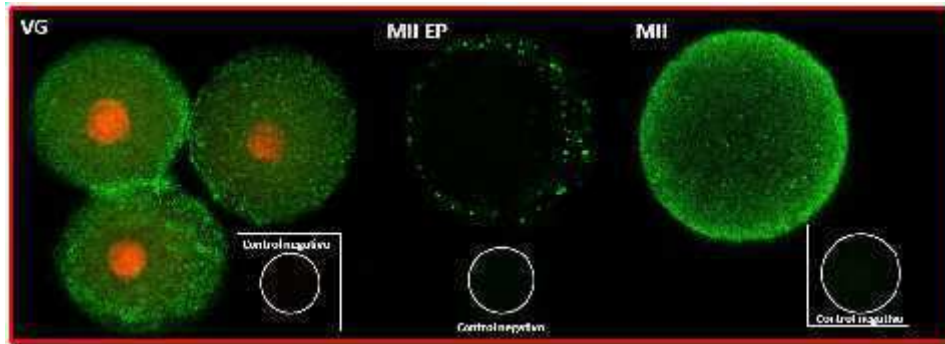


Figura 15: Inmunocitoquímica realizada a vesícula germinal (VG) y ovocitos en metafase II de ratón (MII), utilizando anticuerpo específico anti-heparán sulfato (HS). Se observa marca positiva en el ooplasma de VG y MII, así como también en el espacio perivitelino (MII EP) (Romanato y *col.*, 2008).

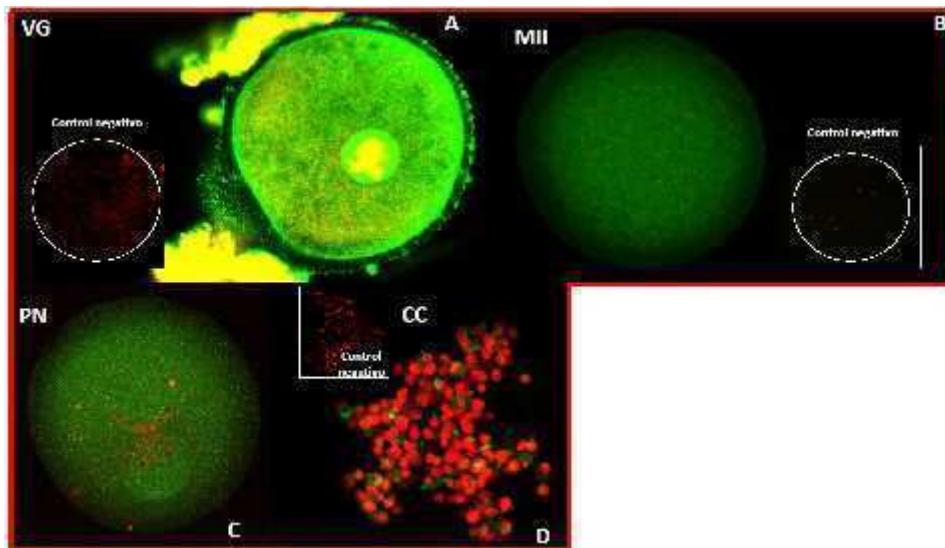


Figura 16: Inmunocitoquímica realizada a vesícula germinal (VG), ovocitos en metafase II humanos (MII), ovocito pronucleado (PN) y células del cúmulus (CC) utilizando anticuerpo específico anti-heparán sulfato (HS). Se observa marca positiva en todos los casos (Julianelli y *col.*, 2011).

Finalmente, se comprobó que los ovocitos frescos de ratón son capaces de descondensar espermatozoides humanos *in vitro* y que esta capacidad disminuye significativamente

cuando se trata a los ovocitos con heparinasa (que degrada específicamente heparina y heparán sulfato), pero no con otras glicosidasas tales como hiarulonidasa y condroitinasa ABC (que degradan ácido hialurónico y dermatán o condroitín sulfato, respectivamente) (Romanato y *col.*, 2008) reforzando nuestra hipótesis de trabajo acerca de la participación del HS como agente descondensante de la cromatina del espermatozoide humano *in vivo* (Figura 17).

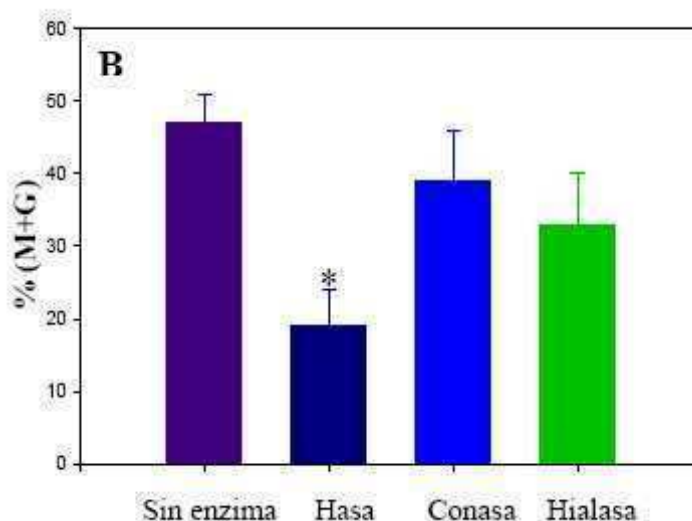


Figura 17: Porcentaje de descondensación de espermatozoides humanos al ser tratados con extractos ovocitarios de ratón incubados previamente con Heparinasa (Hasa), Condroitinasa (Conasa) y Hialuronidasa (Hialasa). Extraído de la Tesis Doctoral de Marina Romanato (FCEyN, UBA, 2009), con su autorización.

Entonces, de acuerdo con la evidencia acumulada en nuestro laboratorio, aceptamos que es altamente probable que el HS sea el responsable del intercambio de protaminas por histonas ovocitarias durante el proceso de descondensación de la cromatina espermática en el espermatozoide humano *in vivo*. Pero queda sin responder aún cómo es el mecanismo mediante el cual el HS participa en este proceso y de qué manera interactúa con el GSH y las protaminas para lograr una eficaz remoción de las mismas del ADN espermático *in vivo*.

Tan importante como el balance energético, medido por las concentraciones relativas de ATP y ADP/AMP, es el estado redox de la célula. Este último es importante para muchos procesos biológicos y está fundamentalmente regulado por la relación GSH-GSSG. El

GSH reduce los puentes disulfuro formados por las cisteínas dentro de las proteínas, actuando como donador de electrones. *In vivo*, en la regulación de la acción tiorredutora del GSH podrían estar involucradas tiorredoxinas como transportadores electrónicos e intermediarios entre este tiorreductor y la proteína a ser tiorreducida, constituyendo verdaderas cadenas de transporte de electrones (Holmgren, 1989). Dado que la existencia de tiorredoxinas tanto en el ovocito como en el espermatozoide (Salz y *col.*, 1994; Miranda- Vizueté y *col.*, 2001; Anahory y *col.*, 2002; Jiménez y *col.*, 2002; Jiménez y *col.*, 2005; Sutovsky y Lovercamp, 2010) ha sido ampliamente demostrada, no puede descartarse que estén involucradas en el mecanismo de descondensación de la cromatina espermática.

La vida en sí misma, representa un estado de oxidación agresivo al procesar los alimentos ingeridos para obtener la energía encerrada en los mismos. Los diversos caminos metabólicos pueden agruparse en oxidativos o catabólicos y reductivos o anabólicos. Siendo estas reacciones de óxido-reducción, imprescindibles para la vida, pueden también ser fuentes de enfermedades si se pierde el delicado balance entre los agentes oxidantes y reductores, a favor de los prooxidantes (como ocurre al generarse radicales libres, RL). Así aparece lo que se conoce como estrés oxidativo.

La célula (y por lo tanto el organismo) se defiende utilizando sistemas enzimáticos antioxidantes, tales como la catalasa (en peroxisomas) y la glutatión peroxidasa (GHX) (enzima dependiente de selenio, encontrada en mitocondria y citosol) que funcionan descomponiendo H_2O_2 y la superóxido dismutasa (SOD) (metaloenzima mitocondrial y citosólica) que descompone O_2 , siendo los sistemas más importantes.

Existe mucha evidencia demostrando que los mecanismos de señalización redox cumplen funciones importantes en la regulación celular y el control del crecimiento. Siendo el GSH el tiol de mayor peso molecular dentro de la célula, juega un papel esencial en el control del estado redox de los tioles celulares (Jones, 2002).

El sistema de tiorredoxina (Trx) y Trx reductasa complementan al sistema de GSH para mantener el balance redox tiol proteico/disulfuro (Holmgren, 1985). Trx es una proteína de bajo peso molecular, altamente conservada, con una dupla redox disulfuro/tiol en el sitio activo (Cys-Gly-Pro-Cys). Este sitio activo está adaptado para controlar la función proteica a través del estado redox de los grupos tioles catalíticos.

Como en este trabajo de Tesis Doctoral no investigaremos el papel del sistema de tiorredoxina, enfocaremos el estudio en la capacidad reductora del GSH y, por lo tanto la

compararemos con otro agente tiorreductor muy utilizado, *in vitro*, como es el 1,4-ditiotreitól (DL-DTT).

Como se aclarara anteriormente, el proceso de descondensación de la cromatina espermiática debe culminar con el intercambio entre protaminas e histonas ovocitarias, papel que cumpliría el heparán sulfato. Así como no hay, hasta el momento, una descripción exhaustiva del proceso redox involucrado en la descondensación, menos se conoce el paso de intercambio protaminas:histonas, la temporalidad de ambas etapas o los complejos involucrados durante este cambio tan importante, que deja a la cromatina espermiática en estado de pronúcleo.

Importancia clínica del estudio de la descondensación de cromatina espermiática

Con la aparición de la técnica de ICSI (inyección intracitoplasmática del espermatozoide) en el año 1992, se lograron superar *in vitro* las barreras naturales del ovocito y la imposibilidad del espermatozoide de penetrarlo. Sin embargo, y según todo lo expuesto, el proceso de fecundación no termina con la unión de las gametas. Una vez dentro, es imprescindible que el espermatozoide descondense la cromatina donde porta su material genético como primer paso para la producción exitosa de un embrión.

En la clínica, se observan numerosas fallas en procedimientos de reproducción asistida y en un altísimo porcentaje se observa la cabeza del espermatozoide intacta dentro del ovocito. Para estos casos, hasta el momento, no hay una respuesta formal, pero no es arriesgado suponer que los espermatozoides presenten fallas en la descondensación.

Es imprescindible conocer los factores espermiáticos y ovocitarios involucrados en la descondensación de la cromatina, las moléculas involucradas y los detalles del mecanismo. El conocimiento en detalle de este proceso podría aportar herramientas para dar respuesta y en el mejor de los casos, solución a parejas infértiles.

Dada la importancia del proceso de descondensación de la cromatina del espermatozoide durante la fecundación, y el desconocimiento en detalle del mecanismo, surge la siguiente hipótesis de trabajo de la que se desprenden los objetivos de esta Tesis Doctoral.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

El proceso de descondensación de la cromatina del espermatozoide es fundamental para permitir la relajación del material genético, la adquisición de capacidad transcripcional y la singamia. Para que esto ocurra, deben actuar en forma concertada un agente reductor y una molécula cuya relación carga:masa, como así también la disposición espacial de la carga permita la remoción y reemplazo de protaminas por las histonas ovocitarias. La interacción entre estas moléculas no se produce en forma secuencial como una sucesión simple de etapas en un camino metabólico, sino que requiere la cooperación entre ambas para conseguir una mejor eficacia.

Objetivos

Objetivo principal

Avanzar en el estudio del mecanismo del proceso de descondensación de la cromatina del espermatozoide humano *in vitro* en presencia de heparina (análogo estructural del heparán sulfato) y glutatión reducido y su extrapolación al mecanismo *in vivo* durante la fertilización.

Objetivos específicos

1. Estudiar el mecanismo de la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas durante la descondensación del espermatozoide humano *in vitro*, particularmente con respecto a la exclusividad del GSH como agente descondensante.
2. Estudiar la posible interacción entre heparina y GSH durante la descondensación del espermatozoide humano *in vitro*, con miras a evaluar la posibilidad de que ambos procesos ocurran simultánea y no sucesivamente *in vivo*.
3. Estudiar la remoción de las protaminas del núcleo espermático frente a la formación de un posible complejo heparán sulfato-protamina-ADN estabilizado que se generaría durante el proceso de descondensación.
4. Iniciar una aproximación a la clínica estudiando la descondensación de la cromatina espermática en muestras de pacientes que consultan por problemas de fertilidad.

Materiales y Métodos

1. Obtención de muestras de espermatozoides humanos

Los experimentos fueron llevados a cabo utilizando muestras de semen de donantes voluntarios normospermicos (WHO, 2010). Los resultados que se muestran en la discusión se obtuvieron utilizando muestras provenientes de clínica de fertilidad, CEGYR pertenecientes a pacientes que mostraron fallas de descondensación posterior al ICSI. En ambos casos con firma previa de consentimiento informado y confidencialidad de datos.

Las muestras fueron obtenidas por masturbación luego de 36-48 horas de abstinencia; se permitió la licuefacción y se procesaron dentro de la hora de recolección de las mismas. Se determinaron los siguientes parámetros seminales: volumen, viabilidad, motilidad y concentración de espermatozoides por ml.

Viabilidad: El porcentaje de espermatozoides vivos se determinó utilizando Eosina Y (colorante de exclusión). Una alícuota de 5 μ l de semen se mezcló con una alícuota de 5 μ l de colorante (0.5 mg / ml en PBS) y se homogeneizó cuidadosamente. Luego de 30 segundos se observó al microscopio (400 X) y se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos (no teñidos) sobre un total de 200 espermatozoides.

Motilidad: Se determinó el porcentaje y progresión de espermatozoides móviles. Para ello, se colocó una alícuota de semen (10 μ l) entre porta y cubreobjetos y se observó al microscopio de contraste de fase a 400 X. Se determinó el porcentaje de espermatozoides móviles sobre un total de 100 a 200 células evaluadas.

Concentración: La concentración de espermatozoides se determinó utilizando cámara de Neubauer (Figura 18). Para ello se realizó una dilución 1:20 de la muestra y se colocaron 10 μ l de la misma en la cámara. El número de espermatozoides se determinó mediante observación al microscopio de contraste de fase (Zeiss 47-30-11-9901) a 400x de aumento.

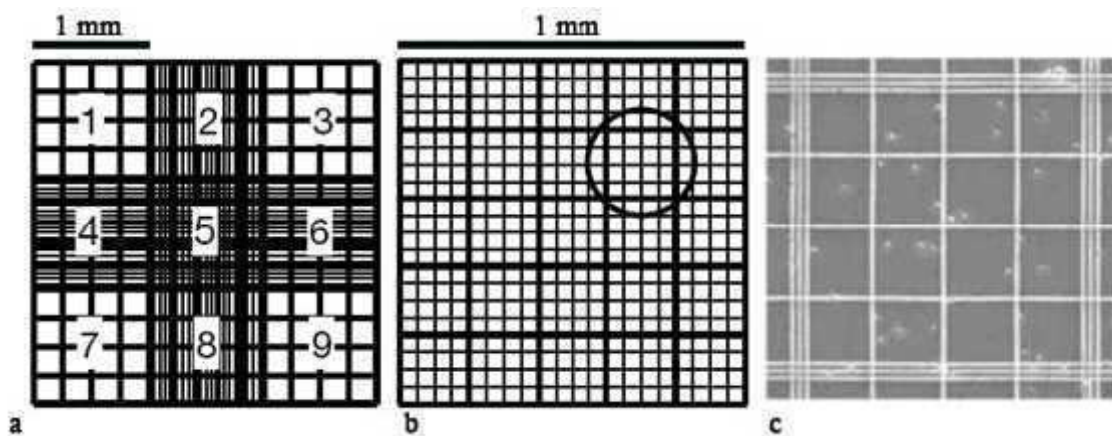


Figura 18: Esquema de la grilla de la cámara de Neubauer utilizada para evaluar la concentración de espermatozoides de una muestra. a) grilla completa, b) detalle del recuadro 5 y c) detalle que se observa a 400x de aumento.

Solo se utilizaron las muestras consideradas normales de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010):

Volumen $\geq 1,5$ ml

Viabilidad $> 58\%$

Motilidad $> 40\%$

Concentración $> 15 \times 10^6$ / ml

Cantidad total $> 39 \times 10^6$ /eyaculado

2. *Procesamiento de las muestras de semen*

Para remover el plasma seminal, las muestras de semen se lavaron por centrifugación a 300 xg durante 10 minutos en medio HTF (Human Tubal Fluid: KCl 4.6 mM; KH_2PO_4 0.37 mM; NaCl 90.7 mM; MgSO_4 1.3 mM; glucosa 2.78 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.6 mM; NaHCO_3 23.8 mM; piruvato de sodio 3.38 mM y lactato de sodio 80.2 mM) suplementado con 0.3% BSA (Albúmina Sérica Bovina). Se realizó un segundo lavado resuspendiendo en 1 ml de medio suplementado con 2.6% de BSA (HTF-26B) y el pellet final se resuspendió en HTF-26B (fracción de espermatozoides lavados).

3. *Obtención de fracción altamente móvil y capacitación espermática*

Para obtener la fracción de espermatozoides altamente móviles, se utilizó la técnica de “swim-up”. Una vez eliminado el plasma seminal, al pellet obtenido por centrifugación se le agregó gota a gota 1 ml de medio fresco HTF-26B y se permitió a los espermatozoides nadar hacia el medio fresco, incubándolos durante 90 minutos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire, en tubos inclinados a 45°. Al cabo de dicho tiempo se recuperó cuidadosamente el sobrenadante y se calculó la concentración de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides móviles, según la metodología descrita previamente (MM, sección1).

Para capacitarlos, se incubó esta fracción de espermatozoides móviles durante 18 horas en medio HTF-26B, a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y en una concentración de 5-10 x 10⁶ espermatozoides/ml.

4. *Obtención de núcleos aislados de espermatozoides*

Se aislaron núcleos de espermatozoides de acuerdo al siguiente protocolo, modificado a partir de de Yebra y Oliva (1993). El semen se lavó tres veces por centrifugación a 1620 xg, durante 10 minutos cada vez, en Tris-HCl 50 mM, pH 7.2 y NaCl 0.15 M (10 veces el volumen de la muestra).

El precipitado se resuspendió en 3 ml del mismo buffer conteniendo 1% SDS, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se sonicó 6 veces a 200 W durante 15 segundos cada vez, utilizando un sonicador Labsonic M (Sartorius Stedim Biotech).

Las células sonicadas se dividieron en ocho alícuotas; cada una se sembró sobre 1 ml de colchón de sacarosa 1.1 M en Tris-HCl 50 mM, pH 7.2 y se centrifugó a 3500 xg durante 1 hora. Los precipitados obtenidos de dicho colchón se recuperaron y lavaron dos veces a 1620 xg durante 10 minutos en Tris-HCl 50 mM, pH 7.2.

Tal como se comprobara previamente en nuestro laboratorio por medio de inmunocitoquímica de la fracción nuclear, utilizando anticuerpo monoclonal anti-acrosina (Romanato y col., 2005), esta metodología permite aislar núcleos sin contaminación con colas espermáticas. De todas formas, luego de cada procedimiento de aislamiento se

corroboró la ausencia de contaminación de la fracción nuclear con colas espermáticas por medio de la observación al microscopio de contraste de fase.

Los núcleos fueron utilizados en el momento y resuspendidos en el medio correspondiente según el experimento, o se mantuvieron a 4°C en Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.4 hasta su utilización.

5. *Ensayo de descondensación estándar*

Espermatozoides lavados, seleccionados por “*swim-up*” y capacitados, o núcleos espermáticos aislados se descondensaron según la técnica original descrita por Reyes y *col.* (1989) y modificada por Romanato y *col.* (2003). Brevemente, 3-5 x 10⁶ espermatozoides o núcleos fueron incubados en medio HTF-26B con heparina 46 µM (Grado I-A: de mucosa intestinal porcina, Sigma Cat N° H-3393) y glutatión reducido 10 mM (GSH: γ-Glu-Cys-Gly; Sigma Cat.N° G-4251) en un volumen final de 0.3 ml, durante una hora en el caso de espermatozoides enteros o 30 minutos en el caso de núcleos, a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire. Los controles negativos de descondensación fueron incubados con HTF-26B (sin tratamiento), heparina solamente o glutatión solamente.

Cumplido el tiempo de incubación, se fijaron alícuotas de 20 µl con igual volumen de glutaraldehído al 2.5% en PBS. Se determinó por observación al microscopio con contraste de fase (Zeiss 47-30-11-9901) a 400x de aumento, el porcentaje de espermatozoides o núcleos espermáticos descondensados, utilizando el criterio descrito previamente (Bedford y *col.*, 1973; Romanato y *col.*, 2003; Romanato y *col.*, 2005). De acuerdo con el mismo, los espermatozoides o núcleos espermáticos son clasificados según su refringencia, aspecto granuloso y tamaño del núcleo en tres categorías: sin cambios (**S**), moderadamente descondensados (**M**), o groseramente descondensados (**G**).

Los espermatozoides o núcleos **S** son refringentes y su núcleo es de tamaño normal, los **M** no tienen mucha refringencia, son oscuros y están ligeramente agrandados, los **G** tienen el núcleo agrandado, granular, color gris y a veces translúcido (Figura 19).

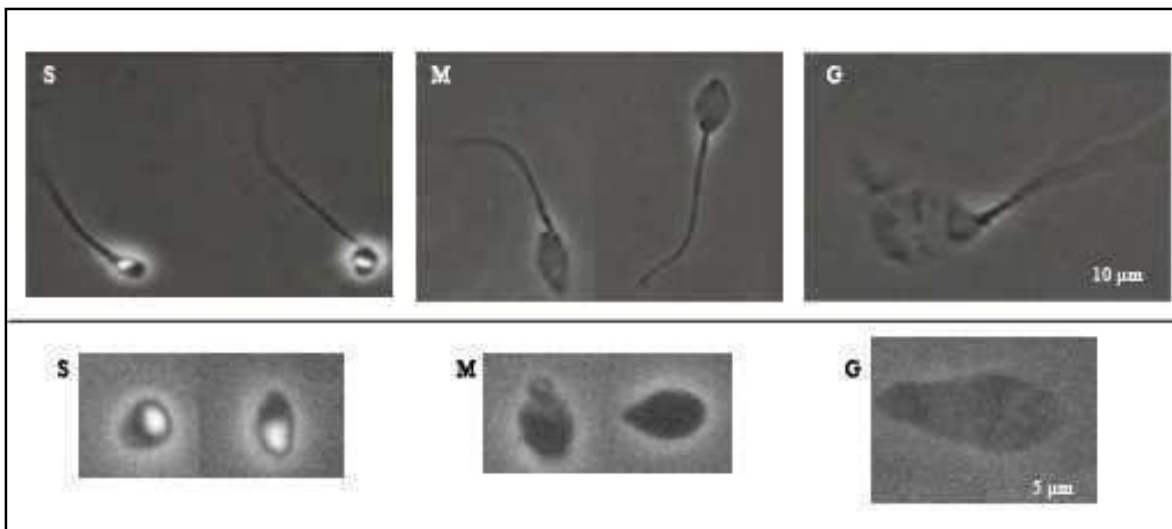


Figura 19. En el panel superior se observan espermatozoides en contraste de fase en diferentes estadios de descondensación sin descondensar (S), moderadamente descondensados (M) y groseramente descondensados (G). En el panel inferior se observan núcleos en contraste de fase en estadios S, M y G de descondensación.

El porcentaje de espermatozoides o núcleos espermáticos descondensados fue calculado como la suma de los moderada y groseramente descondensados (**M+G**) porque se considera que si empezaron a descondensar (M), tienen la capacidad de hacerlo y si se mantiene la incubación seguirán su curso hasta descondensarse por completo (G). Todos los experimentos se realizaron por duplicado y se evaluaron al menos 200 células o núcleos en cada condición.

6. Comparación del efecto en la descondensación de espermatozoides lavados y núcleos espermáticos aislados de dos agentes reductores de los puentes disulfuro: GSH y DTT

Para ahondar en el mecanismo por el cual el GSH participa en la descondensación nuclear de espermatozoides, se comparó el efecto del mismo con el de otro agente

reductor de puentes disulfuro. Para tal fin se eligió 1,4-ditiotreititol (DL-DTT, Cleland's Reagent, Sigma Cat # D-9163).

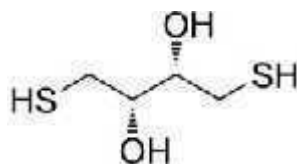


Figura 20: Estructura química del Ditiotreititol (DTT), agente utilizado para producir descondensación de espermatozoides *in vitro*.

El porcentaje de descondensación producido por diferentes concentraciones de DTT (10 mM, 1 mM, 0.5 mM y 0.1 mM) junto con heparina 46 μ M, fue evaluado en espermatozoides enteros y en núcleos aislados con el objeto de determinar la concentración óptima de DTT que se utilizaría en los experimentos subsiguientes.

Luego, la comparación de los agentes tiorreductores se realizó utilizando dos alícuotas de una misma muestra de semen, incubadas con heparina 46 μ M junto con GSH 10 mM o la adecuada concentración de DTT (1 mM para espermatozoides enteros y 0.1 mM para núcleos aislados), manteniendo las demás condiciones del ensayo de descondensación estándar (MM, sección 5). El porcentaje de descondensación se calculó de la forma indicada en la misma sección.

7. Efecto del uso secuencial de agente reductor de puentes disulfuro y aceptor de protaminas en la descondensación de espermatozoides lavados y núcleos espermáticos aislados.

Espermatozoides incubados en condiciones capacitantes (MM, sección 3) o núcleos aislados de espermatozoides (MM, sección 4), fueron lavados por centrifugación y resuspendidos en medio HTF-26B.

Alícuotas de espermatozoides o núcleos fueron incubados con heparina 46 μ M y GSH 10 mM o DTT (1 mM para espermatozoides, 0.1 mM para núcleos) a 37°C. Los agentes descondensantes fueron agregados simultáneamente durante 60 minutos o en forma sucesiva durante 30 minutos cada uno (primero heparina sola, seguido de GSH solo y

viceversa). Tanto las células como los núcleos fueron lavados, entre incubaciones, por centrifugación a 2000 xg durante 3 minutos con medio HTF-26B. Cumplido el tiempo final de incubación, fueron fijados y se determinó el porcentaje de descondensación de la forma habitual (MM, sección 5).

8. Efecto del tiempo de exposición al tiorreductor

Espermatozoides lavados resuspendidos en medio HTF-26B se incubaron en presencia de GSH 10 mM o DTT 1 mM durante 10, 20 o 30 minutos a 37°C. Luego se centrifugó 3 minutos a 4600 rpm, se lavó con medio HTF-BSA y se centrifugó nuevamente. Se agregó heparina 46 µM y se incubó durante 30 minutos más.

Espermatozoides lavados resuspendidos en medio HTF-26B, incubados con GSH 10 mM o DTT 1mM y Heparina 46 µM durante 60 minutos a 37 °C fueron utilizados como control.

Cumplido el tiempo final de incubación, fueron fijados y se determinó el porcentaje de descondensación de la forma habitual (MM, sección 5).

9. Determinación del estado de tiorreducción de las protaminas espermáticas.

i) Método indirecto: Tinción con Naranja de Acridina (NA)

Con el objeto de estudiar el efecto de la interacción entre la heparina y el agente reductor de los puentes disulfuro en la tiorreducción *per se*, se evaluó el estado de tiorreducción de la cromatina de espermatozoides humanos utilizando naranja de acridina en base a la técnica introducida por Tejada y *col.* (1984).

Brevemente, núcleos de espermatozoides aislados de acuerdo al protocolo descrito en la sección 4, fueron incubados con heparina, GSH, DTT, o cada tiorreductor junto con heparina en condiciones estándar de descondensación.

Una vez cumplido el tiempo de descondensación, fueron lavados con HTF, centrifugados a 800 xg durante 10 minutos y resuspendidos en HTF a una concentración final de 20-50 x 10⁶ núcleos/ml. Alícuotas de 10 µl fueron extendidas en portaobjetos, secadas al aire y

fijadas durante toda la noche (“overnight”) en solución de Carnoy preparada en el momento (metanol/acido acético glacial 3:1). Se retiraron los portaobjetos de la jarra Coplin con solución fijadora y se dejaron secar unos minutos antes de teñir.

La solución de tñido de Naranja de Acridina (NA) fue preparada en el momento agregando 10 ml de solución stock de NA (1 g/l en agua destilada) a 40 ml de ácido cítrico 0.1 M y 2.5 ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 M, alcanzando una concentración final de NA de 0.19 mg/ml y se ajustó el pH a 2.5 (Tejada y *col.*, 1984).

Todas las soluciones fueron mantenidas a temperatura ambiente. Los preparados fueron cubiertos con la solución de naranja de acridina, mantenidos en oscuridad por 5 minutos a temperatura ambiente y luego enjuagados suavemente con agua desionizada.

Los preparados fueron sellados con cubreobjetos y se analizó la fluorescencia en microscopio confocal (Nikon C1) utilizando un filtro de excitación de 490 nm y un filtro de emisión de barrera de 530 nm.

Dado que todos los núcleos luego de la tñición con naranja de acridina emiten fluorescencia tanto roja como verde, la cantidad de coloración roja y verde presente en cada núcleo se cuantificó utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) y se la expresó en unidades arbitrarias (UA). Todos los tratamientos se realizaron por duplicado y se cuantificaron al menos 200 núcleos de cada condición experimental.

La tñición con naranja de acridina realizada de esta forma, luego de la exposición a una solución desnaturalizante (Carnoy), puede ser usada como indicador del estado de tiorreducción de la cromatina del espermatozoide (Kosower y *col.*, 1992).

El reactivo naranja de acridina se une al ADN emitiendo fluorescencia verde o roja con el ADN doble o simple cadena, respectivamente. Al utilizarla en núcleos espermáticos sometidos previamente a una desnaturalización ácida del ADN, esta tñición puede aportar información acerca del estado de tiorreducción de las protaminas en la cromatina del espermatozoide. Las protaminas que se encuentren reducidas permitirán que la cromatina se desnaturalice fácilmente al ser tratadas con solución de Carnoy. De esta forma, el ADN de los núcleos se encontrará en forma de simple cadena y emitirá fluorescencia roja al ser tñido con NA.

En cambio, las protaminas que contengan sus puentes disulfuro intactos, proporcionaran mayor resistencia a la cromatina frente a la desnaturalización con solución de Carnoy, el ADN permanecerá doble cadena y emitirá fluorescencia verde. El siguiente esquema resume el fundamento de la utilización de esta técnica (Figura 21).

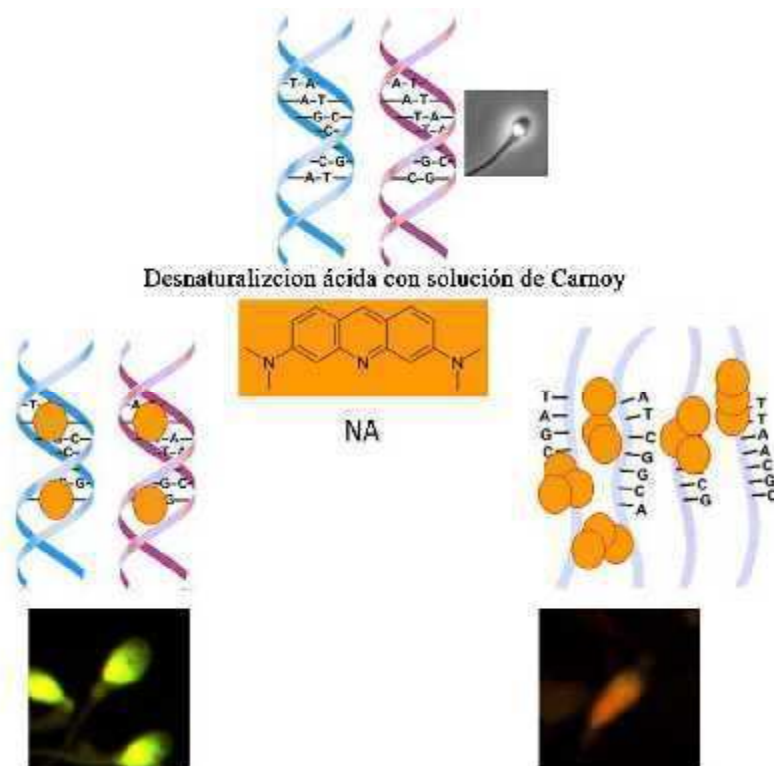
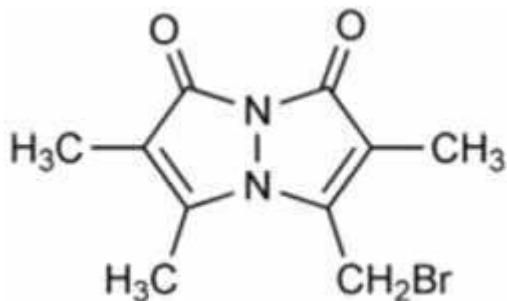


Figura 21. Fundamento de la tinción con naranja de acridina NA, adaptado de Tejada y col., 1984. El espermatozoide se somete a una desnaturalización ácida y luego se tiñe con NA. El ADN que se encuentre más empaquetado debido a puentes SS de las protaminas intactos, será más resistente a la desnaturalización y emitirá fluorescencia verde, mientras que el ADN empaquetado menos fuertemente debido a la reducción de los puentes disulfuro, estará más expuesto a la NA y emitirá fluorescencia naranja.

ii) Marcación directa de los grupos tiol con monobromobimane.

Con el objeto de evaluar la cantidad de tioles libres en las protaminas, núcleos aislados de espermatozoides (MM, sección 4) fueron teñidos con el reactivo tiólico monobromobimane (Kosower y col., 1979; Kosower y Kosower, 1987; Shalgi y col., 1989; Rufas y col., 1991).



El monobromobimane es una sonda fluorescente reactiva a tioles utilizada para la determinación del estado redox de tioles proteicos en sistemas biológicos. La derivatización *in situ* basada en monobromobimane resulta en la máxima recuperación de tioles libres, tanto de bajo peso molecular como los proteicos accesibles al monobromo. Al unirse a los tioles libres, el monobromobimane emite fluorescencia de color azul.

Brevemente, los núcleos fueron incubados con GSH o DTT durante 30 minutos y en los últimos 5, 15 o 30 minutos se agregó heparina en condiciones de descondensación estándar (MM, sección 5). Los controles se llevaron a cabo realizando incubaciones con heparina, GSH y DTT solos durante los 30 minutos de incubación. Luego los núcleos fueron centrifugados a 800 xg durante 10 minutos, lavados y resuspendidos en PBS hasta alcanzar una concentración final de $4-8 \times 10^6$ células/ml. Alícuotas (10 μ l) de los mismos fueron colocadas sobre portaobjetos, secadas al aire e incubadas con el reactivo tiólico monobromobimane (mBBBr; Sigma Cat N° 69898). Se preparó en el día una solución de mBBBr 0.5 mM en PBS, a partir de un stock 50 mM en acetonitrilo (Shalgi y *col.*, 1989), y se agregó a los preparados que se mantuvieron en oscuridad por 10 minutos a temperatura ambiente.

Los preparados incubados con mBBBr fueron lavados dos veces con PBS, montados en el mismo medio, sellados con cubreobjetos y examinados en microscopio de fluorescencia (Zeiss 426126) usando un filtro de excitación de 340-380 nm y un filtro de emisión mayor a 450 nm. La intensidad de fluorescencia de cada célula fue cuantificada en unidades arbitrarias (UA) utilizando la función RGB del software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Se realizaron duplicados de los tratamientos y se cuantificaron al menos 200 núcleos en cada condición experimental.

En todos los tratamientos se reservaron alícuotas de núcleos no teñidos que fueron fijadas para evaluar el porcentaje de descondensación (MM, sección 5).

10. Detección de la presencia de protaminas en los sobrenadantes de descondensación

Durante la descondensación de la cromatina, las protaminas son removidas del núcleo espermático para ser reemplazadas por las histonas ovocitarias. *In vitro*, estas protaminas que abandonan el núcleo del espermatozoide, deberían permanecer en el sobrenadante de incubación.

La técnica de Dot blot permite detectar, analizar e identificar proteínas, de forma similar al Western Blot, pero sin necesidad de separar las muestras de proteínas por electroforesis, sino que las mismas se colocan en plantillas circulares directamente sobre la membrana de nitrocelulosa. Se utilizó esta técnica con el objeto de determinar la presencia del complejo protaminas-ADN en los sobrenadantes o precipitados de la descondensación *in vitro*.

Núcleos espermáticos fueron incubados con GSH o DTT durante 30 minutos y en los últimos 5, 15 o 30 minutos se agregó heparina en condiciones de descondensación estándar (MM, sección 5). Los controles se llevaron a cabo realizando incubaciones con HTF, heparina, GSH o DTT solos durante los 30 minutos de incubación. Luego de cumplidos 30 minutos de incubación, se centrifugaron a 8000 xg durante 1 minuto y se recuperaron los sobrenadantes.

Se colocó la membrana de nitrocelulosa de 0,20 μm de poro (Amersham Hybond ECL) sobre el dispositivo para Dot blot (Bio-Dot Apparatus, cat. N° 170-6545) (Figura 22), delimitando las regiones donde se colocarían las gotas de sobrenadantes procedentes de los distintos tratamientos experimentales.



Figura 22. Dispositivo utilizado para análisis por Dot blot

Se cerró el dispositivo y se colocaron cuidadosamente gotas de 100 μ l de muestra en el centro de cada grilla minimizando el área de penetración de la solución a 3 o 4 mm de diámetro. Se adsorbieron por medio de vacío las gotas a la membrana y se las dejó secar.

Se bloquearon los sitios de unión inespecífica del anticuerpo con BSA al 5% en TBS-T (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.05%, pH 7.5) durante 1 hora, a temperatura ambiente, manteniendo la membrana en cámara húmeda. Se incubó con los anticuerpos monoclonales anti protaminas P1 y P2 humanas, MAb-001 Hup 1N y MAb-002 Hup 2B (SHAL Technologies), respectivamente, diluidos 1:300 en BSA/TBS-T (BSA al 0.1% en TBS-T) durante 30 minutos a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Se lavó tres veces durante 5 minutos con TBS-T. Se incubó con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Goat Anti-Mouse IgG HRP, R&D Systems) diluido 1:1000 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con TBS-T durante 15 minutos y dos veces más durante 5 minutos. Luego se lavó una vez con TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) durante 5 minutos. Se incubó con reactivo ECL (Amersham ECL, Prime Western Blotting Detection Reagent) durante 1 minuto, cubierto con Parafilm en oscuridad y se analizó por medio del G: BOX Chemi system (SYNGENE).

La detección por quimioluminiscencia es un método que requiere que el segundo anticuerpo esté unido a una enzima (en este caso peroxidasa). Luego se incubó la membrana con un sustrato (ECL) en presencia de luminol y peróxido de hidrógeno. La peroxidasa cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno, que emitirá luminiscencia. La luz emitida (proporcional a la cantidad de peroxidasa, es decir de

anticuerpo primario presente) es captada por el aparato GBox que analiza la imagen a distintos tiempos.

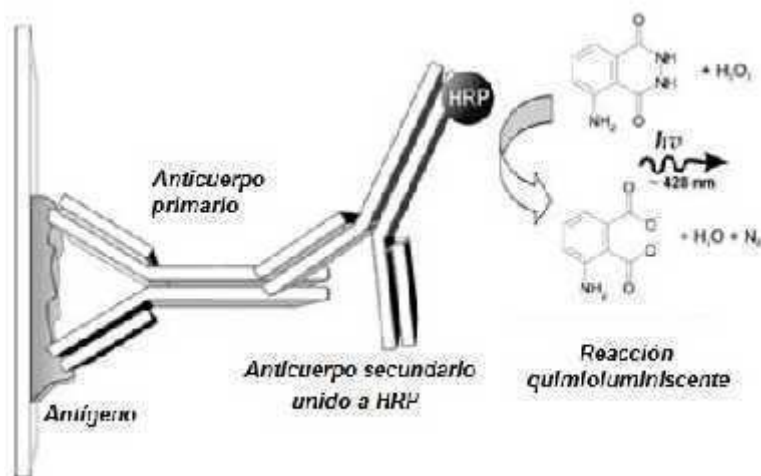


Figura 23. Esquema que resume la detección del anticuerpo primario por medio de quimioluminiscencia. Se utiliza un anticuerpo secundario asociado a peroxidasa (HRP) y se detecta por medio de sustrato ECL y una reacción que emite luz a determinada longitud de onda.

11. Microscopía electrónica

Luego de realizar el ensayo de descondensación estándar a espermatozoides y núcleos aislados (MM, sección 5), se diluyó en una proporción 1:4 cada tratamiento (heparina, GSH y heparina+GSH) en buffer fosfato 0,1M (pH 7,4) a temperatura ambiente y se mezcló hasta homogeneizar.

Cada tratamiento fue transferido a tubos cónicos y centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos. El pellet obtenido fue cuidadosamente fijado agregando glutaraldehído al 3% en buffer fosfato, a 4°C, dejándolo deslizar sobre la pared del tubo. Esta fijación se mantiene “overnight” y se entrega al técnico que realizará la inclusión y cortes para la microscopía. Brevemente, la misma consiste en una fijación con tetróxido de osmio, deshidratación con concentraciones crecientes de etanol en frío y enjuagado con óxido de propileno a temperatura ambiente. Se arma, luego, el taco con diferentes mezclas de resinas y se realizan cortes con ultra micrótopo utilizando una cuchilla de diamante.

Los cortes son analizados en el microscopio electrónico Zeiss EM 109T (Figura 24). La fijación y cortes fueron realizados por el MSc Cristian Alvarez Sedó y analizadas en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios de Microscopía Electrónica (LANAIS-MIE) del Instituto de Biología Celular y Neurociencia Prof. E. De Robertis, UBA-CONICET.



Figura 24 Microscopio Electrónico Zeiss EM 109T

12. Análisis estadístico

El análisis comparativo entre la descondensación obtenida con las diferentes concentraciones de agentes descondensantes (curva de concentración de heparina, distintas concentraciones de DTT), tanto en espermatozoides como en núcleos aislados, fue realizado utilizando análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido por el test de Tukey-Kramer.

La comparación entre el uso simultáneo y secuencial de los agentes tiorreductores y el aceptor de protaminas en la descondensación, fue realizada usando análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido por el Test de Comparaciones Múltiples de Student-Newman-Keuls.

La comparación del efecto del tiempo de incubación con el agente tiorreductor sobre la descondensación fue llevada a cabo utilizando análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido por el test de Tukey-Kramer.

El efecto de la heparina sobre la actividad tiorreductora del DTT y del GSH, medida como la intensidad de fluorescencia de cada núcleo luego de la tinción con monobromobimane, fue evaluada mediante análisis de varianza de mediciones repetidas (ANOVA) seguida por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni para GSH y Tukey para DTT.

En todos los casos, las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0.05$.

Resultados

Capítulo 1: Ensayo de descondensación de espermatozoides “in vitro”

Concentración de heparina

Las condiciones del ensayo de descondensación estándar utilizadas a lo largo de la presente tesis serán 46 μM de heparina y 10 mM de GSH, según lo establecido por Romanato y *col* (2003).

La concentración de GSH utilizada es la encontrada en el ovocito en el período periovulatorio (Perreault y *col.*, 1988) y la concentración de heparina elegida surgió de los resultados obtenidos al realizar una curva de descondensación de espermatozoides en función de la concentración de heparina, en presencia de 10 mM GSH (Figura 25).

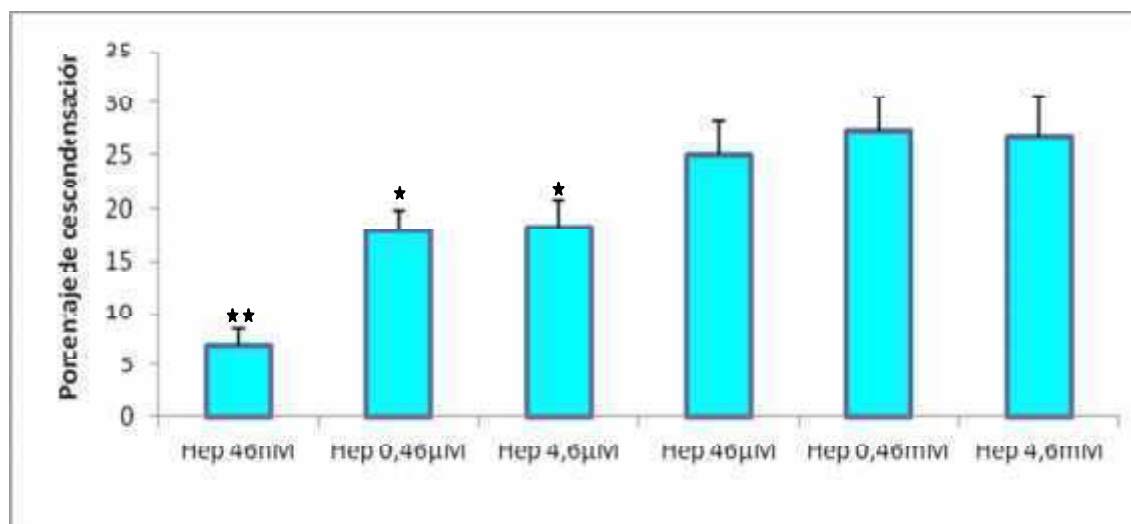


Figura 25. Porcentaje de descondensación de espermatozoides en función de la dosis de heparina presente en la incubación junto con 10 mM GSH. La incubación se realizó a 37°C durante 1 hora (n = 5 ANOVA + Tukey, *p<0.05, **p<0.01 comparado con 46 μM).

Puede observarse claramente que el porcentaje de descondensación obtenido alcanzó un “plateau” de 25% de espermatozoides descondensados a partir de una concentración

46 μ M de heparina. Menores concentraciones de heparina produjeron valores de descondensación significativamente menores ($n = 5$ ANOVA + Tukey, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ comparado con 46 μ M).

En consecuencia, se estableció como concentración óptima para el ensayo de descondensación estándar, 46 μ M de heparina y 10mM GSH.

Concentración de DTT

Como aproximación al estudio del comportamiento del GSH en la descondensación de la cromatina, se comparó su actividad como tiorreductor con la de otro agente reductor de los puentes disulfuro como el DTT.

En primer lugar, se evaluó el efecto de la concentración de DTT sobre la descondensación de espermatozoides y núcleos espermáticos aislados con el objeto de encontrar una concentración de DTT que permitiera obtener un nivel de descondensación semejante al obtenido con la concentración estándar de GSH, 10 mM.

La figura 26 muestra el porcentaje de descondensación encontrado en espermatozoides lavados utilizando diferentes concentraciones de DTT como agente tiorreductor en presencia de heparina 46 μ M (concentración estándar). Cabe aclarar que en la figura no aparece la barra de 10 mM DTT, que fue la máxima concentración analizada y corresponde a la concentración estándar de GSH, pues se observó que la misma afectaba severamente la integridad del espermatozoide y, por lo tanto no permitía cuantificar la descondensación en la forma habitual.

Los resultados se expresaron como el porcentaje de descondensación nuclear relativa a la descondensación alcanzada con heparina 46 μ M y GSH 10 mM (% Desc Rel), como condiciones estándar de descondensación.

En la figura se observa claramente que una concentración 1 mM de DTT tuvo una actividad descondensante similar a la producida por el GSH 10 mM (93 ± 13 % Desc Rel), mientras que con DTT 0.1mM los valores de descondensación fueron casi nulos: 3 ± 1 % Desc Rel ($n = 3$, ANOVA + Tukey-Kramer, $p < 0.001$).

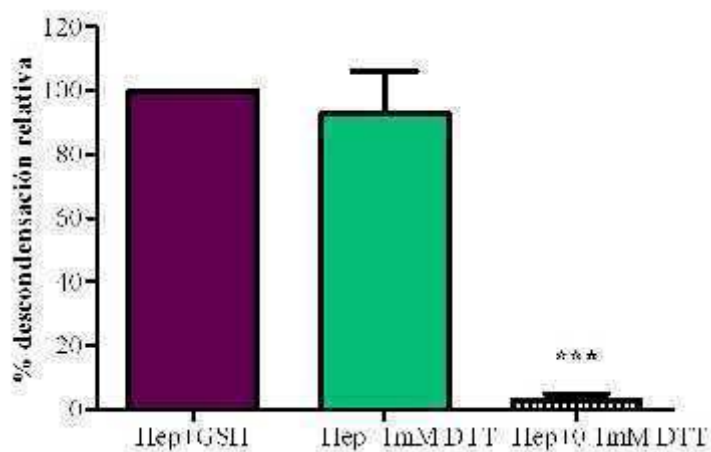


Figura 26. Porcentaje de descondensación relativa (% Desc Rel) de espermatozoides humanos en presencia de 46 μ M Heparina y DTT 1mM y 0.1 mM. La incubación se realizó a 37°C durante 1 hora (n= 3, ANOVA + Tukey-Kramer, $p < 0.001$).

Cuando se utilizaron núcleos espermáticos aislados, la concentración 0.1 mM de DTT fue suficiente para producir la misma descondensación (89 ± 6 % Desc Rel) (n= 3 ANOVA + Tukey-Kramer, NS) que la mezcla estándar de heparina 46 μ M y GSH 10 mM (Figura 27), mientras que las concentraciones mayores de DTT estudiadas (1 mM y 0.5 mM) produjeron una pérdida total de la integridad del núcleo espermático.

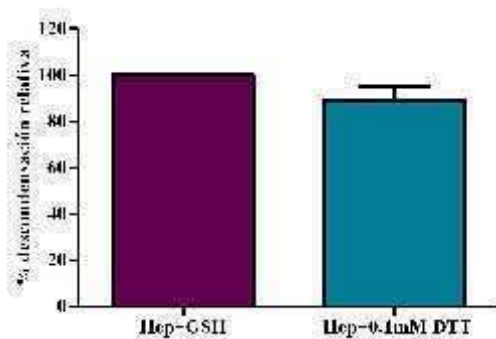


Figura 27. Porcentaje de descondensación relativa (% Desc Rel) de núcleos espermáticos aislados incubados en presencia de 46 μ M Heparina y GSH 10 mM o DTT 0,1 mM. La incubación se realizó a 37°C durante 30 minutos (n= 3, ANOVA + Tukey-Kramer, NS).

En consecuencia, la concentración de DTT elegida para los experimentos subsiguientes fue de 1 mM al utilizar espermatozoides enteros y 0,1 mM al utilizar núcleos espermáticos aislados, siempre en presencia de heparina 46 μ M.

Capítulo 2: Efecto del uso secuencial de tiorreductor y aceptor de protaminas en la descondensación de espermatozoides lavados y núcleos espermáticos aislados

Para estudiar la posible interacción entre la molécula aceptora de protaminas (heparina) y el agente tiorreductor (GSH o DTT) durante el proceso de descondensación, se utilizaron ambos agentes en forma secuencial y se comparó el porcentaje de descondensación obtenido con el correspondiente al de ambos reactivos agregados en forma conjunta, tanto en espermatozoides enteros como en núcleos espermáticos aislados.

GSH como tiorreductor

En espermatozoides lavados

En la figura 28 se puede observar que al incubar espermatozoides con heparina y glutatión en forma conjunta, se obtuvo un $46 \pm 8\%$ de descondensación. Sin embargo, al hacerlo primero con heparina y luego con GSH, se produjo una disminución significativa de los niveles de descondensación a $27 \pm 6\%$. Al invertir el orden e incubar los espermatozoides primero con GSH, también disminuyó significativamente el porcentaje de descondensación a $19 \pm 7\%$ ($n=4$, ANOVA + Test de Comparaciones Múltiples Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$).

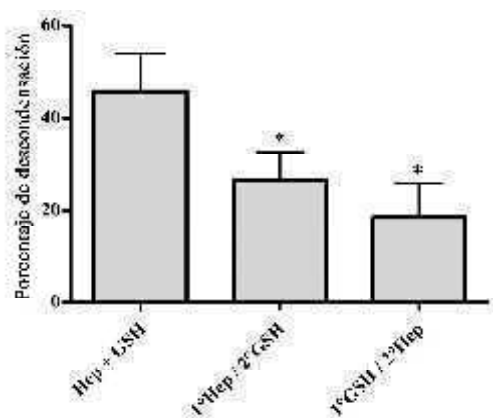


Figura 28. Porcentaje de descondensación de espermatozoides al incubar con heparina y GSH en forma conjunta durante 60 minutos (Hep+GSH), heparina durante 30 minutos y luego GSH durante 30 minutos (1°Hep/2°GSH), o GSH durante 30 minutos y luego heparina durante 30 minutos (1°GSH/2°Hep). En todos los casos la incubación fue realizada a 37°C (n=4, ANOVA + Test de Comparaciones Múltiples Student-Newman-Keuls, p<0.05).

En núcleos espermáticos aislados

En la figura 29 se observa que al incubar núcleos espermáticos aislados con heparina y GSH en forma conjunta, se alcanzó una descondensación del $47 \pm 5\%$. Al hacerlo con heparina primero y luego GSH, el porcentaje de descondensación disminuyó significativamente al $10 \pm 3\%$. También disminuyó significativamente la descondensación al $17 \pm 4\%$ cuando se incubó con GSH primero (n=11, ANOVA + Test de Comparaciones Múltiples de Student-Newman-Keuls, p<0.001).

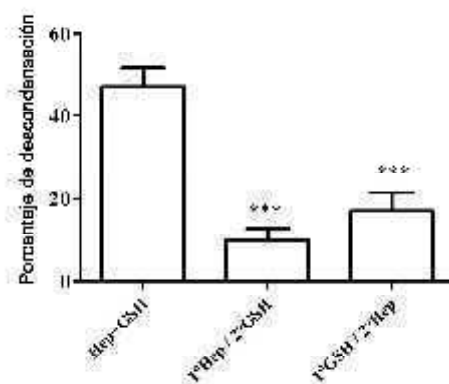


Figura 29. Porcentaje de descondensación de núcleos espermáticos aislados al incubar con heparina y GSH en forma conjunta durante 30 minutos (Hep+GSH), heparina durante 15 minutos y luego GSH durante 15 minutos (1°Hep/2°GSH), o GSH durante 15 minutos y luego heparina durante 15 minutos (1°GSH/2°Hep). En todos los casos la incubación fue realizada a 37°C. (n=11, ANOVA + Test de Comparaciones Múltiples de Student-Newman-Keuls, p<0.001).

Por lo tanto, la utilización en forma secuencial de heparina y glutatión disminuyó significativamente el porcentaje de descondensación alcanzado, de manera independiente del orden en el que fueran empleados. Esto se observó tanto en espermatozoides enteros (Figura 28) como en núcleos espermáticos aislados (Figura 29).

*DTT como tiorreductor**En espermatozoides enteros*

En la figura 30 se observa que la exposición de espermatozoides enteros a heparina y DTT simultáneamente, produjo un $19 \pm 5\%$ de descondensación. Al incubar con heparina primero y el agente tiorreductor después, el porcentaje fue significativamente menor: $12 \pm 2\%$ ($n=4$, ANOVA + Test de Comparaciones Múltiples de Student-Newman-Keuls, $p<0.05$). Sin embargo, al exponer los espermatozoides primero a DTT y luego a heparina, no se produjeron diferencias significativas en el porcentaje de descondensación con respecto a la incubación con ambos agentes en simultáneo: $23 \pm 5\%$ vs $19 \pm 5\%$ respectivamente ($n=4$, ANOVA + Test de Comparaciones Múltiples de Student-Newman-Keuls, NS).

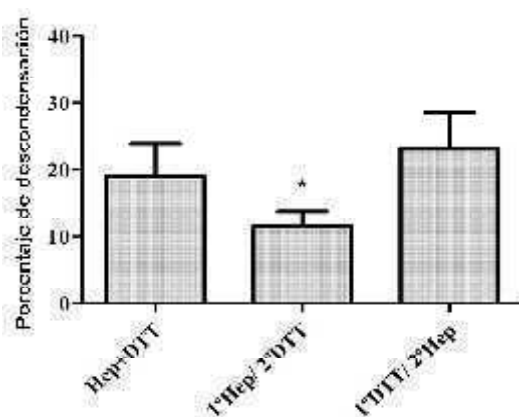


Figura 30. Porcentaje de descondensación de espermatozoides al incubar con heparina y DTT en forma conjunta durante 60 minutos (Hep+DTT), heparina durante 30 minutos y luego DTT durante 30 minutos (1°Hep/2°DTT), o DTT durante 30 minutos y luego heparina durante 30 minutos (1°DTT/2°Hep). En todos los casos la incubación fue realizada a 37°C ($n=4$, ANOVA + Test de Comparaciones Múltiples de Student-Newman-Keuls, $p<0.05$)

En núcleos espermáticos aislados

En la figura 31 se observa que la exposición de núcleos espermáticos aislados a heparina y DTT simultáneamente produjo un $61 \pm 4\%$ de descondensación y que se obtuvieron valores similares ($61 \pm 5\%$) al incubar primero con DTT y luego con heparina ($n=11$, ANOVA + Test de Comparaciones Múltiples de Student-Newman-Keuls, NS). Sin

embargo, la exposición de los núcleos a heparina primero y luego a DTT, produjo una disminución significativa del porcentaje de descondensación ($43 \pm 6\%$) comparada con el tratamiento con ambos agentes en forma simultánea ($n=11$, ANOVA + Test de Comparaciones Múltiples de Student-Newman-Keuls, $p<0.01$).

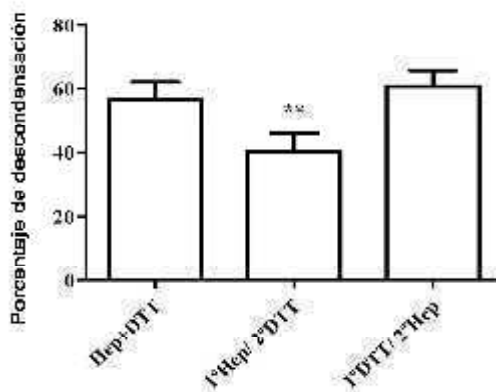


Figura 31. Porcentaje de descondensación de núcleos espermáticos aislados al incubar con heparina y DTT en forma conjunta durante 30 minutos (Hep+DTT), heparina durante 15 minutos y luego DTT durante 15 minutos (1°Hep/2°DTT), o DTT durante 15 minutos y luego heparina durante 15 minutos (1°DTT/2°Hep). En todos los casos la incubación fue realizada a 37°C. ($n=11$, ANOVA + Test de Comparaciones Múltiples de Student-Newman-Keuls, $p<0.01$)

Por lo tanto, al reemplazar el GSH por DTT como agente tiorreductor, se observó una disminución significativa del porcentaje de descondensación al utilizar los reactivos en forma secuencial con respecto a su uso en forma simultánea, solamente al incubar con heparina primero, pero no cuando se incubó con DTT primero. Este comportamiento fue semejante en espermatozoides enteros y núcleos espermáticos aislados.

¿Existe un efecto diferencial del tiempo de exposición al tiorreductor sobre la descondensación de espermatozoides in vitro de acuerdo con la naturaleza del tiorreductor?

De acuerdo con el comportamiento diferencial observado entre GSH y DTT y descrito en los puntos anteriores, se resolvió estudiar el posible efecto diferencial del tiempo de

exposición al tiorreductor sobre la descondensación de espermatozoides humanos *in vitro*. Para ello se incubaron espermatozoides con tiorreductor solo durante distintos tiempos, previo a la incubación por 30 minutos con heparina sola, según se describiera en MM, sección 8.

GSH como tiorreductor

La incubación de espermatozoides con GSH durante distintos períodos previo a la incubación con heparina sola, produjo en todos los casos un porcentaje de descondensación significativamente menor que el agregado de GSH y heparina en forma simultánea para todos los tiempos estudiados: $20 \pm 4\%$, $37 \pm 5\%$ y $55 \pm 5\%$ para incubación por 10, 20 y 30 minutos, respectivamente ($n=5$, ANOVA + Tukey, $p<0.001$). Estos resultados pueden verse ilustrados en la Figura 32. Se expresan como descondensación relativa a la descondensación producida por ambos agentes en conjunto por 60 minutos.

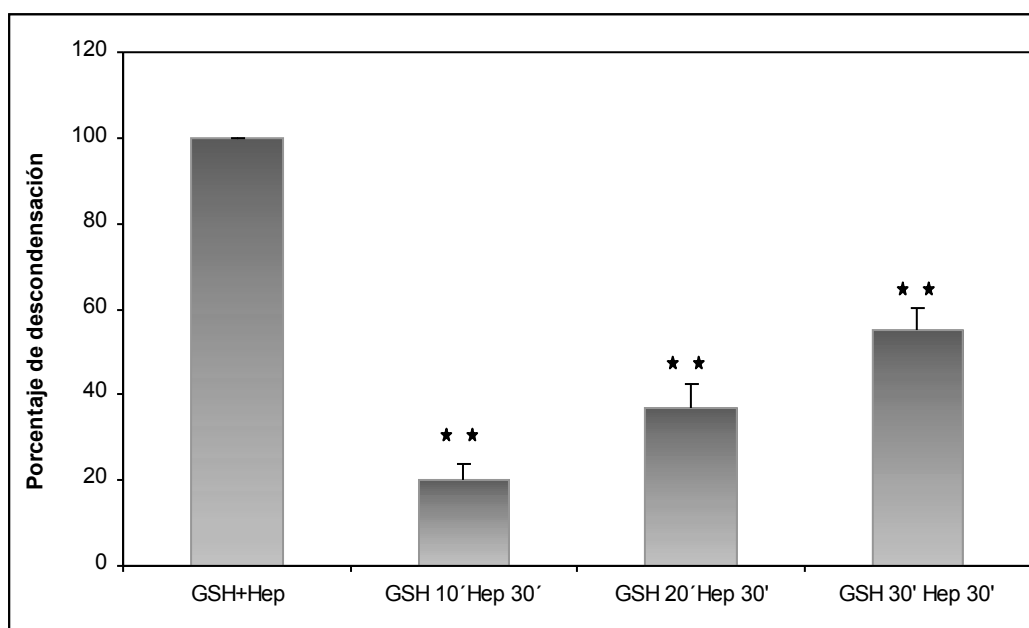


Figura 32. Porcentaje de descondensación relativa de espermatozoides al incubar con GSH y heparina en forma conjunta durante 60 minutos (GSH+Hep); GSH durante 10, 20 o 30 minutos previo a la incubación con

heparina sola durante 30 minutos. En todos los casos la incubación fue realizada a 37°C. (n=5, ANOVA + Tukey, $p < 0.001$ relativo a heparina+GSH)

En la Figura 33 se observa que en estos ensayos se encontró una relación directa entre el tiempo de exposición a GSH y la descondensación alcanzada ($R^2=0.9995$) n=5.

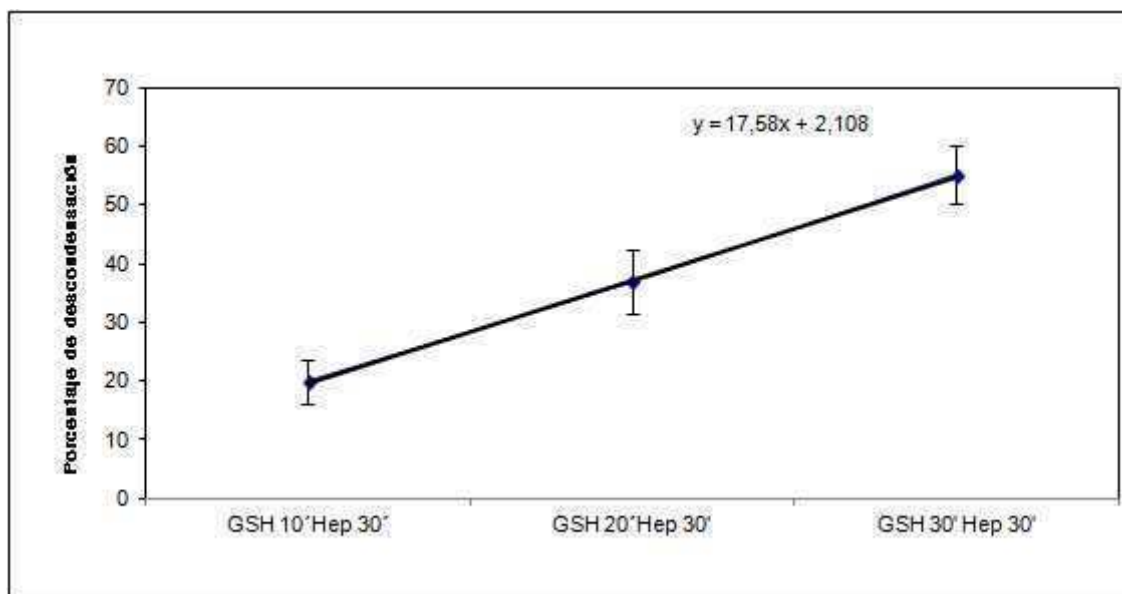


Figura 33. Relación entre el tiempo de exposición al GSH y el porcentaje de descondensación relativo al incubar con GSH durante 10, 20 o 30 minutos previo a la incubación con heparina sola durante 30 minutos. En todos los casos la incubación fue realizada a 37°C. Se observa una correlación positiva entre el tiempo de exposición al tiorreductor y el porcentaje de descondensación ($R^2=0.9995$, n=5)

DTT como tiorreductor

Al incubar espermatozoides con DTT por distintos tiempos previo al agregado de heparina, los resultados obtenidos fueron diferentes a lo que se observó utilizando GSH como tiorreductor. Solo al incubar con DTT durante 10 minutos previo al agregado de heparina, se produjo una disminución significativa del porcentaje de descondensación comparada al uso de DTT y heparina en forma simultánea: $54 \pm 4\%$ (n=4, ANOVA + Tukey, $p < 0.001$). En cambio, la exposición a DTT durante 20 o 30 minutos previamente a

la heparina, no disminuyó significativamente el porcentaje de descondensación relativa (Figura 34).

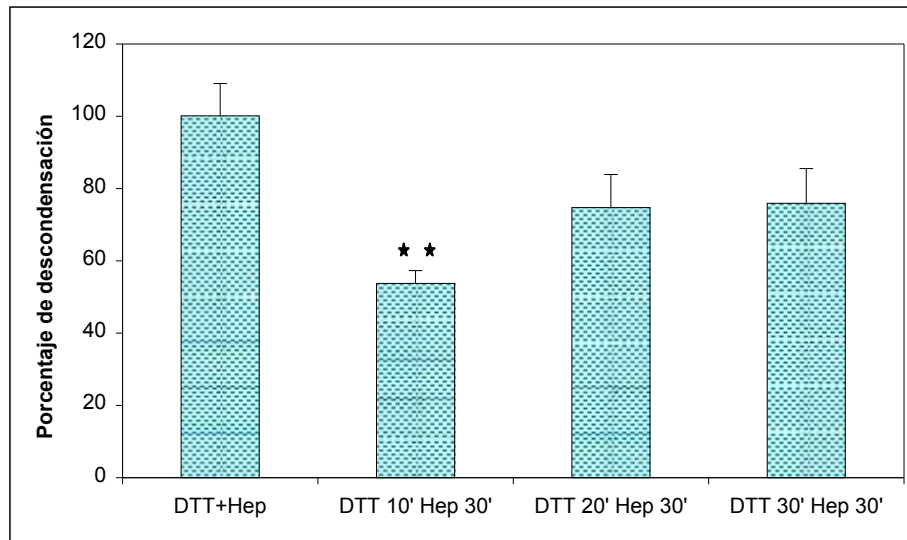


Figura 34. Porcentaje de descondensación relativa de espermatozoides al incubar con DTT y heparina en forma conjunta durante 60 minutos (DTT+Hep); DTT durante 10, 20 o 30 minutos previo a la incubación con heparina sola durante 30 minutos. En todos los casos la incubación fue realizada a 37°C. (n=4, ANOVA + Tukey, $p < 0.001$).

Capítulo 3: Evaluación del estado de tiorreducción de la cromatina espermática

Con el objeto de demostrar el posible efecto de la heparina sobre la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas presentes en el núcleo del espermatozoide humano durante el proceso de descondensación, se evaluó el estado de tiorreducción de la cromatina espermática utilizando dos metodologías diferentes.

Método indirecto: tinción con Naranja de Acridina

Tal como se señalara en Materiales y Métodos (Sección 9.i), la Naranja de Acridina (NA) es un colorante fluorescente que se une al ADN doble o simple cadena. Luego de someter al ADN espermático a una desnaturalización ácida, puede utilizarse como método indirecto para evaluar el estado tiorreducido de las protaminas en la cromatina. Si la cromatina se encuentra altamente reducida, se desnaturalizará fácilmente y emitirá fluorescencia roja, mientras que la cromatina no reducida, conteniendo gran cantidad de puentes disulfuro intactos, será resistente a la desnaturalización y emitirá fluorescencia verde.

En primer lugar se realizó la tinción con NA de espermatozoides lavados e incubados en condiciones descondensantes, en presencia de heparina, GSH, DTT, heparina + GSH o heparina + DTT. La figura 35 muestra las fotografías de fluorescencia obtenidas y puede verse claramente que el agregado de heparina al GSH aumentó la fluorescencia roja (cromatina más tiorreducida) en relación a cada agente por separado.

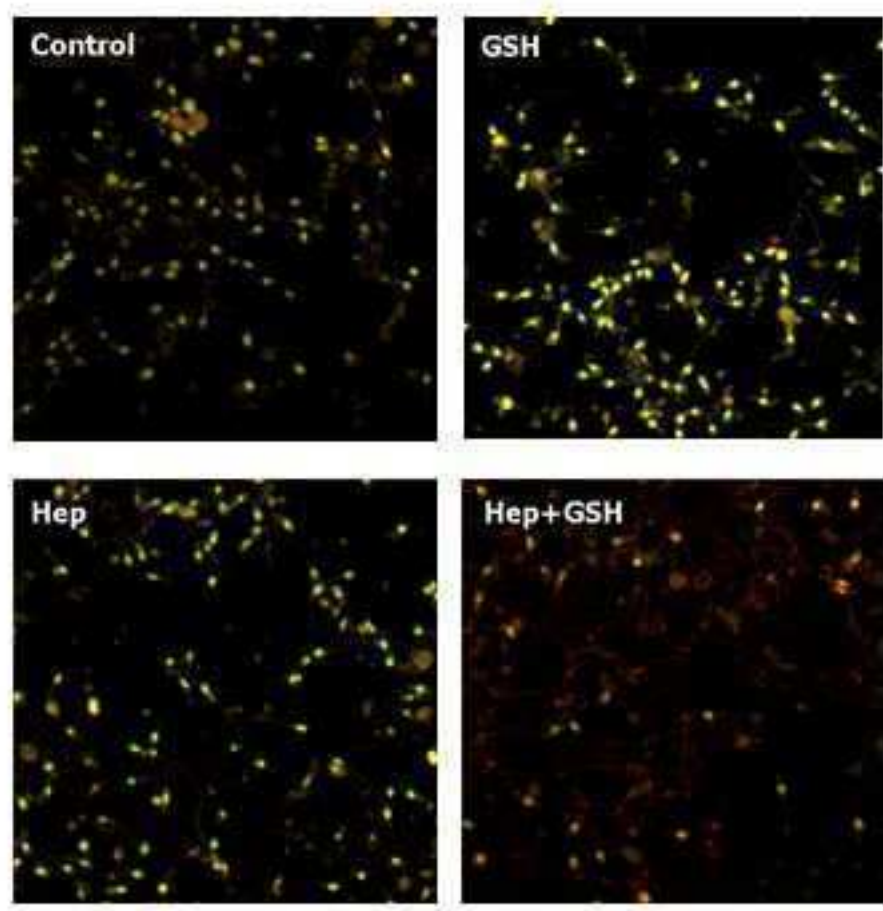


Figura 35. Tinción con Naranja de Acridina de espermatozoides enteros incubados en presencia de: medio HTF (Control), GSH 10 mM, heparina 46 μ M (Hep), o la mezcla de heparina y GSH (Hep+GSH). La incubación se realizó durante 60 minutos a 37°C.

Debido a que el proceso que nos interesa estudiar ocurre dentro del ovocito, donde el espermatozoide se encuentra desprovisto de membranas externas (plasmática y acrosomal) y posee solo la membrana nuclear, se realizó la tinción con NA en núcleos espermáticos aislados e incubados previamente con GSH o DTT con y sin agregado de heparina.

En los núcleos control (incubados con medio HTF) y los expuestos a GSH solamente, se observó mayoritariamente fluorescencia color verde; los núcleos expuestos a heparina

solamente mostraron fluorescencia amarilla y aquellos expuestos a ambos agentes simultáneamente fueron, en su mayoría, naranjas o rojos (Figura 36).

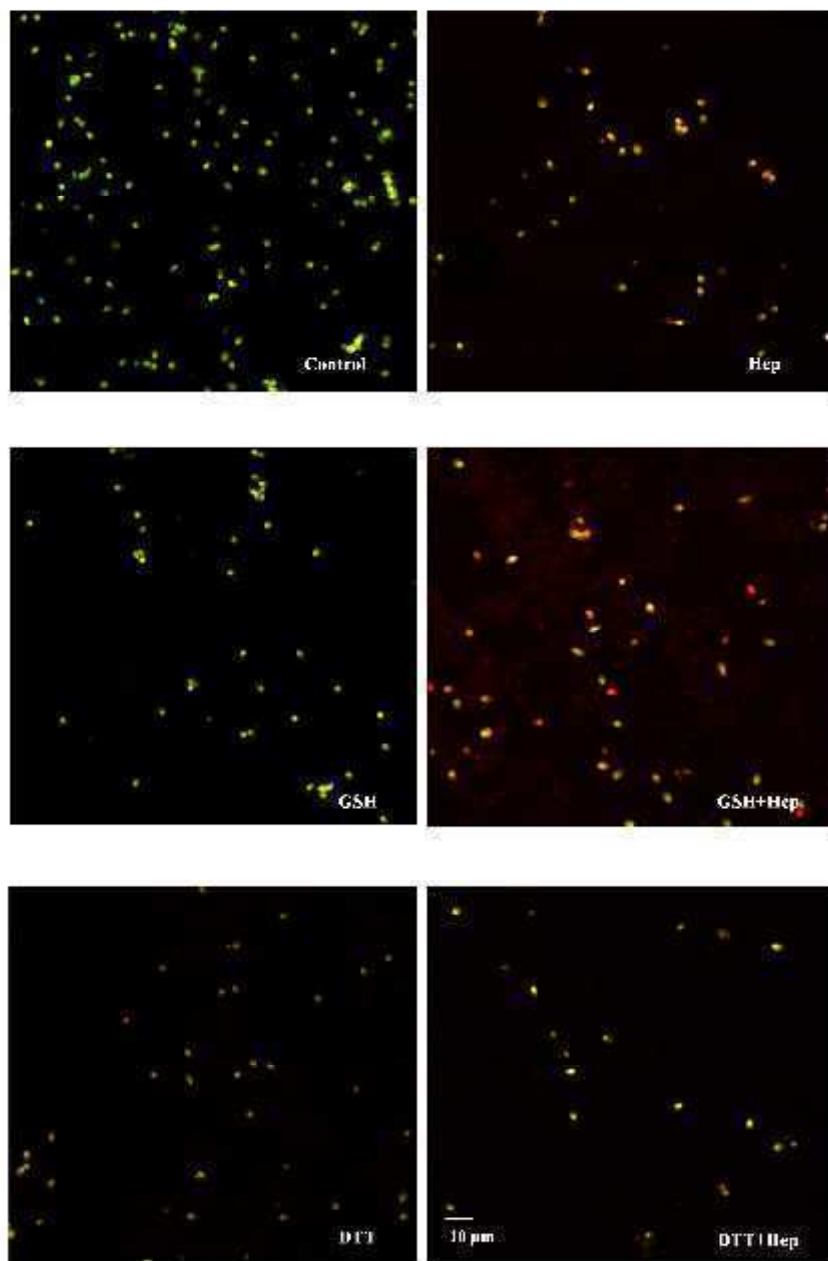


Figura 36. Tinción con Naranja de Acridina de núcleos aislados de espermatozoides incubados en presencia de: medio HTF (Control), heparina 46 µM (Hep), GSH 10 mM, la mezcla de GSH y heparina (GSH+Hep), DTT 0,1 mM, o la mezcla de DTT y heparina (DTT+Hep). La incubación se realizó durante 30 minutos a 37°C.

Por otro lado, en presencia de DTT, se observó que los núcleos mostraban mayoritariamente fluorescencia amarilla y cuando se los expuso a la mezcla de DTT y heparina, mostraron fluorescencia roja.

En cada núcleo espermático no hay solamente un estado de tiorreducción de la cromatina, sino que la mayoría de las protaminas estarán más o menos tiorreducidas y según el estado que predomine, será el color que se observe al teñir con NA. Por lo tanto cada núcleo presentará una mezcla de diferentes intensidades de fluorescencia roja y verde. Es por esto que se cuantificó (en Unidades Arbitrarias) la intensidad de fluorescencia de al menos 200 núcleos espermáticos, desglosando la emisión roja y verde de cada uno de ellos. Los datos obtenidos fueron representados en gráficos como intensidad de verde vs rojo para cada condición experimental.

Los diagramas de dispersión de puntos (Figura 37) muestran que luego de la exposición a GSH o al medio (control), los núcleos espermáticos presentaron una fluorescencia predominantemente verde mientras que la exposición al DTT solo o a la heparina sola también produjo un cambio de fluorescencia hacia el rojo. La exposición a GSH y heparina simultáneamente, produjo un notorio cambio de fluorescencia hacia el color rojo, indicando un mayor nivel de reducción de los puentes disulfuro de las protaminas. La exposición de los núcleos a DTT junto con heparina, también produjo un cambio de fluorescencia hacia el rojo con respecto al DTT solo, aunque este cambio no fue tan pronunciado como el que se observó luego de la coincubación con heparina y GSH.

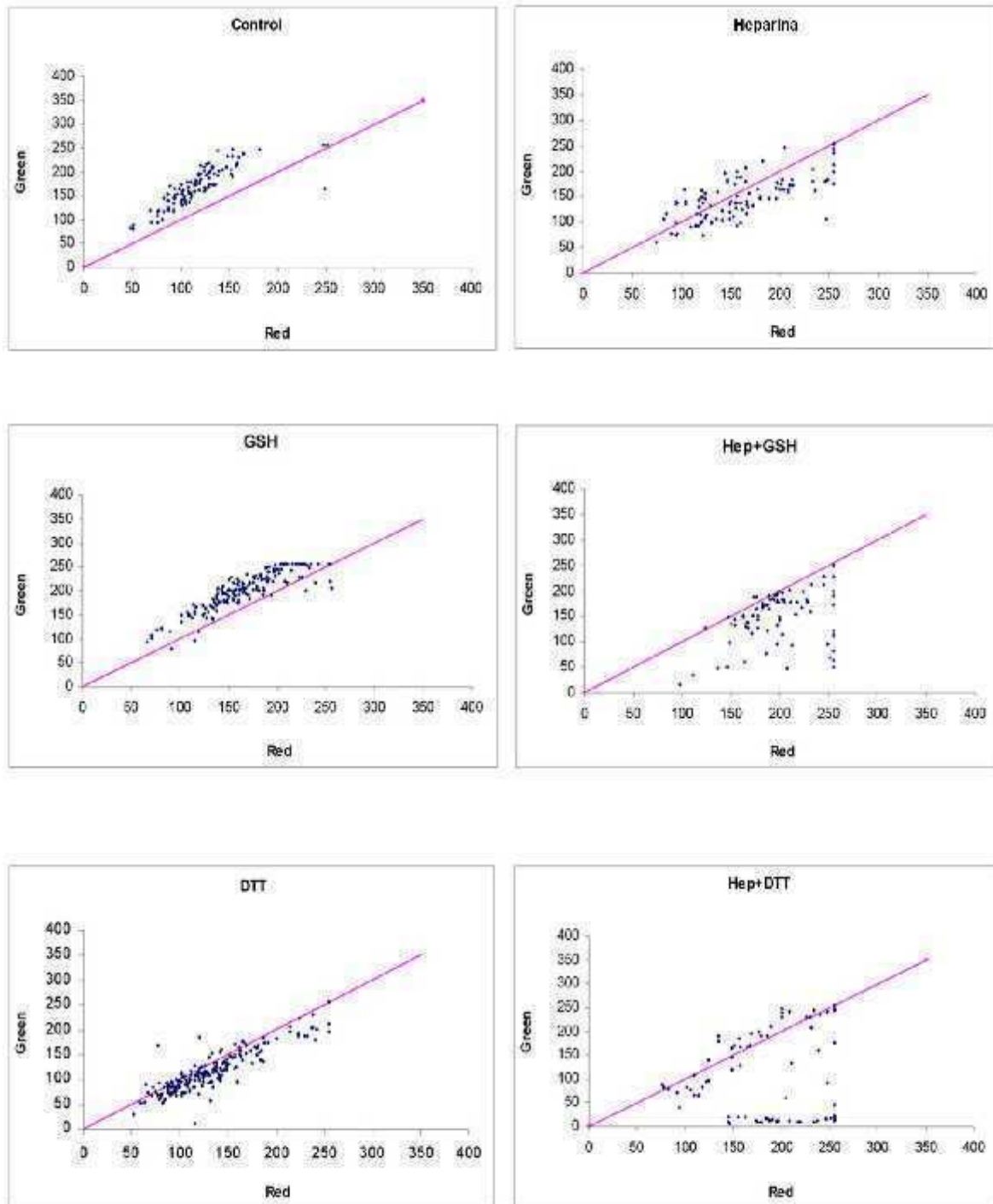


Figura 37. Diagramas de dispersión de puntos de núcleos teñidos con Naranja de Acridina expresados como intensidad de fluorescencia verde vs roja en Unidades arbitrarias. Al menos 200 núcleos fueron analizados en cada condición experimental: Control, GSH, Heparina, Heparina+GSH, DTT, Heparina+DTT.

Método directo: tinción con monobromobimane

Con el objeto de evaluar directamente el estado de tiorreducción de la cromatina, núcleos espermáticos aislados fueron teñidos con el reactivo tiólico monobromobimane (mBBr), que se une a los sulfhidrilos libres en las protaminas emitiendo fluorescencia azul, previa incubación con el tiorreductor por un tiempo fijo (30 minutos) y agregado de heparina durante los últimos 5, 15 o 30 minutos (Figura 38).

Los núcleos expuestos a heparina o a medio solamente, aparecieron pequeños y ligeramente fluorescentes. La exposición tanto a GSH como a DTT solo, aumentó la intensidad de fluorescencia de los núcleos debido a la reducción de los puentes disulfuro, pero no modificó en absoluto el tamaño de los mismos.

El agregado de heparina a la incubación con GSH o DTT, produjo dos efectos visibles en los núcleos al promover la descondensación de los mismos: por un lado generó un aumento considerable de tamaño y, por otro, la disminución de la intensidad de la fluorescencia del monobromobimane posiblemente debido a la liberación de las protaminas del ADN.

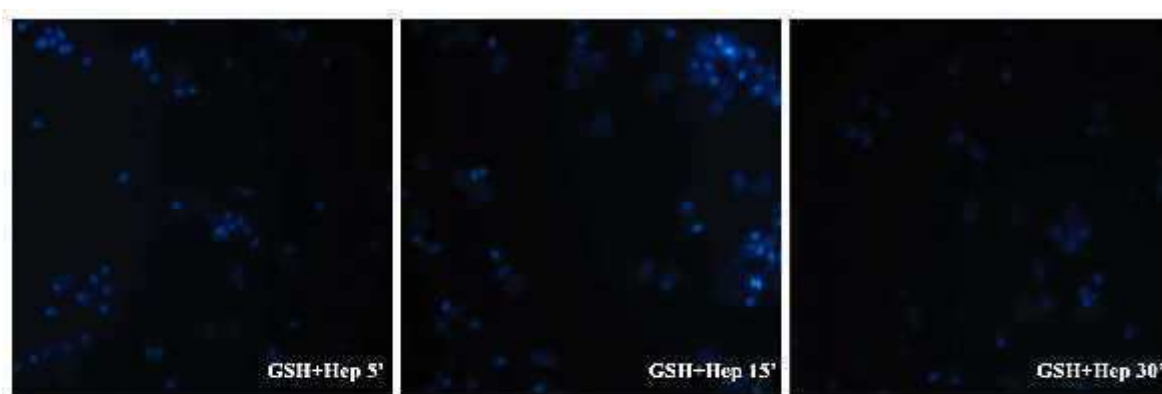


Figura 38. Tinción con monobromobimane de núcleos aislados de espermatozoides luego de incubarlos con GSH 10 mM durante 30 minutos y heparina 46 μ M durante los últimos 5, 15 y 30 minutos. Los preparados fueron analizados utilizando microscopio de fluorescencia Zeiss, a 400 X de aumento.

Al cuantificar la proporción de núcleos descondensados se observó que un 76% de los mismos aumentó su tamaño (descondensados) luego de la exposición a GSH y heparina por 30 minutos y que luego de la exposición a DTT y heparina, descondensó un 66% de los núcleos. (Figura 39).

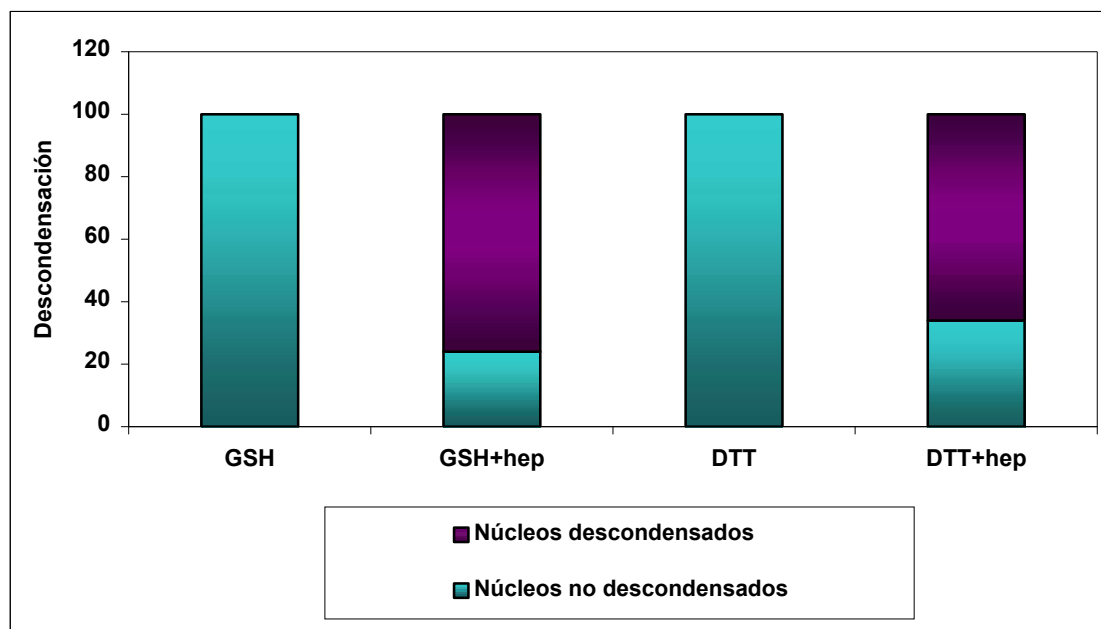


Figura 39. Porcentaje de descondensación de núcleos aislados de espermatozoides al incubarse con GSH, GSH y heparina, DTT, o DTT y heparina durante 30 minutos a 37°C.

Dado que el efecto que se deseaba evaluar en este punto es el que produciría la heparina específicamente sobre la tiorreducción y no sobre el proceso global de descondensación, se cuantificó la intensidad de fluorescencia de los núcleos pequeños aún condensados (en estadio S, MM sección 5). Estos núcleos serían los que aún contendrían en su interior las protaminas, con mayor o menor grado de sulfhidrilos libres según el caso, luego del tratamiento con GSH o DTT con y sin el agregado de heparina por sólo 5 minutos (Figura 40).

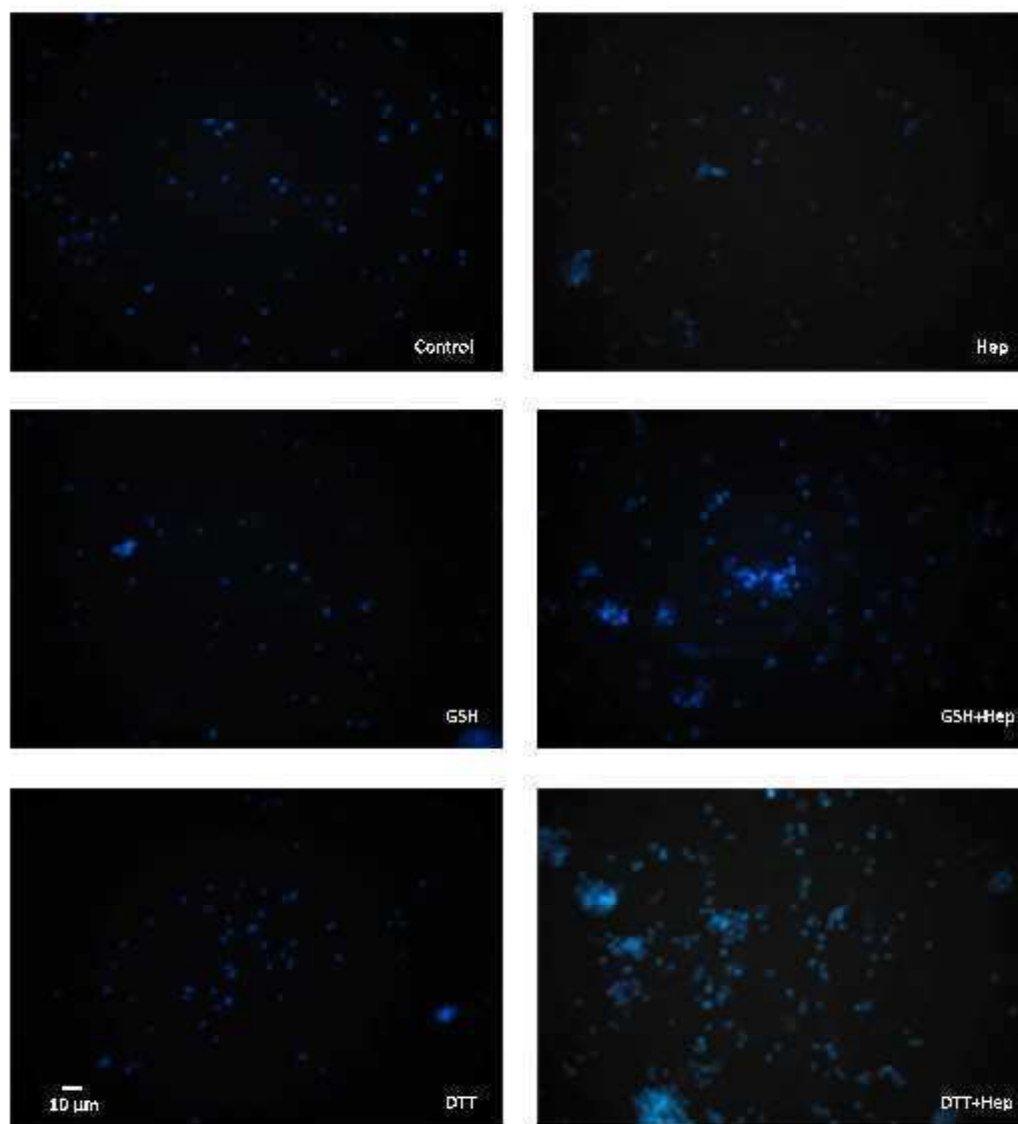


Figura 40. Microscopía de fluorescencia de monobromobimane de núcleos espermáticos aislados incubados durante 30 minutos en presencia de HTF (Control), heparina, GSH, DTT, GSH y heparina (los últimos 5 minutos), o DTT y heparina (los últimos 5 minutos). Los preparados fueron analizados utilizando microscopio de fluorescencia Zeiss, a 400 X de aumento.

Se cuantificó la intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias, UA) de cada núcleo y se calculó la media de intensidad de fluorescencia para cada condición experimental. Tal como se observa claramente en la figura 41, la intensidad de fluorescencia de los núcleos

pequeños luego de la exposición al agente tiorreductor fue similar para GSH y para DTT (101 ± 14 vs 90 ± 20 UA, Análisis de Varianza de mediciones repetidas + Prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, NS, $n=8$), sugiriendo que a las concentraciones utilizadas ambos agentes tienen similar efecto reductor de los puentes disulfuro de las protaminas.

La intensidad de fluorescencia de los núcleos pequeños luego de la exposición a heparina sola fue significativamente menor (47 ± 8 UA, Análisis de Varianza de mediciones repetidas+ Prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni $p<0.005$, $n=8$) que la que produjeron GSH o DTT solos.

La adición de heparina al GSH por 5 minutos, aumentó significativamente la intensidad de fluorescencia de los núcleos pequeños comparada con GSH solo (132 ± 12 vs. 101 ± 14 AU, Análisis de Varianza de mediciones repetidas + Prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, $p<0.05$, $n=8$), mientras que la adición de heparina al DTT no (82 ± 22 vs. 90 ± 20 AU, Análisis de Varianza de mediciones repetidas + Tukey, NS, $n=8$), lo que sugiere que la heparina sería capaz de favorecer el efecto tiorreductor del GSH pero no del DTT.

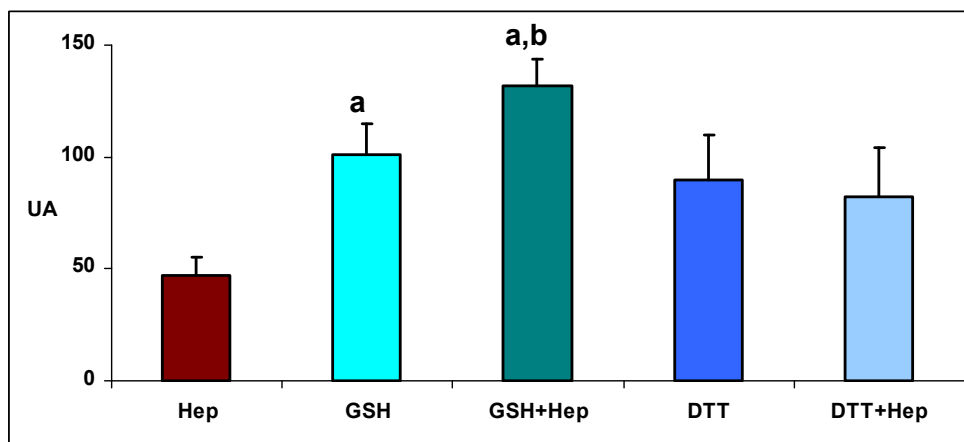


Figura 41. Intensidad de fluorescencia media (medida en Unidades Arbitrarias) de núcleos condensados luego de ser tratados con GSH o DTT con o sin el agregado de Heparina por los últimos 5 minutos y teñidos con monobromobimane. Los resultados están expresados como la media \pm SEM para $n=7$. Al menos 200 núcleos fueron analizados en cada condición experimental. a: $p<0.05$ comparado con Heparina solo, b: $p<0.05$ comparada con GSH solo.

Capítulo 4 Detección de la presencia de protaminas en los sobrenadantes de descondensación

Al incubar núcleos espermáticos con heparina y GSH o DTT, para producir la descondensación de la cromatina *in vitro*, las protaminas que se encuentran empaquetando el ADN, deberían desprenderse del mismo y permanecer en el sobrenadante de incubación.

Con el objeto de verificar la presencia de las protaminas en los sobrenadantes de incubación durante el proceso de descondensación *in vitro*, se incubaron núcleos espermáticos con heparina, GSH, DTT y las mezclas de heparina y GSH o heparina y DTT (MM, sección 10). Una vez cumplido el tiempo de exposición a los agentes descondensantes, se detectó la presencia de protaminas 1 y 2 en los sobrenadantes de incubación por medio de la técnica de Dot-blot, tal como se describiera en MM, sección 10.

En la figura 42 se muestra el resultado de un experimento representativo resultante del uso de esta técnica. A la izquierda se pueden observar las marcas correspondientes a la incubación con anticuerpo anti protamina 1 y a la derecha con anti protamina 2.

En el panel inferior se encuentran los controles negativos para los diferentes tratamientos, incubados solo con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa, con los que se corrobora la ausencia de reacción inespecífica del anticuerpo.

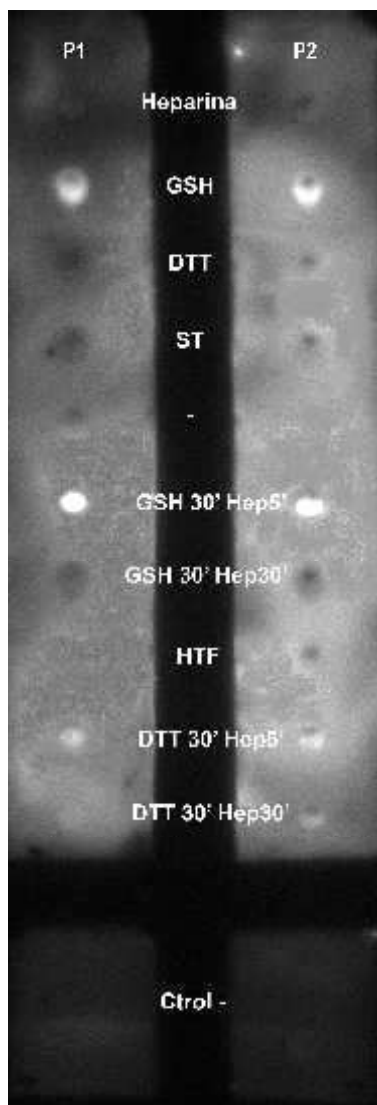


Figura 42. Dot-blot realizado con los sobrenadantes obtenidos al incubar núcleos espermáticos durante 30 minutos en presencia de: **Hep** 46 μ M; **GSH** 10 mM; **DTT** 0,1 mM; HTF (control **ST**); GSH y heparina los últimos 5 minutos (**GSH30' Hep5'**); GSH y heparina (**GSH30' Hep30'**); DTT y heparina los últimos 5 minutos (**DTT30' Hep5'**); DTT y heparina (**DTT30' Hep30'**). Se detectó la presencia de protaminas utilizando anticuerpos monoclonales anti protaminas 1 (panel izquierdo) y 2 humanas (panel derecho). En el panel inferior se observa el control negativo del anticuerpo secundario.

En la figura 42 se puede ver claramente que las protaminas 1 y 2 se encuentran presentes en el sobrenadante obtenido al incubar con GSH 30' y heparina durante los últimos 5'; sin embargo la marca correspondiente a ambas protaminas desaparece al

coincubar ambos agentes durante 30 minutos. Sorpresivamente, se observa también presencia de P1 y P2 en el sobrenadante obtenido al incubar con GSH sólo.

P1 y P2 también pueden observarse en el sobrenadante de coincubación con DTT y heparina por los últimos 5 minutos, y si bien aún se detectan luego de coincubar con los dos agentes durante 30 minutos, la marca es mucho menos intensa que a tiempos más cortos.

No se observa presencia de protaminas en los sobrenadantes obtenidos al incubar núcleos espermáticos aislados con medio (ST), heparina o DTT solamente.

Capítulo 5: Microscopía electrónica

Con el objeto de evaluar el efecto de los agentes descondensantes en la estructura de los espermatozoides, se tomaron imágenes de microscopía electrónica de espermatozoides y núcleos aislados luego de ser expuestos a heparina, GSH o la mezcla de heparina y GSH tal como se explicara en la sección 11 de MM.

En la figura 43 se observan fotos representativas de los distintos tratamientos realizados a espermatozoides enteros. Al tratar los espermatozoides con heparina o GSH solos (panel superior), la membrana plasmática no parece tener cambios estructurales importantes (flecha).

Cuando se coincuba con heparina y GSH, se observan espermatozoides en distintos estadios de descondensación (principalmente **S** y **G**). En el caso de los espermatozoides no descondensados, la membrana plasmática no parece verse afectada por el tratamiento y su apariencia es normal mientras que los espermatozoides descondensados presentan restos de membrana (flecha) o ausencia de la misma. Sin embargo, los espermatozoides descondensados mantienen su forma a pesar de carecer de membrana que los limite. Esta característica se mantiene aun en espermatozoides en estadio **G** (groseramente descondensados).

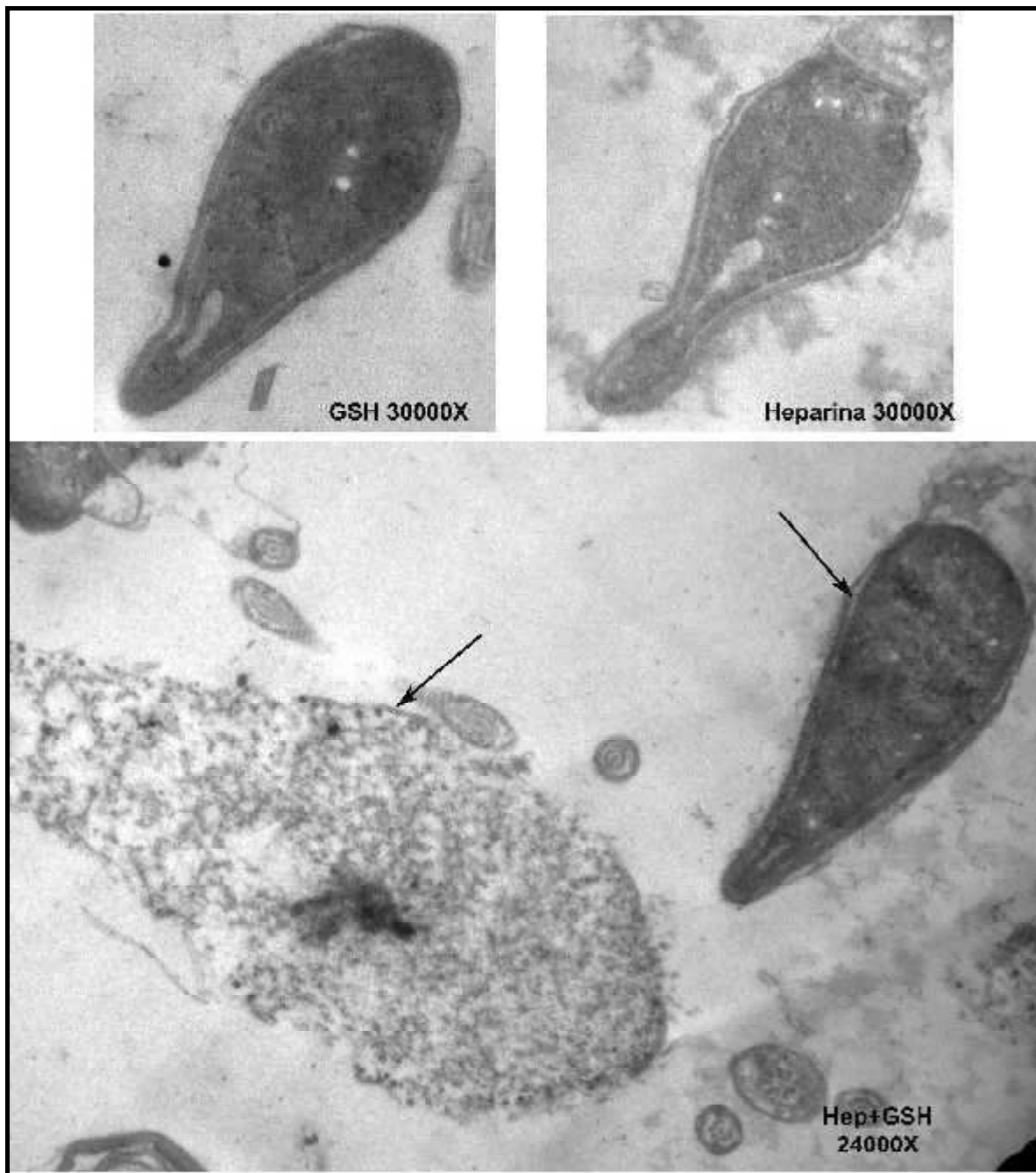


Figura 43. Microscopía electrónica realizada a espermatozoides expuestos a heparina, GSH o la mezcla de heparina y GSH (Hep+GSH) durante 1 hora a 37°C. Las imágenes fueron tomadas por MSc Cristian Alvarez Sedó.

En la figura 44 se observan fotos representativas de los distintos tratamientos realizados a núcleos aislados.

Al tratar los núcleos con heparina o GSH solos (esquinas), los núcleos mantienen su forma y la cromatina mantiene su alto grado de condensación. Cuando se coincide con heparina y GSH, se observan núcleos en distintos estadios de descondensación.

Es interesante observar la presencia de estructuras granulares (flecha) en la zona periférica de los núcleos medianamente descondensados (M) que desaparecen conforme avanza la descondensación (núcleos **G**roseramente descondensados) (Figura 45).

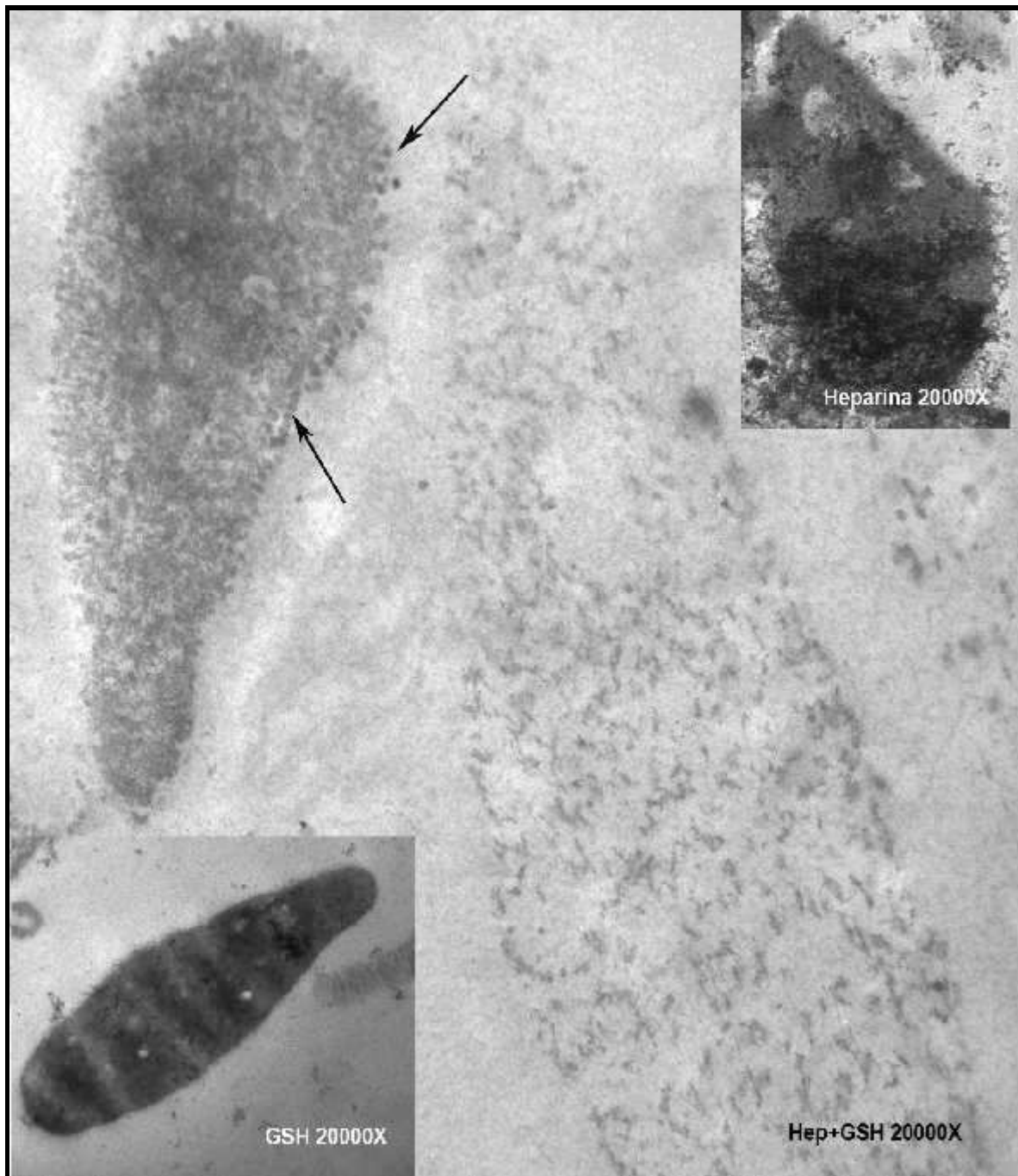


Figura 44. Microscopía electrónica realizada a núcleos espermáticos expuestos a heparina, GSH o la mezcla de heparina y GSH (Hep+GSH) durante 30 minutos a 37°C. Las imágenes fueron tomadas por MSc Cristian Alvarez Sedó.

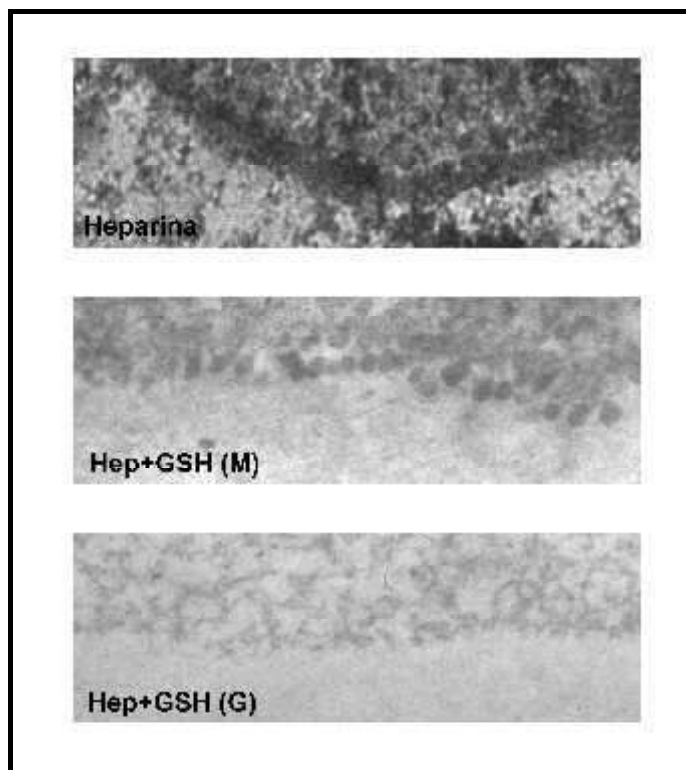


Figura 45. Detalle de la periferia de un núcleo tratado con heparina sola durante 30 minutos a 37°C (panel superior). En el panel medio se observa el detalle de un núcleo en estadio **M**oderadamente descondensado luego de ser tratado con heparina y GSH durante 30 minutos a 37°C y en el panel inferior, detalle de la periferia de un núcleo **G**roseramente descondensado.

Discusión

El proceso de descondensación de la cromatina espermática es fundamental para devolver al material genético su capacidad de duplicación y transcripción como, también, para permitir la singamia, es decir la fusión de los pronúcleos masculino y femenino originando el cigoto.

Debido a la estructura única de esta cromatina, condensada por la presencia de protaminas en lugar de histonas (salvo por un pequeño porcentaje residual) el proceso de descondensación involucra dos pasos diferentes desde el punto de vista químico, pero complementarios en su función: la reducción de puentes disulfuro entre las cisteínas de las protaminas y el intercambio entre protaminas e histonas ovocitarias, con la participación de una molécula con alta carga negativa, como es el heparán sulfato en las especies estudiadas por nuestro laboratorio: ratón y humano.

Si bien hasta el momento se acepta que estas dos etapas ocurren en forma secuencial, con una reducción de los puentes disulfuro por el glutatión intracelular, seguida de la remoción e intercambio entre histonas y protaminas por el heparán sulfato, existe suficiente evidencia que indica que estas reacciones podrían ser cooperativas y ocurrir en forma simultánea.

Entendiendo que el ambiente celular y molecular donde ocurren todas las reacciones bioquímicas altera en forma sustancial las propiedades de los reactivos químicos, nos propusimos estudiar en más detalle el proceso de descondensación con miras a una posible utilidad terapéutica en las clínicas de reproducción asistida. De esta actividad clínica se obtienen datos que indican la presencia de posibles alteraciones en la descondensación de la cromatina espermática, dando cuenta de entre un 10-15% de fallas en la fecundación, por encontrar el material paterno condensado dentro del ovocito, aún utilizando técnicas como la inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), que pasan por alto todas las barreras posibles que podrían impedir una adecuada penetración.

Con esta idea como objetivo principal de este trabajo de Tesis Doctoral, debíamos centralizar nuestro estudio en los distintos componentes del sistema de descondensación: espermatozoide, agente reductor de puentes disulfuro (GSH) y el heparán sulfato (o su

análogo la heparina) como molécula receptora de las protaminas y facilitadora de su intercambio por histonas ovocitarias.

Como debió quedar claro por los resultados obtenidos, para este trabajo enfocamos el estudio del GSH exclusivamente desde su potencial reductor sin ahondar en los mecanismos enzimáticos que actuarían en el mantenimiento de los niveles biodisponibles del agente tiorreductor (glutatión reductasa) o que podrían ser intermediarios en el proceso de tiorreducción (tiorredoxinas).

Inicialmente se buscó establecer las condiciones para el ensayo de descondensación de espermatozoides y núcleos espermáticos *in vitro*. La descondensación alcanzada en uno y otro caso es diferente, siendo muy superiores los porcentajes y menor el tiempo requerido en el caso de núcleos aislados. Esta diferencia se debería a que los núcleos carecen de membranas espermáticas, las que actuarían dificultando la entrada de los agentes descondensantes y su accesibilidad hasta la cromatina. Esta observación se ve reforzada con el hecho que el porcentaje de descondensación alcanzado en espermatozoides enteros, coincide en general con el porcentaje de espermatozoides no viables (hasta 25%) medidos con un colorante aniónico (Eosina Y) que penetra solo cuando la membrana es permeable (células muertas) (Romanato *y col.*, 2003). Se estableció como concentración óptima para el ensayo de descondensación: heparina 46 μM y GSH 10mM. En este punto cabe resaltar que la concentración de GSH utilizada es fisiológica y corresponde al valor encontrado en el ovocito de mamíferos en el momento periovulatorio (Calvin *y col.*, 1986), mientras que si bien la de heparina no se conoce fehacientemente, se encuentra dentro del rango que ha sido determinado experimentalmente para el heparán sulfato en el fluido folicular de ovocitos humanos obtenidos de mujeres que llevan a cabo tratamientos de fertilización asistida (Bellin *y col.*, 1986).

Con el objeto de ahondar en el mecanismo por el cual el GSH participa en la descondensación nuclear de espermatozoides, se comparó el efecto *in vitro* del GSH con el de otro agente reductor de los puentes disulfuro, el DTT. Se observó que al utilizar una concentración de DTT 10 mM, que como se ha mencionado corresponde a niveles fisiológicos de GSH, la mezcla de heparina y DTT dio lugar a la pérdida de la integridad de los espermatozoides. Para producir niveles similares de descondensación de

espermatozoides a los producidos por heparina y GSH debieron utilizarse concentraciones 10 veces menores de DTT (1 mM). Por otra parte, una dilución de DTT 0,1 mM no produjo descondensación de espermatozoides dentro del tiempo analizado (60 minutos). Esta diferencia en concentraciones podría estar relacionada con los diferentes valores del potencial de reducción de ambos compuestos.

Cuando se evaluó la descondensación de núcleos aislados en presencia de heparina y DTT, debieron reducirse aún más las concentraciones de DTT ya que tanto 1 mM como 0,5 mM destruían virtualmente los núcleos espermáticos, mientras que DTT 0,1 mM permitió alcanzar valores similares de descondensación a los producidos por la mezcla heparina+GSH. En consecuencia, las concentraciones óptimas para el ensayo de descondensación *in vitro* con DTT como tiorreductor fueron 1 mM y 0,1 mM para descondensar espermatozoides enteros y núcleos aislados, respectivamente.

Esta diferencia observada en la capacidad reductora del DTT frente al GSH resultó más evidente en núcleos aislados que en espermatozoides enteros probablemente debido a la ausencia de membranas acrosomales y plasmática y de acrosoma. Como ya se señalara, el trabajo con núcleos aislados representa una situación más cercana a la fisiológica porque, una vez que el espermatozoide ingresó al ovocito, el núcleo espermático se encuentra prácticamente desnudo dado que ya ha tenido lugar la reacción acrosomal. Una vez en el ooplasma, se produce muy rápidamente la degradación del envoltorio nuclear para que la cromatina así expuesta pueda descondensarse y luego dar lugar a la formación del pronúcleo masculino (Tesarik y Kopecny, 1989).

Los resultados obtenidos utilizando ambos tiorreductores sugieren que el DTT es un agente mucho más fuerte para la reducción de los puentes disulfuro que el GSH, en especial en los núcleos espermáticos aislados. Este comportamiento no puede ni debe ser explicado solamente por el hecho que el GSH tiene menor potencial de reducción (-0,24 V a pH 7) (Aslund y *col.*, 1997) que el DTT (-0,33 V) (Cleland, 1964). El GSH es un tripéptido (γ -Glu-Cys-Gly) (Figura 10), mientras que el DTT es un derivado tiólico del monosacárido C₄ treitol (Figura 20), por lo que sus estructuras moleculares son completamente diferentes.

La distinta capacidad para reducir los puentes disulfuro de las protaminas, que se observa como diferencias en la descondensación producida por ambos agentes tiorreductores,

puede deberse también a diferencias en la accesibilidad de dichos agentes a las protaminas oxidadas, determinadas tanto por las características propias de cada molécula tiorreductora tales como la estructura, el tamaño y permeabilidad de la membrana, así como por la naturaleza de la fuente de protaminas.

Los resultados obtenidos también pusieron de manifiesto claramente que los núcleos espermáticos aislados, que carecen de la protección de estructuras extranucleares como membranas espermáticas y acrosoma, requieren menores concentraciones de DTT para lograr descondensar su cromatina sin afectar su integridad, en comparación con los espermatozoides enteros. En cambio, este efecto no se observó cuando se utilizó GSH como agente tiorreductor, cuya estructura molecular y por lo tanto permeabilidad de la membrana nuclear, sin duda difiere de la del DTT. En cuanto a la accesibilidad de la heparina y el GSH a la cromatina espermática, según experimentos previos de nuestro laboratorio (Romanato y *col.*, 2005), donde se compara la cinética de descondensación de núcleos espermáticos y espermatozoides capacitados, es posible concluir que la membrana plasmática del espermatozoide representa una barrera poderosa contra la descondensación por estos agentes. Pero también convendría tener presente en este punto que además de la accesibilidad a la cromatina, existe la posibilidad de que la acción tiorreductora del GSH *in vivo* involucre la participación de las tiorredoxinas, moléculas que en muchas reducciones biológicas llevadas a cabo por el GSH intervienen como transportadores electrónicos intermediarios entre este tiorreductor y la proteína a ser tiorreducida, constituyendo verdaderas cadenas de transporte de electrones (Holmgren, 1989). Tanto espermatozoide como ovocito contienen cantidades importantes de tiorredoxinas que han sido ampliamente caracterizadas (Salz y *col.*, 1994; Miranda-Vizuite y *col.*, 2001; Anahory y *col.*, 2002; Jiménez y *col.*, 2002; Jiménez y *col.*, 2005; Sutovsky y Lovercamp, 2010). El hecho que el proceso de descondensación espermática sea sensible a la temperatura (Perreault y Zirkin, 1983) es compatible con que el mismo incluya la participación de alguna actividad enzimática. Este punto muy interesante deja la puerta abierta a futuras investigaciones.

Para analizar la posible interacción entre la molécula aceptora de protaminas (heparina) y el agente tiorreductor (GSH o DTT) durante la descondensación *in vitro*, se comparó el efecto del agregado de los agentes en forma conjunta con el agregado secuencial de los mismos, utilizando tanto espermatozoides como núcleos espermáticos aislados.

Los resultados obtenidos con cualquiera de los dos tiorreductores fueron similares para espermatozoides enteros y núcleos aislados, lo que indicaría que la interacción de los agentes descondensantes con los espermatozoides enteros refleja su interacción directa con el núcleo. Por lo tanto la descondensación de los espermatozoides enteros *in vitro* podría ser un buen sistema para estudiar la descondensación nuclear *in vivo* y, eventualmente, podría utilizarse como parámetro a evaluar en un entorno clínico. Es evidente que la posibilidad de trabajar con espermatozoides enteros en lugar de núcleos espermáticos aislados implica una ganancia significativa en sencillez experimental y por lo tanto tiempo transcurrido hasta la obtención de resultados, ambas características importantísimas a la hora de desarrollar un ensayo clínico.

Al analizar lo que ocurre al incubar espermatozoides durante diferentes tiempos con el tiorreductor previo a la heparina, se observó que utilizando GSH como tiorreductor, siempre descondensaba menos que utilizando los agentes en forma conjunta. En cambio cuando se utilizó como tiorreductor al DTT, solo disminuyó el porcentaje de descondensación a tiempos cortos de incubación con el DTT previo al agregado de la heparina, mientras que a tiempos mayores de incubación con DTT, no hay diferencia entre incubar en forma secuencial o conjunta con los agentes.

El efecto de la incubación simultánea versus secuencial con el agente tiorreductor y la heparina fue diferente según el agente reductor utilizado y según qué reactivo se añadió en primer lugar.

La adición de heparina en primer lugar, resultó en una reducción significativa de la descondensación nuclear para ambos tiorreductores. Esto sugiere que cuando la cromatina se encuentra en su estado original (oxidada), está tan compacta aún, que no permitiría la máxima remoción de las protaminas por la heparina.

La adición de GSH primero también redujo significativamente la descondensación nuclear, mientras que la adición de DTT no. Se podría especular que una molécula pequeña como

el DTT (Figura 20) tendría mayor acceso a las protaminas profundamente integradas en la estructura de la cromatina, mientras que el GSH que es un tripéptido (Figura 10), requeriría la remoción parcial de las protaminas que produce la heparina para poder acceder.

Estos resultados sugieren la existencia de un efecto cooperativo entre la heparina y el GSH durante la descondensación de la cromatina de espermatozoides y, a su vez, hablan a favor de la ocurrencia simultánea en lugar de secuencial de la reducción y remoción de las protaminas durante la descondensación nuclear *in vivo*.

En un intento por demostrar si el efecto observado de la heparina sobre el GSH en la descondensación nuclear fue consecuencia de una modulación directa y específica de la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas por el GSH, evaluamos el estado de tiorreducción de la cromatina espermática luego de la utilización de un agente tiorreductor de los puentes disulfuro solo o conjuntamente con heparina. Para este propósito, se utilizaron dos sondas fluorescentes: naranja de acridina (NA) que se une al ADN y constituye una medida indirecta del estado tiorreducido, y monobromobimane (mBBBr) que se une directamente a los tioles libres de las protaminas espermáticas.

El colorante naranja de acridina muestra un efecto metacromático luego de su unión al ADN, fluoresciendo verde con ADN doble cadena y rojo con ADN simple cadena (Tejada y col., 1984). La cromatina altamente reducida es más susceptible a la desnaturalización ácida en solución de Carnoy que la cromatina poco reducida, debido a un empaquetamiento débil. Luego de la tinción con NA, la cromatina muy reducida fluoresce roja o amarilla mientras que la cromatina poco reducida fluoresce verde. Es por ello que la tinción con NA de espermatozoides luego de la desnaturalización ácida ha sido usada como medida indirecta del estado de tiorreducción de la cromatina espermática (Kosower y col., 1992).

Los núcleos tratados solamente con GSH, presentan fluorescencia mayoritariamente verde (ADN resistente a la desnaturalización ácida) mientras que el agregado de heparina al GSH produce un número significativo de núcleos con fluorescencia naranja. Por otro lado, los núcleos tratados solo con DTT, emiten mayoritariamente fluorescencia amarilla o roja y prácticamente no presenta cambios en

su fluorescencia al tratarlos con heparina y DTT. Tales resultados indican que la heparina facilitaría la reducción de los puentes disulfuro por el GSH pero no parece tener efecto en la tiorreducción con DTT.

Este comportamiento sugiere que la remoción de las protaminas por la heparina cuando son reducidas por el GSH, favorece la accesibilidad de otras moléculas de protamina al agente tiorreductor mejorando el estado de tiorreducción de la cromatina. Este efecto cooperativo no sería necesario cuando la molécula utilizada como agente reductor de los puentes disulfuro es más pequeña, como el DTT.

Dado que la tinción con NA proporciona una medida indirecta del estado tiorreducido de las protaminas pues se une al ADN, se utilizó el reactivo tiólico monobromobimane que, al reaccionar con los grupos sulfhidrilo libres (Kosower y *col.*, 1979; Kosower y Kosower, 1987) nos permitió evaluar directamente el grado de tiorreducción de las protaminas espermáticas. En este punto, y con el objeto de comprender cómo fueron analizados los datos de mBBr, es importante tener en cuenta la naturaleza de nuestro diseño experimental. La coincubación de heparina y GSH o DTT, aún por periodos cortos, favorece la rápida descondensación de los núcleos aislados (Figura 39), con la consecuente remoción de protaminas y pérdida de la marca fluorescente de los núcleos descondensados (Figura 38).

Debido a que el objetivo principal de los experimentos con monobromobimane era comparar el nivel de tiorreducción de los núcleos ante el agregado o no de heparina al tiorreductor, se adicionó la misma durante los últimos 5 minutos de incubación con el tiorreductor y se cuantificó la fluorescencia de mBBr solamente en aquellos núcleos que todavía no perdían sus protaminas, es decir aquellos que aún no habían descondensado. Esos núcleos fueron seleccionados de acuerdo al tamaño (núcleos pequeños, en estadio **S**).

Es notable que los núcleos condensados que no fueron expuestos al tiorreductor, mostraron diferentes grados de fluorescencia al ser teñidos con monobromobimane, lo que indicaba un cierto grado de reducción espontánea de las protaminas, sin necesidad de agregar un agente reductor de los puentes disulfuro. Estos resultados concuerdan con la hipótesis que el espermatozoide humano tiene un mecanismo intrínseco de tiorreducción dependiente de la presencia de tioles libres en las protaminas (Kvist, 1982).

Los tioles libres estarían normalmente estabilizados por uniones reversibles a iones zinc (Zn^{2+}), pero luego del fraccionamiento celular y en ausencia de fluidos tanto del tracto masculino como femenino que contengan zinc, los núcleos tendrían agotado este ión y los tioles libres estarían expuestos y podrían promover la reducción de otros puentes disulfuro, tornando los núcleos más susceptibles a la tinción con mBBr (Kvist y Eliasson, 1980).

In vitro, la menor estabilidad del núcleo aislado debida a la ausencia de zinc en el medio, explicaría también los mayores porcentajes de descondensación obtenidos con respecto al espermatozoide entero. *In vivo*, el zinc es provisto por el fluido prostático (Homonnai y col., 1978) y funciona como un inhibidor temporario de la descondensación, que es removido por el tracto femenino (Kvist, 1980; Reyes y col., 1983). Una vez dentro del ovocito, la ausencia de membrana del espermatozoide y la remoción del zinc, aumentarían la inestabilidad de los tioles libres favoreciendo la descondensación en presencia de los agentes fisiológicos (glutatión y heparán sulfato).

Tal como se esperaba, la exposición a los agentes reductores de puentes disulfuro, aumentó significativamente la fluorescencia debida al monobromobimane en los núcleos aún condensados, indicando que la tiorreducción puede tener lugar en ausencia de heparina, y mas allá de la naturaleza del agente tiorreductor.

Por otro lado, la adición de heparina aún por un período tan corto como 5 minutos a la incubación con los tiorreductores, tuvo un efecto diferente en la capacidad reductora de los dos agentes probados: mejoró la capacidad del GSH para reducir los puentes disulfuro de las protaminas, pero no afectó la reducción que produjo el DTT.

Estos resultados concuerdan con lo observado luego de la tinción con naranja de acridina y refuerzan la hipótesis de un efecto cooperativo entre el GSH y la heparina durante la descondensación *in vitro*, que parece estar relacionado con la naturaleza química del GSH y no solamente con su actividad tiorreductora, ya que no se observa efecto cooperativo con el DTT.

Interesantemente, la asociación entre el GSH y el análogo fisiológico de la heparina (heparán sulfato) (Bergqvist y Rodriguez-Martinez, 2006) ha sido observada en otros eventos que involucran a espermatozoides durante su viaje hacia el ovocito en el tracto

genital femenino como, por ejemplo, la capacitación (Bergqvist y Rodriguez-Martinez, 2006) y la interacción con células oviductales. Esta interacción ha sido demostrada en diferentes especies incluida la humana (Baillie y col., 1997) y es fundamental para la formación de un reservorio de espermatozoides funcionales en el oviducto para asegurar un adecuado número de espermatozoides viables, potencialmente fértiles y capaces de fecundar (Talevi y Gualtieri, 2010). Varias moléculas presentes en el fluido oviductal, poseen habilidad para liberar los espermatozoides unidos al epitelio oviductal del reservorio del *istmus* de bovinos unas horas antes de la ovulación, permitiendo que progresen hacia la unión ampula-istmo donde los ovocitos ovulados esperan ser fertilizados (Hunter, 2008; Talevi y Gualtieri, 2010). Tanto el GSH como glicosaminoglicanos tipo heparina, cuya concentración en el fluido oviductal aumenta durante el estro en bovinos (Parrish y col., 1989; Lapointe y Bilodeau, 2003) modularían directamente la afinidad entre proteínas de la superficie del espermatozoide y el epitelio oviductal (Talevi y Gualtieri, 2010).

Nos resultó de interés, en el contexto de este trabajo, visualizar los posibles cambios ultraestructurales asociados al proceso de descondensación del espermatozoide humano *in vitro* en presencia de heparina y GSH. Al analizar las microfotografías electrónicas de los espermatozoides enteros en diferentes estadios de descondensación de la cromatina, resulta evidente la destrucción y desaparición de la membrana plasmática ante la presencia combinada de heparina y glutatión, mientras que la incubación con estas moléculas por separado no causa el mismo efecto. Acompañando al proceso de descondensación cromatínica, resulta también notable el aumento en el volumen nuclear. La relación causa-efecto entre ambas observaciones no resulta tan evidente, sin embargo recuerda a una forma de muerte celular conocida como oncosis, descrita por primera vez por von Recklinghausen (1910) y que se acompaña de “hinchamiento (swelling)” celular, y de las organelas como también de “blebbing” (ampollado) junto con permeabilidad aumentada (Majno y Joris, 1995). La oncosis es causada, frecuentemente, por isquemia y agentes tóxicos que interrumpen las bombas iónicas de la membrana plasmática (Majno y Joris, 1995). En este contexto, se conoce que la heparina está relacionada con diversos receptores proteicos que controlan la homeostasis del Ca^{2+} (Felix y col., 2007) y podría inhibir la ATPasa dependiente de este catión. En cuanto al posible papel del GSH en este

proceso, se ha demostrado (Ansari y col., 2010) que la suplementación con GSH mejora la calidad de la criopreservación de espermatozoides pero hasta una concentración de 2 mM, con una reducción a partir de esa concentración. El efecto positivo de esta sustancia podría ser consecuencia de su papel antioxidante, previniendo la peroxidación lipídica. Entonces, especulativamente, se podría argüir que la combinación de heparina y glutatión tendría un efecto permeabilizante sobre la membrana, conduciendo a una especie de oncosis con el consiguiente incremento en el volumen nuclear y celular y la subsecuente ruptura de las membranas conjuntamente con la descondensación de la cromatina. En este caso, el proceso no llevaría a una muerte celular sino a permitir la liberación del material genético de las protaminas, ayudado por las características fisicoquímicas del ADN que le otorgan una viscosidad semejante a la de los complejos de proteoglicanos en las articulaciones. Estos complejos, actuando como una esponja, responden al estrés compresivo incorporando o liberando iones y agua, debido a los grupos altamente cargados y fuertemente empaquetados que generan repulsión electrostática. Si bien esto es altamente especulativo, no deja de ser una posible explicación a las imágenes de microscopía electrónica que muestran una destrucción de las membranas, formado posibles “ampollas” ante el aumento significativo del volumen nuclear que acompaña al proceso de descondensación de la cromatina, por un incremento en la permeabilidad de las membranas con ingreso de agua.

Resulta llamativo, por otra parte, que a pesar de carecer de membrana plasmática, el ADN del espermatozoide descondensado, no se dispersa desordenadamente por el resto del preparado, dado que a esta altura, no hay protaminas que favorezcan el empaquetamiento. Cabría recordar entonces que los espermatozoides humanos conservan alrededor de un 15% de histonas en su cromatina (Tanphaichitr y col., 1978; Gatewood y col., 1987), que no fueron reemplazadas por protaminas durante la espermatogénesis y podrían entonces ser éstas, junto con el citoesqueleto, las que evitaran la total desestabilización y desintegración del núcleo durante la descondensación *in vitro*.

El análisis de la microestructura de núcleos espermáticos aislados reveló una situación semejante a la observada en los espermatozoides enteros con respecto a la condensación de la cromatina. No se observan cambios significativos cromatina de aquellos núcleos tratados con heparina o GSH solamente, pero cuando los núcleos son expuestos simultáneamente a ambos agentes, la misma se descondensa paulatinamente a medida que transcurre la descondensación.

Es interesante la presencia de cúmulos oscuros en la periferia de núcleos medianamente descondensados, que desaparecen conforme progresa la descondensación. Estos cúmulos podrían corresponder a cromatina condensada, con restos de protaminas aún no removidas o a regiones teloméricas de los cromosomas que suelen distribuirse en la periferia (Zalensky y *col.*, 1993).

Con el objeto de corroborar que efectivamente la heparina desplaza a las protaminas del núcleo espermático durante la descondensación del espermatozoide humano *in vitro*, analizamos mediante la técnica de *dot blot* los sobrenadantes provenientes de la incubación de núcleos espermáticos aislados en presencia de heparina y tiorreductor. Los resultados obtenidos revelaron que, al coincubar núcleos aislados con heparina y GSH o DTT durante tiempos cortos, tanto la protamina 1 como la protamina 2, son liberadas al medio de incubación. Sin embargo, al coincubar con estos mismos agentes durante tiempos mayores, no se detectan protaminas en el sobrenadante (GSH) o la cantidad detectada es mucho menor (DTT). Este curioso resultado puede interpretarse de diferentes formas. Una explicación posible sería que la heparina presente durante tiempos mayores de incubación, estuviera bloqueando la unión del anticuerpo a la protamina, por interactuar con el epítipo correspondiente, impidiendo así la detección de P1 o P2. Alternativamente, podría pensarse que al aumentar el tiempo de incubación y por ende la mayor cantidad de protaminas desprendidas de la cromatina espermática, se formaría un complejo heparina-protamina insoluble (Chargaff y Olson, 1937), con lo cual al centrifugar, las protaminas desaparecerían del sobrenadante y quedarían junto con los núcleos descondensados en el precipitado. Por ende, no sería posible detectarlas (GSH) o se las detectaría en menor cantidad (DTT) en el sobrenadante analizado por la técnica de *dot blot*. Este comportamiento no se observaría a tiempos cortos porque la cantidad de protamina liberada de la cromatina espermática no sería suficiente para formar un complejo de magnitud tal que resultara insoluble y las protaminas podrían entonces ser detectadas en el sobrenadante.

Más difícil de explicar resulta el hallazgo repetido de una liberación de protaminas fuera de la estructura nuclear, por la sola incubación con GSH, mientras que no se observa lo mismo con DTT sólo y que, además, esa liberación no va acompañada de la descondensación cromatínica. Indudablemente, desde un punto de vista químico, la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas por el GSH produce una desestabilización de la conformación de estas proteínas, generando regiones localizadas de cromatina más laxa. Esta “desestabilización” localizada no afectaría el estado condensado de la cromatina, posiblemente porque las protaminas seguirían ubicadas en su lugar al no estar presente la molécula aceptora (heparina). Estamos en presencia de dos eventos relacionados: por un lado la reducción de los puentes disulfuro modificará la conformación de las protaminas pero, por el otro, todavía se necesitará la presencia de una molécula accesoria que coopere con la remoción de las mismas. Sin embargo, una vez relajada y por ende desestabilizada la estructura ADN-protamina por acción del GSH, podría producirse la salida de protaminas hacia el exterior como resultado del proceso de centrifugación, llevando a la detección de las protaminas en el sobrenadante de incubación como un artificio de técnica. Este artificio no se observaría en presencia de DTT sólo, probablemente debido a que la desestabilización generada por el mismo sería menor, hecho que podría atribuirse por un lado a una cuestión estérica ya que el DTT es una molécula mucho más pequeña que el GSH, y por otro lado a que el DTT no posee grupos cargados negativamente que puedan desestabilizar la unión ADN-protamina como el GSH que, recordemos, es un tripéptido que contiene ácido γ -glutámico en su estructura.

Recordando los objetivos planteados al comienzo de esta tesis, el presente trabajo intentó dilucidar los mecanismos moleculares implicados en la descondensación de espermatozoides humanos, en particular con respecto a la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas por el GSH y la posible modulación de la heparina en este paso. Los resultados presentados, apoyan la hipótesis que durante la descondensación del espermatozoide humano *in vivo*, el heparán sulfato presente en el ovocito no actúa como un simple aceptor de las protaminas, sino que también coopera con el GSH para la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas. En concordancia, la tiorreducción de las protaminas y el intercambio de las mismas por histonas ovocitarias, deberían ser

considerados eventos simultáneos en lugar de secuenciales como se ha sugerido hasta el momento.

Consideración final: una puerta abierta hacia la clínica

Como ya se mencionara, la experiencia obtenida en la clínica a través de las técnicas de fertilización asistida indica que alrededor del 10-15% de los ovocitos que no fertilizan luego de un procedimiento de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), contienen un núcleo espermático condensado en su ooplasma. Tales fallas de descondensación se podrían explicar, por ejemplo, por un aumento de la estabilidad de los tioles libres de las protaminas por algún factor desconocido o por la insuficiente (o nula) cantidad de los agentes fisiológicos descondensantes (GSH y HS) presente en el ooplasma. Dada la importancia del proceso de descondensación de la cromatina de los espermatozoides en el proceso de fecundación, aportar un mayor conocimiento del mecanismo involucrado en dicho proceso podría por un lado contribuir a dar respuestas a casos de infertilidad donde aún se plantean más incógnitas que certezas y por otro, llevar al desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento para estos pacientes.

Con esta idea en mente, nuestro laboratorio ha comenzado a analizar, en colaboración con una clínica de fertilidad (CEGYR), la respuesta *in vitro* a heparina y GSH de espermatozoides de pacientes que hubieran evidenciado una falla aparente en la descondensación al ser inyectados en ovocitos maduros por medio de ICSI. En todos los casos, el ensayo de descondensación estándar tal como se lo describiera en la sección 5 de MM, se realiza sobre una alícuota procedente de la misma muestra utilizada para el procedimiento de ICSI (previa firma de consentimiento informado).

Los resultados preliminares, correspondientes al análisis de 4 pacientes, revelaron que no todos se comportan de la misma manera *in vitro* a pesar de haberlo hecho *in vivo*: los espermatozoides provenientes de 2 pacientes no descondensaron *in vitro*, los de 1 paciente alcanzaron un porcentaje de descondensación del 34%, comparable al de los donantes y los de 1 paciente descondensaron en un 100% *in vitro*, hecho inusual en las muestras de donantes (Figura 46).

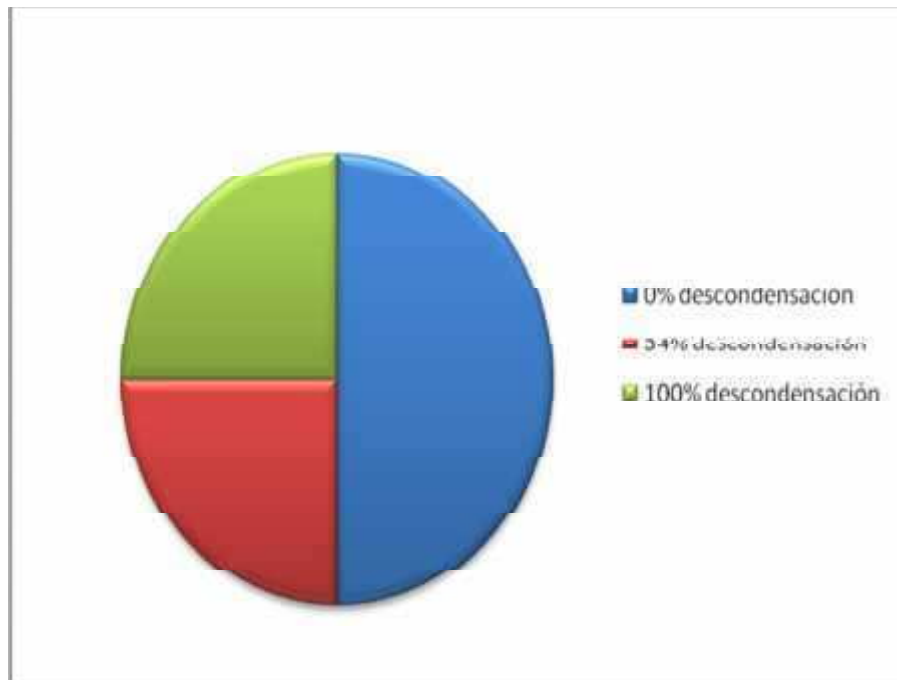


Figura 46. Proporción de muestras de pacientes infértiles con fallas de descondensación en ICSI provenientes de CEGYR que alcanzaron diferentes grados de descondensación *in vitro*.

Estos resultados, si bien no tienen significancia estadística aún, dejan una puerta abierta hacia el desarrollo de nuevas posibilidades terapéuticas para aquellos pacientes infértiles que repetidamente presentan fallas en la descondensación espermática en los procedimientos de ICSI. Se pone así de manifiesto una vez más, que el conocimiento más acabado de los mecanismos moleculares involucrados en los procesos fisiológicos, logrado a través de la investigación básica, sienta las bases para el abordaje de los procesos patológicos, la investigación clínica y el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento.

Bibliografía

- Agarwal A y Allamaneni SS. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol* 2004; 56(3): 235-245.
- Amann RP, Katz DF y Wang C. ¿Qué es el semen? ¿Cómo contribuye el espermograma a evaluar la capacidad reproductiva del varón? En: *Manual de Andrología*. Robaire B, Pryor JL y Trasler JM. Eds. 1994. Capítulo 9: 25-30. Sociedad Americana de Andrología.
- Anahory T, Dechaud H, Bennes R, Marin P, Lamb NJ, Laoudj D. Identification of new proteins in follicular fluid of mature human follicles. *Electrophoresis* 2002; 23(7-8): 1197-202.
- Ansari M S, Rakha B A, Ullah N, Andrabi S M H, Iqbal S, Khalid M, Akhter S. Effect of exogenous glutathione in extender on the freezability of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Animal Science Papers and Reports*. 2010; 28(3): 235-244
- Aslund F, Berndt KD, Holmgren A. Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *J Biol Chem* 1997; 272(49):30780-6.
- Auger J, Schoevaert D, Negulesco I y Dadoune JP. The nuclear status of human sperm cells by TEM image cytometry: nuclear shape and chromatin texture in semen samples from fertile and infertile men. *J Androl* 1993; 14 (6): 456-463.
- Ausió J, Eirín-López JM, Frehlick LJ. Evolution of vertebrate chromosomal sperm proteins: implications for fertility and sperm competition. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65 :63-79.
- Baillie HS, Pacey AA, Warren MA, Scudamore IW, Barratt CL. Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla. *Hum Reprod* 1997; 12(9): 1985-92.
- Balhorn R, Gledhill BL, Wyrobek AJ. Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. *Biochemistry* 1977; 16(18): 4074-80.
- Balhorn R. A model for structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 1982; 93: 298-305.

- Balhorn R, Corzett M, Mazrimas J, Stanker LH, Wyrobek A. High-performance liquid chromatographic separation and partial characterization of human protamines 1, 2, and 3. *Biotechnol Appl Biochem* 1987; 9(1):82-8.
- Balhorn R, Reed S, Tanphaichitr N. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia* 1988 15; 44(1): 52-5.
- Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol* 2007; 8(9): 227.
- Ball GD, Bellin ME, Ax RL y First NL. Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocyte complexes: morphology and chemistry. *Mol Cell Endocrinol* 1982; 28 (1): 113-122.
- Barratt, CLR. Spermatogenesis. En: *Gametes: the spermatozoon*. Cambridge University Press 1995. Capitulo 13: 250-267. ISBN 0-521-47996-7
- Bedford JM, Bent M, Calvin H. Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1973; 33:19–29.
- Bedford JM, Calvin H, Cooper GW. The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 1973; 18:199-213.
- Bedford JM, Cooper GW. Membrane fusion events in fertilization of vertebrate eggs. En: *Membrane Surface Reviews (membrane Fusion)*. Poste G, Nicolson GL, eds. 1978; Vol. 5: 65-125. ISBN 978-0444002624
- Bedford JM. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol Reprod* 1983; 28(1): 108-20.
- Bedford JM, Hoskins DD. The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. En: *Lamming GE, ed. Mashall's Physiology of Reproduction, 4ta.ed. Vol2*. Edingurgh: Churchill Livingstone, 1990: 379-568.
- Bedford, J.M. Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol Reprod* 1998; 59: 1275-1287.
- Bellin ME, y Ax RL. Chondroitin sulfate: an indicator of atresia in bovine follicles. *Endocrinology* 1984; 114 (2): 428-434.

- Bellin ME, Ax RL, Laufer N y col. Glycosaminoglycans in follicular fluid from women undergoing in vitro fertilization and their relationship to cumulus expansion, fertilization, and development. *Fertil Steril* 1986; 45 (2): 244-248.
- Bellvé AR, McKay DJ, Renaux BS, Dixon GH. Purification and characterization of mouse protamines P1 and P2. Amino acid sequence of P2. *Biochemistry* 1988; 27(8): 2890-7.
- Belokopytova IA, Kostyleva EI, Tomilin AN, Vorob'ev VI. Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. *Mol Reprod Dev* 1993; 34(1): 53-7.
- Bench G, Corzett MH, Kramer CE, Grant PG, Balhorn R. Zinc is sufficiently abundant within mammalian sperm nuclei to bind stoichiometrically with protamine 2. *Mol Reprod Dev* 2000; 56(4): 512-9.
- Bergqvist AS, Rodriguez-Martinez H. Sulphated glycosaminoglycans (S-GAGs) and syndecans in the bovine oviduct. *Anim Reprod Sci* 2006; 93(1-2): 46-60.
- Berrios M, Bedford JM. Oocyte maturation: aberrant post-fusion responses of the rabbit primary oocyte to penetrating spermatozoa. *J Cell Sci* 1979; 39:1-12.
- Björndahl L, Kvist U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Hum Reprod* 2010; 16(1): 23-9.
- Bower PA, Yelick PC, Hecht NB. Both P1 and P2 protamine genes are expressed in mouse, hamster, and rat. *Biol Reprod* 1987; 37(2): 479-88.
- Brown DB, Blake EJ, Wolgemuth DJ, Gordon K, Ruddle FH. Chromatin decondensation and DNA synthesis in human sperm activated in vitro by using *Xenopus laevis* egg extracts. *J Exp Zool* 1987; 242(2): 215-31.
- Burns KH, Viveiros MM, Ren Y, Wang P, DeMayo FJ y col. Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science* 2003; 300: 633-636.

- Bustos-Obregon E, Courot M, Flechon JE, Hochereau-de-Reviere MT, Holstein AF. Morphological appraisal of gametogenesis. Spermatogenic process in mammals with particular reference to man. *Andrologia* 1975; 7(2): 141-63.
- Calvin HI, Bedford JM. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil* 1971; 13 (Suppl): 65-75.
- Calvin HI. Comparative analysis of the nuclear basic proteins in rat, human, guinea pig, mouse and rabbit spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1976; 434(2):377-89.
- Calvin HI; Grosshans K., Blake EJ. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: Relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Res* 1986; 14(3): 265–275
- Chargaff E y Olson KB. Studies on the chemistry of blood coagulation. VI. Studies on the action of heparin and other coagulants. The influence of protamina on the anticoagulant effect in vivo. *J Biol Chem* 1937; 122: 153-167.
- Chauvière M, Martinage A, Debarle M, Sautière P, Chevaillier P. Molecular characterization of six intermediate proteins in the processing of mouse protamine P2 precursor. *Eur J Biochem* 1992; 204(2): 759-65.
- Chevaillier P, Mauro N, Feneux D, Jouannet P, David G. Anomalous protein complement of sperm nuclei in some infertile men. *Lancet* 1987; 2(8562): 806-7.
- Cleland WW. Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups. *Biochemistry* 1964; 3 (4):480-482.
- Corzett M, Mazrimas J y Balhorn R. Protamine 1: Protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 519-527.
- Cox, M.; Nelson D. (2004). *Lehninger, Principles of Biochemistry*. Freeman ed. 2004.p.1100. ISBN 0-71674339-6.
- Cross NL, Overstreet JW. Glycoconjugates of the human sperm surface: distribution and alterations that accompany capacitation in vitro. *Gamete Res* 1987; 16(1): 23-35.

- Curry, MR; Watson, PF. Sperm structure and function. En: Gametes: the spermatozoon. Cambridge University Press 1995. Capítulo 3: 45-69. ISBN 0-521-47996-7
- de Yebra L, Oliva R (1993) Rapid analysis of mammalian sperm nuclear proteins. *Anal Biochem* 209: 201–203.
- Delgado NM, Reyes R, Huacuja L, Carranco A, Merchant H y Rosado A. Decondensation of human sperm nuclei by glycosamineglycan-sulfate from sea urchin egg. *J Exp Zool* 1982; 224(3): 457-460.
- Delgado NM, Sánchez-Vázquez ML, Hernández O, Reyes R. Correlation between sperm membrane destabilization by heparin and aniline blue staining as membrane integrity index. *Arch Androl* 1998; 40(2):147-52.
- Delgado NM, Sanchez-Vazquez ML, Reyes R y Merchant-Larios H. Nucleons, I: A model for studying the mechanism of sperm nucleus swelling in vitro. *Arch Androl* 1999; 43 (1): 85-95.
- Delgado NM, Flores-Alonso JC, Rodriguez-Hernandez HM, Merchant-Larios H y Reyes R. Heparin and glutathione II: correlation between decondensation of bull sperm cells and its nucleons. *Arch Androl* 2001; 47 (1): 47-58.
- Enerbäck, L. En Heparin: Chemical and Biological Properties, Clinical Applications (Lane, D. and Lindahl, U., eds.) 1989; 97-113, Edward Arnold, London
- Eriksen GV, Malmstrom A y Uldbjerg N. Human follicular fluid proteoglycans in relation to in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1997; 68 (5): 791-798.
- Favard P, Andre J. The mitochondria of spermatozoa. En: Baccetti B, ed. *Comparative Spermatology*. NY: Academic Press, 1970: 415-29.
- Felix CF, Oliveira VH, Moreira OC, Mignaco JA, Barrabin H, Scofano HM. Inhibition of plasma membrane Ca²⁺-ATPase by heparin is modulated by potassium. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39(3): 586-96.
- Feyerabend TB, Li JP, Lindahl U y Rodewald HR. Heparan sulfate C5-epimerase is essential for heparin biosynthesis in mast cells. *Nat Chem Biol* 2006; 2(4): 195-196.

- Foresta C, Zorzi M, Rossato M y Varotto A. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl* 1992; 15 (4): 330-337.
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM y Schmid CW. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 1987; 236 (4804): 962-964.
- Gebauer H, Lindner HR y Amsterdam A. Synthesis of heparin-like glycosaminoglycans in rat ovarian slices. *Biol Reprod* 1978; 18 (3): 350-358.
- Gopalkrishnan K, Hinduja IN y Kumar TC. In vitro decondensation of nuclear chromatin of human spermatozoa: assessing fertilizing potential. *Arch Androl* 1991; 27(1): 43-50.
- Gordon K, Brown DB, Ruddle FH. In vitro activation of human sperm induced by amphibian egg extract. *Exp Cell Res* 1985; 157(2): 409-18.
- Gusse M, Sautière P, Bélaiche D, Martinage A, Roux C, Dadoune JP, Chevallier P. Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochim Biophys Acta* 1986; 884(1):124-34.
- Green DLP. Sperm trusts and the problem of penetration. *Biol Rev Camb Phil Soc* 1988; 63: 79-105.
- Hammadeh ME, al-Hasani S, Doerr S, Stieber M, Rosenbaum P, Schmidt W, Diedrich K. Comparison between chromatin condensation and morphology from testis biopsy extracted and ejaculated spermatozoa and their relationship to ICSI outcome. *Hum Reprod* 1999; 14(2): 363-7.
- Handrow RR, Boehm SK, Lenz RW, Robinson JA, Ax RL. Specific binding of the glycosaminoglycan 3H-heparin to bull, monkey, and rabbit spermatozoa in vitro. *J Androl* 1984; 5(2): 51-63.
- Hanger-Mcwhirter A, Lindahl U y Li J. Biosynthesis of heparin/heparan sulfate: mechanism of epimerization of glucuronyl C-5. *Biochem J* 2000; 347(1): 69-75.
- Holmgren A. Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 1985; 54: 237-271.
- Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 1989; 264: 13963-13966.

- Homonnai ZT, Matzkin H, Fainman N, Paz G, Kraicer PF. The cation composition of the seminal plasma and prostatic fluid and its correlation to semen quality. *Fertil Steril* 1978; 29(5): 539-42.
- Honda A, Siruntawineti J, Baba T. Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. *Hum Reprod* 2002; 8(5): 405-412.
- Hunter RH. Sperm release from oviduct epithelial binding is controlled hormonally by peri-ovulatory graafian follicles. *Mol Reprod Dev* 2008; 75(1): 167–74
- Hurst RE, Bynum RL, Einfeldt SE, Roy JB. The identification of a heparin-binding protein on the surface of bovine sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 153(1): 289-93.
- Jager S. Sperm nuclear stability and male infertility. *Arch Androl* 1990; 25: 253–259.
- Jackson RL, Busch SJ y Cardin AD. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev* 1991; 71 (2): 481-539.
- Jaffe LF. Sources of calcium in egg activation: a review and hypothesis. *Dev Biol* 1983; 99(2): 265-276.
- Jiménez A, Oko R, Gustafsson JA, Spyrou G, Peltto-Huikko M, Miranda-Vizuete A. Cloning, expression and characterization of mouse spermatid specific thioredoxin-1 gene and protein. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(8): 710-8.
- Jiménez A, Prieto-Alamo MJ, Fuentes-Almagro CA, Jurado J, Gustafsson JA, Pueyo C, Miranda-Vizuete A. Absolute mRNA levels and transcriptional regulation of the mouse testis-specific thioredoxins. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330(1): 65-74.
- Jones DP Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol* 2002; 348: 93–112.
- Julianelli V, Farrando B, Calvo JC, Calvo LP, Romanato M. Nuevas evidencias acerca del proceso de descondensación del espermatozoide humano in vivo. *Medicina* 2011, 71 (III): 213. ISSN 0025.7680

- Kawasaki K, Philpott A, Avilion AA, Berrios M y Fisher PA. Chromatin decondensation in *Drosophila* embryo extracts. *J Biol Chem* 1994; 269 (13): 10169-10176.
- Kim E, Yamashita M, Kimura M, Honda A, Kashiwabara S y Baba T. Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int J Dev Biol* 2008; 52: 677-682.
- Kolk AHJ, Samuel T. Isolation, chemical and immunological characterization of two strongly basic nuclear proteins from human spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1975; 393: 307-19.
- Kosower NS, Kosower EM, Newton GL, Ranney HM. Bimane fluorescent labels: labeling of normal human red cells under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76(7): 3382-6.
- Kosower NS, Kosower EM. Thiol labeling with bromobimanes. *Methods Enzymol* 1987; 143: 76-84.
- Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl* 1992; 13(4): 342-8.
- Kramer JA y Krawetz SA. RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome. *Mol Hum Reprod* 1997; 3 (6): 473-478.
- Kvist U, Eliasson R. Influence of seminal plasma on the chromatin stability of ejaculated human spermatozoa. *Int J Androl* 1980; 3(2):130-42.
- Kvist U. Importance of spermatozoal zinc as temporary inhibitor of sperm nuclear chromatin decondensation ability in man. *Acta Physiol Scand* 1980; 109(1): 79-84.
- Kvist U. Spermatozoal thiol-disulphide interaction: a possible event underlying physiological sperm nuclear chromatin decondensation. *Acta Physiol Scand* 1982; 115(4): 503-5.
- Lalich RA, Vedantham S, McCormick N, Wagner C y Prins GS. Relationship between heparin binding characteristics and ability of human spermatozoa to penetrate hamster ova. *J Reprod Fertil* 1989; 86 (1): 297-302.

- Lapointe J, Bilodeau JF. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biol Reprod* 2003; 68(4):1157–64.
- Lassalle B, Testart J. Sequential transformations of human sperm nucleus in human egg. *J Reprod Fertil* 1991; 91(2): 393-402.
- Li Y, Lalancette C, Miller D, Krawetz SA. Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. *Asian J Androl* 2008; 10 (4):535–541.
- Liu DY, Elton RA, Johnston WI, Baker HW. Spermatozoal nuclear chromatin decondensation in vitro: a test for sperm immaturity. Comparison with results of human in vitro fertilization. *Clin Reprod Fertil* 1987; 5(4): 191-201
- Liu DY, Baker HW. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertil Steril* 1992; 58(6): 1178–1184
- Luberda Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol* 2005; 5(1): 5-17
- Majno, G., Joris, I. Apoptosis, oncosis and necrosis, an overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146 (1): 3–15)
- Maleszewski M. Decondensation of mouse sperm chromatin in cell-free extracts: a micromethod. *Mol Reprod Dev* 1990; 27(3): 244-8.
- Maleszewski M. Behavior of sperm nuclei incorporated into parthenogenetic mouse eggs prior to the first cleavage división. *Mol Reprod Dev* 1992; 33(2): 215-21.
- Matsumoto A. Espermatogénesis. En: *Reproductive Endocrinology, Surgery ad Technology*. Hadashi E, Rock J, Rosenwaks Z (eds). Philadelphia-New Cork. Lippincott-Raven, 1996: 359-384.
- McKay DJ, Renaux BS, Dixon GH. The amino acid sequence of human sperm protamine P1. *Biosci Rep* 1985; 5(5): 383-91.
- Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 711-60.

- Miranda-Vizueté A, Ljung J, Damdimopoulos AE, Gustafsson JA, Oko R, Pelto-Huikko M, Spyrou G. Characterization of Sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *J Biol Chem* 2001; 276(34): 31567-74.
- Montag M, Tok V, Liow SL, Bongson A y Nicolle JC. In vitro decondensation of mammalian sperm and subsequent formation of pronuclei-like structures for micromanipulation. *Mol Reprod Dev* 1992; 33(3): 338-346.
- Moore HDM, Bedford JM. The interaction of mammalian gametes in the female. En: *Mechanism and Control of Animal Fertilization*. Hartmann JF, ed New York: Academic Press; 1983: 453-497. ISBN 978-0123285201
- Nader, H. B. and Dietrich, C. P. (1989) En *Heparin: Chemical and Biological Properties, Clinical Applications* (Lane, D. and Lindahl, U., eds.) 1989; 81-96, Edward Arnold, London.
- Ohsumi K, Katagiri C. Characterization of the ooplasmic factor inducing decondensation of and protamine removal from toad sperm nuclei: involvement of nucleoplasmin. *Dev Biol* 1991; 148(1): 295-305.
- Oliva R, Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1991; 40: 25-94. Review.
- Oliva, R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006; 12(4): 417-35.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 1989; 40(5):1020–5.
- Patrat C, Serres C. Role of the female environment in sperm capacitation. *Gynecol Obstet Fertil* 2009; 37(6): 536-9.
- Pedersen H. Further observations on the fine structure of the human spermatozoon. *Z. Zelforsch* 1972; 123: 305-15.
- Pellicciari C, Hosokawa Y, Fukuda M, Manfredi Romanini MG. Cytofluorometric study of nuclear sulphhydryl and disulphide groups during sperm maturation in the mouse. *J Reprod Fertil* 1983; 68(2):371-6.

- Perreault SD y Zirkin BR. Mechanisms of sperm nuclear decondensation in mammalian oocytes. *J Cell Biol* 1983; 97: 26A.
- Perreault SD, Wolff RA, Zirkin BR. The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *DevBiol* 1984; 101: 160–167.
- Perreault SD, Naish SJ, Zirkin BR. The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content. *Biol Reprod* 1987; 36(1): 239–244.
- Perreault SD, Barbee RR, Slott VL. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol* 1988; 125(1): 181-6
- Perreault SD. Regulation of sperm nuclear reactivation during fertilization. En: *Fertilization in Mammals*. Bavister BD, Cummings J, Roldan ERS (eds). Norwell: Serono Symposia, 1990: 285-296.
- Phillips DM. Mitochondrial disposition in mammalian spermatozoa. *J Ultrastruct Res* 1970; 58: 144-54.
- Philpott A, Leno GH, Laskey RA. Sperm decondensation in *Xenopus* egg cytoplasm is mediated by nucleoplasmin. *Cell* 1991; 65(4): 569-78.
- Philpott A y Leno GH. Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Cell* 1992; 69: 759-767.
- Philpott A, Krude T y Laskey RA. Nuclear chaperones. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11: 7-14
- Pogany GC, Corzett M, Weston S, Balhorn R. DNA and protein content of mouse sperm. Implications regarding sperm chromatin structure. *Exp Cell Res* 1981; 136(1): 127-36.
- Pongsawasdi P, Svasti J. The heterogeneity of the protamines from human spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1976; 434(2): 462-73.
- Portmann F.A, Holden WD. Protamine (salmine) sulphate, heparin, and blood Coagulation. *J Clin Invest* 1949; 28 (6,Pt 2): 1451–8.

- Pradeepa MM y Rao MR. Chromatin remodeling during mammalian spermatogenesis: role of testis specific histone variants and transition proteins. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 63: 1-10.
- Prado A, Ramos I, Frehlick LJ, Muga A y Ausió J. Nucleoplasmin: a nuclear chaperone. *Biochem Cell Biol* 2004; 82: 437-445.
- Reyes R, Magdaleno VM, Hernández O, Rosado A, Delgado NM. Effect of zinc on decondensation of human spermatozoa nuclei by heparin. *Arch Androl.* 1983; 10(2): 155-60.
- Reyes R, Martinez JC, Delgado NM, Merchant-Larios H. Heparin-glutathione III: study with fluorescent probes as indicators of membrane status of bull sperm. *Arch Androl* 2002; 48(3): 209-19.
- Reyes R, Carranco A, Hernandez O, Rosado A, Merchant H, y Delgado NM. Glycosaminoglycan sulfate as acrosomal reaction-inducing factor of follicular fluid. *Arch Androl* 1984; 12 (2-3): 203-209.
- Reyes R, Rosado A, Hernandez O, Delgado NM. Heparin and glutathione: physiological decondensing agents of human sperm nuclei. *Gamete Res* 1989; 23: 39–47.
- Rice P, Garduño R, Itoh T, Katagiri C, Ausio J. Nucleoplasmin-mediated decondensation of *Mytilus* sperm chromatin. Identification and partial characterization of a nucleoplasmin-like protein with sperm-nuclei decondensing activity in *Mytilus californianus*. *Biochemistry* 1995; 34(23): 7563-8.
- Rodriguez-Martinez H, Tienthai P, Suzuki K, Funahashi H, Ekwall H, Johannisson A. Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reproduction (Supplement)* 2001; 58: 129-45
- Romanato M, Cameo MS, Bertolesi G, Baldini C, Calvo JC, Calvo L. Heparan sulfate: a putative decondensing agent for human spermatozoa in vivo. *Hum Reprod* 2003; 18: 1868–1873.

- Romanato M, Regueira E, Cameo MS, Baldini C, Calvo L, Calvo JC. Further evidence on the role of heparan sulfate as protamine acceptor during the decondensation of human spermatozoa. *Hum Reprod* 2005; 20(10): 2784-9.
- Romanato M, Julianelli V, Zappi M, Calvo L, Calvo JC. The presence of heparan sulfate in the mammalian oocyte provides a clue to human sperm nuclear decondensation in vivo. *Hum Reprod* 2008; 23(5): 1145-50.
- Rosemberg RD, Shworak, N. W.; Liu, J; Schwartz, J. J. y Zhang, L. J. Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. *J Clin Invest* 1997; 99: 2062-2070
- Rufas O, Fisch B, Seligman J, Tadir Y, Ovadia J, Shalgi R. Thiol status in human sperm. *Mol Reprod Dev* 1991; 29(3): 282-8.
- Russell DL, Salustri A. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. *Semin Reprod Med* 2006; 24(4): 217-27.
- Salustri, A.; Yanagishita, M. y Hascall, V. C. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *J Biol Chem* 1989; 264 (23): 13840-13847.
- Salz HK, Flickinger TW, Mittendorf E, Pellicena-Palle A, Petschek JP, Albrecht EB. The *Drosophila* maternal effect locus deadhead encodes a thioredoxin homolog required for female meiosis and early embryonic development. *Genetics* 1994; 136(3): 1075-86.
- Shalgi R, Seligman J, Kosower NS. Dynamics of the Thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent Monobromobimane. *Biol Reprod* 1989; 40: 1037-1045
- Shamsi MB, Kumar R y Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res* 2008; 127: 115-123.
- Siegel MS, Bechtold DS, Willand JL, Polakoski KL. Partial purification and characterization of human sperminogen. *Biol Reprod* 1987; 36(4): 1063-8.

- Sutovsky P, Schatten G. Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biol Reprod* 1997; 56 (6): 1503–1512.
- Sutovsky P, Lovercamp K. Molecular markers of sperm quality. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2010; 67: 247-56.
- Szollosi D. Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster eggs. *Anat Rec* 1967; 159(4): 431-446.
- Talevi R, Gualtieri R. Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology* 2010; 73(6): 796-801.
- Tanphaichitr N, Sobhon P, Taluppeth N, Chalermisarachai P. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res* 1978; 117(2): 347-56.
- Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 1984; 42 (1): 87-91
- Tesarik J, Kopečný V. Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Res* 1989; 24(2): 135-49.
- Thérien I, Bergeron A, Bousquet D y Manjunath P. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Mol Reprod Dev* 2005; 71(1): 97-106.
- Tienthai P, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim Reprod Sci* 2004; 80(1-2): 131-46.
- Torregrosa N, Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R. Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum Reprod* 2006; 21(8): 2084-9.
- Turner PR, Jaffe LA y Fein A. Regulation of cortical vesicle exocytosis in sea urchin eggs by inositol 1,4,5-triphosphate and GTP-binding protein. *J Cell Biol* 1986; 102(1): 70-76.

- Usui N y Yanagimachi R. Behavior of hamster nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. *J Ultr Res* 1976; 57: 276-288.
- von Recklinghausen F. Untersuchungen über Rachitis und Osteomalacie. Verlag Gustav Fischer, Jena. 1910 Germany.
- Wallace E, Cooper GW, Calvin HI. Effect of selenium deficiency on the shape and arrangement of rodent sperm mitochondria. *Gam Res* 1983; 7: 389-99.
- Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organisation in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 1991; 44: 569-74.
- Ward WS. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 1993; 48(6): 1193-201.
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. WHO Press, 2010.
- Wiesel, S. y Schultz, G. A. Factors which may affect removal of protamine from sperm DNA during fertilization in the rabbit. *Gamete Res* 1981; 4: 25-34.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. En: Knobil E, Neill J y col. Eds. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988: 135-85
- Yanagimachi R. Stability of the mammalian sperm nucleus. *Zygote* 1994; 2(4): 383-4.
- Yanagishita M.; Rodbard, D. y Hascall, V. C. Isolation and characterization of proteoglycans from porcine ovarian follicular fluid. *J Biol Chem* 1979; 254(3): 911-920.
- Yanagishita M. y Hascall, V. C. Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 1992a; 267 (14): 9451-9454.
- Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M y Pursel VG. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Bio Reprod* 1993; 49(1): 89-94.
- Yoshii T, Kuji N, Komatsu S, Iwahashi K, Tanaka Y, Yoshida H, Wada A, Yoshimura Y. Fine resolution of human sperm nucleoproteins by two-dimensional electrophoresis. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(9): 677-81.

- Zalensky AO, Breneman JW, Zalenskaya IA, Brinkley BR, Bradbury EM. Organization of centromeres in the decondensed nuclei of mature human sperm. *Chromosoma* 1993; 102(8): 509-18.
- Zirkin BR, Soucek DA, Chang TS. Sperm nuclear packing and regulation during spermatogenesis and fertilization. *Johns Hopkins Med J* 1982; 151(3): 101-12.
- Zirkin, B. R., Soucek, D. A., Chang, T. S. K. and Perreault, S. D. In vitro and in vivo studies of mammalian sperm nuclear decondensation. *Gamete Research* 1985; 11: 349–365.