



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Participación de glicosaminoglicanos sulfatados en algunos momentos críticos de la vida post-eyaculación del espermatozoide: modelo humano y murino en ratón.

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

Camila Galotto

Director de tesis: Dr. Juan Carlos Calvo

Directora Adjunta: Dra. Marina Romanato

Consejero de estudios: Dr. Omar Pignataro.

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

Buenos Aires, marzo 2020.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a quienes abrieron las puertas de su corazón y de su laboratorio, y, a lo largo de este camino se convirtieron en una segunda familia para mí, quienes confiaron en que yo podía hacer este doctorado y me enseñaron a hacerlo paso a paso: **JC y Lucre**. Fueron un sostén de todo tipo, desde el comienzo de mi camino en el laboratorio como tesinista de licenciatura hasta ahora que culmina mi tesis doctoral. Gracias por haber dado siempre lo mejor de ustedes, por haber sido tan generosos conmigo tanto en lo académico como en lo personal. Me es muy difícil poner en palabras este agradecimiento, saben perfectamente lo que los quiero y disfruté aprender con ustedes cada paso, por encima de las dificultades. Gracias Juan Carlos por haber abierto las puertas a la investigación, por intentar que “nunca nos falte nada” y por el cariño que demostrás hacia esta vocación científica. Gracias Lucre por tu paciencia, por tus ganas de saber siempre más y por haber sido un sostén increíble a lo largo de este tiempo.

En segundo lugar, agradecerle a quien fue mi guía en la mesada y mi compañera en muchísimos momentos que, por suerte, pudimos vivir juntas: **Mari Romanato**. Gracias por haber aceptado el desafío que significó ser mi directora asistente, por haber transitado codo a codo conmigo cada momento de la experiencia de vida que fue este doctorado. Además de hacer divertido el trabajo en el laboratorio, me enseñaste, una vez más, lo importante que es tomar las frustraciones con humor y sacar lo mejor de los malos momentos. Recorrimos juntas varias estaciones de tren, te agradezco muchísimo y te quiero un montón.

Ahora, me gustaría agradecer a la persona que entró más tarde que yo al laboratorio, pero es una fuente constante de energía inagotable: **Juditha**. Gracias por enseñarme muchísimas cosas, tanto personales como profesionales. Por ser una persona excelente y una compañera espectacular. Agradezco muchísimo que hayas llegado para el empujón final de este camino, es muy lindo ver todos los días alguien tan apasionado por esto que es la ciencia. También, quiero agradecer a quien me acompañó a lo largo del doctorado, con quien compartimos el mismo camino y aprendimos juntas: **Mai**. Gracias por tu compañía de todos los días. Así, además, quiero agradecer por la compañía, el cariño y la dedicación a todas las chicas que estuvieron en el laboratorio de al lado y con quienes es muy lindo trabajar como un gran equipo: **Pau, Pri y Ceci**. A **Maru**, quiero agradecerle, además, por darme la fuerza necesaria para hacer casi juntas este camino final de escritura. A quien está en Exactas, pero es una más del equipo 1234/1273, **Vani Fontana**, fue una alegría enorme conocerte y que seas parte del “grupo soporte” que conformó esta tesis.

Otra de las personas que conocí a lo largo del doctorado y se transformó en una gran amiga es **Meli**, quiero agradecerte por haber sido luz y amor a lo largo de estos años, y por seguir formando parte de mi vida; además de haber trabajado juntas y de haberme enseñado un montón, sos una persona maravillosa, te quiero muchísimo.

A quien fuera mi primera “maestra ciruela”: **Vani Julianelli**, gracias por haber sido quien me acompañara al principio de este camino, quien tan generosamente me ayudó siempre con resultados, procedimientos, dudas y demás, aun no estando físicamente en el laboratorio, se siente la esencia de lo que supiste sembrar. Fuiste, sos y serás una gran mentora para mí, y un ejemplo a seguir, te quiero un montón.

Avanzando por el doctorado, me di cuenta de que el laboratorio no es una burbuja aislada, donde solo se trabaja y se comparte con las personas que allí están, sino que, a lo largo de estos años hemos compartido muchísimos momentos con el laboratorio ampliado que conforma el pasillo (lado Monroe) del IBYME. Quiero en primer lugar agradecer profundamente a quienes son directoras de los laboratorios que están acá: **Ale e Isa**. Gracias Ale por ser luz todos los días,

sonrisas y por tener una fortaleza envidiable. Gracias Isa por ser tan generosa, amorosa y por la compañía hasta altas horas de la tarde en el laboratorio. ¡Las voy a extrañar un montón!

El pasillo también estuvo formado por personas más jóvenes a quienes quiero agradecer por haber formado parte también de este doctorado: gracias, **Ari** por todo tu amor y tu amistad; gracias, **Lu** por haber sido una gran compañera y amiga. Gracias también a la **Colo**, **David**, y los demás integrantes que entran y salen del laboratorio de la Dra. Lüthy, por compartir un montón de momentos, que siempre fueron agradables. Continúo agradeciendo al laboratorio de al lado: gracias, **Luciano** y **Pau** por haber compartido tanto momentos lindos como reactivos. Sigo más allá, para agradecer a **Vivi**, **Belu**, **Flavita**, **Ceci**, **Leo**, ¡fue muy lindo compartir el doctorado con ustedes!

Párrafo aparte merece la dupla de **Eze** y **Fran** a quienes quiero muchísimo, y debo agradecer especialmente toda la “calle” que me dieron en esto que es la ciencia. Gracias Negri por haber traído el sur y ahora los aires europeos, por haberme enseñado a diluir y por haberme acompañado y ayudado siempre que lo necesité. ¡Gracias Franqui por haber llegado al pasillo y llenarnos de paz, amor y *bullying*! Este doctorado de ninguna manera hubiera sido posible sin la presencia de estos personajes, ¿dónde nos juntaremos de ahora en más?

Doblando hacia la derecha, están los laboratorios con quienes también hemos compartido tortas, alegrías, simulacros de evacuación y demás: gracias al laboratorio de la Dra. **Damasia Becú** y sus chicas: **Ana**, **Eleo**, **Feli**, **Cata**, **Belu**; y al laboratorio de la **Dra. Mónica Vázquez Levin** y los suyos: **Gusti**, **Débora**, **Mari Rosso**, **Lu Saucedo**. ¡Ha sido un placer compartir con ustedes este camino! ¡Gracias especialmente **Majo** por tu amistad, paciencia y ganas de charlar de siempre! Otra amiga a la que quiero agradecer y que llegó en un momento súper especial es a **Clemi**, gracias por haber sido el empuje necesario, por los puchitos y las risas.

El IBYME en general fue un lugar muy lindo donde trabajar. Gracias a los laboratorios de “reproductólogos” por el apoyo, la buena onda y los conocimientos compartidos desde hace años hasta ahora: gracias, **Paty**, **Débora**, **Vanina**, **Marianita**, **Mati**, **Nico B**, **Lucas**, **Guille**; fue un placer compartir seminarios y congresos con ustedes. Gracias también al laboratorio de **Mariano**, y a todas las chicas que estuvieron y están: **Anita**, **Lis**, **Guille**, **Pau**, **Jami**, **Marti**, **Flor** y **Clari**. Fue una tesis colaborativa entre ambos laboratorios, gracias por estar siempre que lo necesité.

Gracias a quien ha sido las manos que sacaron muchas de las fotos que se encuentran aquí, con quien hemos compartido minuto a minuto frustraciones y alegrías: **Pablo Pomata**, gracias por toda la paciencia y la amabilidad.

Gracias al laboratorio **Meresman/Barañao**, con quienes también compartimos además de conocimientos y reactivos, risas y alegrías, tortas y mates. Gracias **Gabi**, **Inés**, **Carli**, **Mariel**, **Dani**, **Juani**, **Anita**, **Lu F**.

Gracias al equipo de comunicación del IBYME por abrirme sus puertas y enseñarme a comunicar la ciencia que hacemos todos los días, ¡gracias **Fla**, **Clau**, **Horacio**, **Ema**, **Nico**, **Cin**!

Gracias también a todos los integrantes del **IBYME**, por hacer del mismo un excelente lugar de trabajo. Y, gracias a la **Facultad de Ciencias Exactas y Naturales** quien fue la que me formó en este doctorado. Y, además a mi consejero de estudios: **Omar Pignataro**, junto con los integrantes de mi comité de seguimiento. ¡Muchas gracias por sus enseñanzas!

Saliendo del IBYME y, en colaboración en muchos experimentos, quiero agradecer al equipo del Hospital Italiano de Buenos Aires por toda su buena predisposición y su interés en lo que fuimos

realizando juntos. Gracias al Jefe del Servicio de Ginecología: **Dr. Sebastián Gogorza**. Y muchísimas gracias en especial al **Dr. Santiago Gil**, es un placer trabajar con profesionales como usted. Gracias también a quienes lo acompañan: **Dr. Mariano Uzal** y **Dr. Guido Rey Valzacchi**.

A su vez, quiero agradecer enormemente a quienes nos acompañaron en PROCREARTE, gracias por las ganas de aprender, los conocimientos compartidos y los resultados obtenidos. Muchas gracias al equipo del **Dr. Gastón Rey Valzacchi**. Muchas gracias a **Vanina Julianelli** (nuevamente), **Romina** y **Lorena**, fue un placer realizar esta colaboración y trabajar juntos.

Asimismo, quiero agradecer a los *donantes* sin quienes el desarrollo de esta tesis hubiese sido imposible, ¡gracias por la buena predisposición siempre!

Gracias a las organizaciones que hicieron posible el contar con los recursos necesarios para la realización de este trabajo de tesis doctoral: Fundación Honorio Bigand, CONICET y ANPCYT.

Este doctorado es el cierre de un ciclo que empezó conmigo hace muchos años estudiando la carrera en la facu, donde quienes estuvieron al comienzo siguieron estando al final, y se merecen un GRACIAS enorme por todo este tiempo compartido y por haber sido amigos, hermanos y compañeros en un montón de momentos. Gracias **Tefi, Jordi, Ale, Esme, Juli, Flor** y **Tin**. Gracias también a **Augusto** y **Lu** con quienes además hemos compartido parte del desarrollo de esta tesis juntos, ¡una gran alegría!

También quiero agradecer al colegio y a mis alumnos, especialmente gracias a mis directoras: **Dalila** y **Euge**, por abrirme al mundo de la docencia y entender muchísimas veces que se cruzaba con el de este camino de doctorado.

Casi terminando, quiero agradecer a quienes son y serán el grupo soporte de mi vida, GRACIAS, también en mayúsculas a mis amigas, que siempre estuvieron para abrazarme, apoyarme y ayudarme, en las alegrías y en las frustraciones que viví a lo largo de estos años doctorales. Muchísimas gracias: **Flor, Luchi, Maru** y **Vicki**, ¡son las mejores!

El grupo soporte del doctorado también está conformado por amigos que son parte de la familia: ¡gracias, **Sebas, Gabo, Máximo, Inés, Ceci, Facu** y **Pato**!

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, que es la mejor del mundo entero. Gracias **Oca** por tu compañía y tu aliento a lo largo de toda la carrera.

Gracias a mis hermanos, que son grandes pilares en mi vida, por estar ahí en las buenas y en las malas. Gracias **Félix** por toda tu ayuda, sobre todo, por tu apoyo incondicional. Gracias **Javi** por tu buena onda y tu sonrisa siempre. Gracias **Emi** por ser más que una compañera de vida, por estar siempre conmigo y ayudarme incluso con la concentración necesaria para escribir este trabajo. ¡Los quiero muchísimo! Y agradezco profundamente todo lo que hicieron y hacen por mí, ¡gracias por los mates y las charlas!

Agradecer a las personas que no están es siempre difícil, pero mi vida no hubiera sido la misma sin ellas y creo que, aunque no estén físicamente, desde algún lado están viendo lo que hago y siguen acompañándome. Quiero agradecerle a **Mita**, mi abuela que estuvo ahí, que me aguantó durante noches enteras siguiendo esta carrera y este doctorado; y quien siempre me mimó mucho. A mi **papá**, que espero esté orgulloso desde el cielo y con una sonrisa, ¡gracias por todo el amor que me diste!

Por último, quiero agradecerle a mi **mamá** que es “todo lo que está bien en el mundo”, gracias por todo tu amor, sabiduría, entendimiento y por haberme aguantado en este camino arduo que fue el doctorado. Gracias por enseñarme a amar lo que uno hace y lo que uno vive. ¡Te quiero tanto que me quedan cortas las palabras!

«Supe que ser amado no es nada, que amar, sin embargo, lo es todo. Y creí ver cada vez más claro que lo que hace valiosa y placentera la existencia es nuestro sentimiento y nuestra sensibilidad. Donde quiera que viese en la tierra algo que pudiera llamarse “felicidad”, ésta se componía de sentimientos. El dinero no era nada, el poder tampoco. Veía a muchos que poseían ambas cosas y eran desdichados. La belleza no era nada; veía a hombres y mujeres bellos, que a pesar de toda su belleza eran desdichados. Tampoco la salud contaba demasiado. Cada cual era tan sano como se sentía; había enfermos que rebosaban de vitalidad hasta poco antes de su fin, y personas sanas que se marchitaban, angustiadas por el temor de sufrir. La dicha, sin embargo, siempre estaba allí donde un hombre tenía sentimientos fuertes y vivía para ellos, sin reprimirlos ni violarlos, sino cuidándolos y disfrutándolos. La belleza no hacía feliz al que la tenía, sino al que sabía amarla y venerarla.

Aparentemente existían muy diversos sentimientos, pero en el fondo todos eran uno. A cualquiera de ellos puede llamársele voluntad o cualquier otra cosa. Yo lo llamo amor. La dicha es amor y nada más. El que es capaz de amar es feliz. Todo movimiento de nuestra alma en el que ésta se sienta a sí misma y sienta la vida, es amor. Por tanto, es dichoso aquel que ama mucho. Sin embargo, amar y desear no es exactamente lo mismo. El amor es deseo hecho sabiduría; el amor no quiere poseer, sólo quiere amar».

Hermann Hesse

¡Gracias por todo el amor recibido y por haberlos conocido!

Publicaciones y congresos.

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido publicados tal como se describe a continuación:

- **Human sperm decondensation *in vitro* is related to cleavage rate and embryo quality in IVF.**

C. Galotto; M. Y. Cambiasso; V. L. Julianelli; G. J. Rey Valzacchi; R. N. Rolando; M. L. Rodriguez; L. Calvo; J. C. Calvo and M. Romanato. J Assist Reprod Genet. 2019 Nov 6. doi: 10.1007/s10815-019-01590-y

- **Murine sperm capacitation, oocyte penetration and decondensation following moderate alcohol intake.**

Sánchez MC, Fontana VA, **Galotto C**, Cambiasso MY, Sobarzo CMA, Calvo L, Calvo JC, Cebral E. Reproduction. 2018 Jun; 155(6):529-541. doi: 10.1530/REP-17-0507.

Subsidios:

BID- PICT 2016. Número 117. Título: Medicina traslacional: el proceso de descondensación como posible método diagnóstico y/o herramienta terapéutica para pacientes que presentan infertilidad sin causa aparente. Investigador responsable: Dra. Marina Romanato. Grupo colaborador: **Camila Galotto**, Maite Y Cambiasso, Dr. Gastón Rey-Valzacchi y Dra. Lucrecia Piñeiro.

También fueron comunicados en los siguientes congresos nacionales e internacionales:

1. Octubre 2019

El heparán sulfato y su receptor participan en la interacción entre el espermatozoide humano y el tracto reproductor femenino. Galotto, Camila; Cambiasso, MY; Gil, S; Uzal, M; Gogorza, S; Piñeiro, L; Calvo, JC; Romanato, M. CABA, Argentina. Octubre, 2019.

VIII Congreso Argentino de Andrología (SAA 2019).

2. Noviembre 2018

El heparán sulfato, presente en el segmento ecuatorial del espermatozoide humano, no participa de la descondensación nuclear espermática *in vitro*. Galotto, Camila; Cambiasso, M.; Piñeiro, L.; Calvo, JC; Romanato, M.

LXIII Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC 2018). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Noviembre, 2018. Resumen publicado en: Medicina Vol 78 (Sup III), 385, 2018.

3. Mayo 2017

El heparán sulfato está presente en la superficie del espermatozoide humano y podría participar en la interacción espermatozoide- epitelio oviductal. Camila Galotto; V Julianelli; Y Juárez; S Gil; S Gogorza; Lucrecia Piñeiro; JC Calvo; M Romanato.

Congreso Internacional de Andrología (ICA 2017), Copenhague, Dinamarca. Modalidad: poster.

4. *Noviembre 2015*

Evaluación de la velocidad de descondensación del espermatozoide humano *in vitro* como un parámetro diagnóstico en reproducción asistida. V. L. Julianelli, M. Romanato, G. Rey Valzacchi, R. Rolando, L. Rodríguez, G. Arenas, Camila Galotto, L. Piñeiro, JC Calvo.

LX Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC 2015). Resumen publicado en: Medicina Vol 75 (Supl. II) – 157, 2015

5. *Noviembre 2015*

El heparan sulfato y su rol en el reconocimiento entre el espermatozoide humano y el oviducto. Y.R. Juárez; Camila Galotto; S. Gil; V. Julianelli; S. Gogorza; L. Piñeiro De Calvo; JC Calvo; M. Romanato.

LX Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC 2015). Resumen publicado en: Medicina Vol 75 (Supl. II) – 132, 2015

Cursos realizados

- Seminarios de Fisiología Endócrina y Bioquímica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (FCEyN-UBA). CABA, Argentina. Marzo a diciembre 2017.
- V Curso Bienal de la Sociedad Argentina de Andrología. Fundación Cassará, CABA, Argentina. Abril 2016 a octubre 2017.
- Teoría y Práctica de la interacción entre Ligando y Receptor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (FCEyN-UBA). CABA, Argentina. Octubre 2016.
- Fisiología de la Reproducción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (FCEyN-UBA). CABA, Argentina. Agosto a septiembre de 2016.
- Toxicidad del Oxígeno y Radicales Libres. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (FCEyN-UBA). CABA, Argentina. Marzo a abril de 2016.

RESUMEN

Participación de glicosaminoglicanos sulfatados en algunos momentos críticos de la vida post-eyacuación del espermatozoide: modelo humano y murino en ratón.

El espermatozoide humano transita por diferentes estadios desde que es formado en el testículo: madura en el epidídimo, es eyaculado e ingresa dentro del tracto reproductor femenino donde ocurrirá el proceso de capacitación espermática. El Heparán Sulfato (HS) es una molécula que se encuentra presente en el humano tanto en el complejo *cumulus-oocito* (COC) como en el espermatozoide y, por su parte, el espermatozoide contiene receptores para heparina (análogo funcional y estructural del HS). También está presente en el fluido folicular y en el fluido oviductal/trompas de Falopio, donde podría participar en la regulación de la interacción espermatozoide-oviducto/trompas de Falopio. Esta distribución ubicua del HS plantea, por un lado, la posible colaboración de ambos gametos en el proceso de descondensación espermática *in vivo* y, por otro, la posible participación del HS en otras etapas del proceso reproductivo. Varios glicosaminoglicanos fueron encontrados como mediadores de la interacción entre el espermatozoide y las células oviductales/tracto reproductor femenino en la formación del “reservorio funcional”; la unión de espermatozoides al epitelio oviductal o del tracto reproductor femenino, es mediada por reconocimiento de carbohidratos en numerosas especies. Por esto, nos pareció interesante explorar el rol que cumple el HS y sus receptores en el espermatozoide o en las células del tracto reproductor femenino en la funcionalidad espermática a lo largo de su pasaje por el mismo. Teniendo en cuenta los cambios que suceden en el espermatozoide a lo largo de su vida post-eyacuación, nos planteamos los siguientes objetivos para esta tesis doctoral: **(1)** Evaluar la localización del HS en la superficie de espermatozoides lavados, incubados en condiciones capacitantes o habiendo sufrido reacción acrosomal inducida; **(2)** caracterizar la interacción entre las células epiteliales del tracto reproductor femenino humano y espermatozoides humanos, mediada por HS y sus receptores; **(3)** evaluar el posible rol biológico del HS espermático en el proceso de descondensación nuclear *in vitro*; **(4)** correlacionar el proceso de descondensación nuclear del espermatozoide humano *in vitro* con lo observado en la clínica a través de los procedimientos de fecundación asistida. A la luz de los resultados obtenidos, podemos concluir que **(1)** el porcentaje de espermatozoides humanos que poseen HS en su membrana plasmática disminuye a medida que el mismo transita por los diferentes estadios post-eyacuación. Esto podría estar reflejando que el HS es una molécula fundamental en el proceso de selección de espermatozoides a lo largo del tracto reproductivo femenino. Sin embargo, la presencia de HS en la superficie del espermatozoide humano no está relacionada con el estado de reacción (o exocitosis) acrosomal. Por otra parte, observamos que el HS se encuentra también en la superficie de los espermatozoides de ratón, precisamente en el segmento ecuatorial, independientemente del estado de exocitosis acrosomal en que se encuentre el mismo. Al analizar la interacción entre el espermatozoide humano y diferentes tipos celulares provenientes del tracto reproductor femenino humano *in vitro*, podemos decir que **(2)** tanto el HS como su receptor, presentes en el espermatozoide y en las células del endometrio y de la trompa de Falopio, estarían involucrados en la interacción entre estos tipos celulares. Además, confirmamos **(3)** que el HS del espermatozoide humano no está implicado en la descondensación nuclear y que podría estar involucrado en otros procesos como la fusión con el oocito, siendo el HS oocitario el único responsable de la descondensación. A lo largo de la remodelación de la cromatina espermática, diferentes factores pueden inducir daño en su DNA, como así también alteraciones en la condensación de la cromatina, que han sido asociados a infertilidad masculina. Utilizando dos técnicas que evalúan la funcionalidad del núcleo espermático, como lo son el TUNEL y el ensayo de descondensación fisiológica *in vitro*, descrito en el laboratorio, **(4)** pudimos clasificar a los pacientes infértiles como descondensadores rápidos o lentos y concluimos que los descondensadores lentos tendrían mayor posibilidad de éxito en fecundación asistida (ICSI) si son TUNEL negativos o si utilizan ovodonación. De este modo, la evaluación de la velocidad de descondensación, sumada a otros parámetros de funcionalidad espermática, podría ser una herramienta útil en la toma de decisiones terapéuticas en fecundación asistida.

Palabras clave: Descondensación de la cromatina espermática, heparán sulfato, heparina, espermatozoide, células oviductales, interacción espermatozoide-oviducto, TUNEL.

ABSTRACT

Participation of sulfated glycosaminoglycans in critical moments of the post-ejaculation life of the spermatozoon: human and murine mouse model.

Human spermatozoa go through different stages since their formation in the testis: maturation in the epididymis, ejaculation and entry into the female tract where the sperm capacitation process will occur. Heparan Sulfate (HS) is a sulfated glycosaminoglycan present both in the human *cumulus*-oocyte complex (COC) and in spermatozoa. Also, spermatozoa contain receptors for heparin (functional and structural analogue of HS). In addition, HS is found in follicular and oviductal fluids, where it could participate in the regulation of sperm-oviduct interaction. HS has also been studied as a mediator of very specific ligand-receptor interactions (FGF, HIV, HPV, among others). This ubiquitous distribution of HS raises the possibility that both gametes collaborate in the process of sperm decondensation *in vivo* and the possible participation of HS in other stages of the reproductive process. Several glycosaminoglycans were found to be mediators of the interaction between sperm and oviductal cells in the formation of a "functional sperm reservoir" and the binding of sperm to the oviductal epithelium is mediated by carbohydrate recognition in numerous species. Therefore, we found it interesting to explore the role of HS and HS receptors of spermatozoa and endometrial or oviductal epithelial cells, on sperm function during the transit through the female reproductive tract. Taking into account the changes undergone by the spermatozoon following ejaculation, its journey through the female reproductive tract and our laboratory's expertise in glycosaminoglycan biochemistry, we proposed the following objectives for this thesis: **(1)** to evaluate the location of HS on the sperm surface in washed spermatozoa, spermatozoa incubated under capacitating conditions and acrosome reacted spermatozoa; **(2)** to characterize the interaction between human female tract epithelial cells and human spermatozoa, mediated by HS and its receptors; **(3)** to evaluate the possible role of sperm borne HS in the process of *in vitro* nuclear decondensation; **(4)** to correlate human sperm *in vitro* decondensation with assisted reproduction success in a clinical setting. In the light of the results obtained, we can conclude that **(1)** the percentage of human spermatozoa with membrane bound HS decreases as sperm proceed along the different post-ejaculatory stages. This could be implying that HS plays a fundamental role in the process of sperm selection throughout the female reproductive tract. The presence of HS on the surface of human sperm is not related to acrosomal status. Similarly, HS is present on the surface of mouse sperm, precisely on the equatorial segment, regardless of acrosomal status. Analysis of the interaction between human sperm and different epithelial cell types of the human female tract *in vitro*, suggests that **(2)** the HS and its receptor, present in both spermatozoa and endometrial and Fallopian tube cells could be involved in the interaction between these cell types. We confirmed that **(3)** sperm borne HS is not involved in nuclear decondensation and that oocyte HS is solely responsible for this process, but that it could be involved in other processes such as sperm oocyte fusion. Throughout sperm chromatin remodeling, several factors can damage sperm DNA or alter chromatin condensation, and both have been associated to male infertility. Using two techniques that evaluate sperm nuclear function, such as TUNEL and the human sperm *in vitro* decondensation assay described in our laboratory, **(4)** we were able to classify infertile patients as slow or fast decondensers and conclude that slow decondensers would have a greater chance of success in assisted reproduction (ICSI) if they are TUNEL negative or if they use donor oocytes. Thus, the evaluation of sperm decondensation velocity, taken together with other parameters of sperm function, could be a useful tool to aid decision making in assisted reproduction.

Key words: Sperm decondensation, heparan sulfate, heparin, spermatozoa, oviductal cells, sperm-oviduct interaction, TUNEL.

Tabla de contenido

Agradecimientos.....	2
Cursos realizados.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
Abreviaturas.....	14
Introducción.....	15
La formación del gameto masculino.....	17
Espermatogénesis.....	17
Espermiogénesis.....	19
Estructura del espermatozoide.....	20
El acrosoma del espermatozoide.....	22
El núcleo del espermatozoide.....	24
Condensación de la cromatina espermática.....	25
El espermatozoide en el tracto reproductor femenino.....	30
Capacitación espermática.....	33
Reacción o exocitosis acrosomal.....	39
Fecundación.....	44
Descondensación del núcleo espermático.....	50
Glicosaminoglicanos, en particular HS y su análogo estructural, la heparina.....	53
Funciones HS y HSPGs.....	55
El glicocáliz del espermatozoide.....	58
Fragmentación del DNA del espermatozoide.....	61
Importancia de esta investigación.....	64
I. ___Relevancia del HS en la funcionalidad espermática.....	64
II. ___Implicancias clínicas de la descondensación sobre la funcionalidad espermática.....	65
Hipótesis.....	69
Objetivos.....	71
Objetivos generales.....	72
Objetivo general 1. HS en el espermatozoide y su rol biológico.....	72
Objetivo general 2. Caracterización de la interacción entre las células epiteliales de trompas de Falopio y espermatozoides humanos, mediada por HS y sus receptores.....	72
Objetivo general 3. Correlacionar el proceso de descondensación del espermatozoide humano in vitro con lo observado en la clínica a través de los procedimientos de fertilización asistida, poniendo énfasis en el papel de heparina/HS.....	73
Materiales y métodos.....	74
Muestras de semen de donantes.....	75
Muestras de semen de pacientes.....	76

Utilización de ratones.....	77
Obtención de muestras del istmo de la trompa de Falopio.....	77
Evaluación de parámetros del espermograma.....	78
Concentración espermática.....	78
Motilidad.....	78
Viabilidad.....	78
Procesamiento de la muestra de semen.....	78
Obtención de una fracción altamente mótil.....	79
Incubación en condiciones capacitantes.....	79
Inducción de reacción acrosomal.....	79
Preparación de las distintas condiciones para inmunocitoquímica de espermatozoides humanos.....	79
Inmunocitoquímica de espermatozoides SU, ICC y RAI.....	81
Citometría de flujo.....	81
Cultivo de línea celular de epitelio endometrial humano (células ECC-1).....	82
Cocultivo de células ECC-1 y espermatozoides humanos.....	82
Cultivo primario de células epiteliales de trompa de Falopio humana.....	83
Inmunofluorescencia de células epiteliales del istmo de la TF.....	86
Cocultivo de células epiteliales del istmo de la TF con espermatozoides humanos.....	86
Evaluación de la interacción mediada por HS/receptor para HS en el modelo murino de ratón.....	87
Descondensación de espermatozoides humanos in vitro en presencia de oocitos frescos de ratón (micrométodo).....	89
Ensayo estándar de descondensación espermática.....	91
Ensayo de TUNEL.....	94
Procesamiento de muestras de semen para ICSI.....	96
Donación oocitaria.....	96
Procedimiento de ICSI.....	96
“Score” (puntaje) de calidad embrionaria.....	97
Análisis estadístico.....	97
Resultados.....	98
Inmunocitoquímica de espermatozoides humanos.....	99
Heparán sulfato en diferentes estadios de la vida post- eyaculatoria del espermatozoide humano.....	101
Intensidad de fluorescencia de HS de espermatozoides humanos SU, ICC y RAI.....	107
Cocultivo de espermatozoides y células ECC-1.....	109
Cocultivo de células epiteliales provenientes del istmo de la trompa de Falopio y espermatozoides humanos.....	115
Inmunocitoquímica de HS en espermatozoides de ratón.....	122

Descondensación de espermatozoides humanos in vitro en presencia de oocitos frescos de ratón (micrométodo).....	124
Descondensación del espermatozoide humano in vitro y su posible aplicación a procedimientos de fertilización asistida.....	126
Discusión.....	135
Localización del HS en el espermatozoide humano.....	136
El HS y la interacción del espermatozoide con los epitelios del tracto reproductor femenino.....	139
Modelo murino (en ratón).....	144
Rol del HS espermático en el proceso de descondensación de la cromatina.....	144
Una ventana hacia la clínica: descondensación en presencia de HS e infertilidad.....	145
Conclusión.....	150
Bibliografía consultada.....	152
Anexo.....	173
Determinación de la síntesis de HS en COCs de ratón.....	176
Recuperación de complejo <i>cumulus</i> -oocito de ratón.....	176
Detección de biosíntesis de HS en COCs de ratón.....	176
Aislamiento de proteoglicanos.....	177
Resultados de las cromatografías.....	177
Interacción entre espermatozoides y oocitos de ratón mediada por HS.....	178
Fertilización in vitro (FIV).....	178
Recuperación de espermatozoides murinos para realizar la FIV.....	178
Superovulación y recuperación de oocitos de ratón.....	178
FIV con espermatozoides de los ratones.....	179

Abreviaturas

BSA: albúmina sérica bovina (de las siglas en inglés).

DNA: ácido desoxirribonucleico, en la abreviatura aceptada por la IUPAC.

DS: dermatán sulfato.

FITC: isotiocianato de fluoresceína (de las siglas en inglés).

GAGs: glicosaminoglicanos.

GSH: glutatión reducido.

HASA: heparinasa III de *Flavobacterium heparinum*.

hCG: gonadotropina coriónica humana.

Hep: heparina.

HS: heparán sulfato.

HTF: fluido tubario humano.

ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoide (de las siglas en inglés).

IgG: inmunoglobulina G.

IgM: inmunoglobulina M.

kDa: kilodalton.

P1: protamina 1.

P2: protamina 2.

PBS: solución buffer fosfato (de las siglas en inglés).

PMSG: gonadotropina sérica de yegua preñada (de las siglas en inglés).

RNA: ácido ribonucleico, en la abreviatura aceptada por la IUPAC.

ROS: especies reactivas de oxígeno (de las siglas en inglés).

SDS: dodecil sulfato de sodio (de las siglas en inglés).

TUNEL: sigla en inglés de “marcado de final de corte de dUTP con desoxinucleotidil transferasa terminal”

Introducción

Este trabajo de tesis comenzará recorriendo un largo camino, tal como el que recorre el espermatozoide hasta llegar al oocito.

Evolutivamente, la separación en dos sexos biológicos y la reproducción sexual fueron seleccionadas como herramientas reproductivas, ya que nos confieren la capacidad de eliminar mutaciones deletéreas y, además, aportan mayor variabilidad a las especies. Es bien sabido desde los comienzos de la humanidad que en los seres humanos la única forma de reproducción es la sexual, pero hace relativamente poco tiempo que se conocen las células encargadas de llevarla a cabo.

En 1651, siglos después de Aristóteles a quien podemos considerar el primer embriólogo, William Harvey concluyó que todos los animales se forman a partir de la célula huevo, *Ex ovo omnia*. “A partir del huevo todos” fue el lema en la portada de “Sobre la generación de las criaturas vivas”, excluyendo con esto la idea de generación espontánea de animales a partir de barro o excremento.

En el año 1678, el holandés Anton van Leeuwenhoek observó espermatozoides por primera vez al microscopio, a los cuales llamó animálculos espermáticos (Figura 1). Fue así como retomó las ideas preformistas, ya que en los mismos creyó observar un ser humano miniatura transformando, entonces, al espermatozoide en un ser humano que iba a ser depositado en el recipiente femenino para nutrirse y desarrollarse, dando a entender algo así como que “La humanidad entera nunca estuvo en los ovarios de Eva sino en los testículos de Adán”.

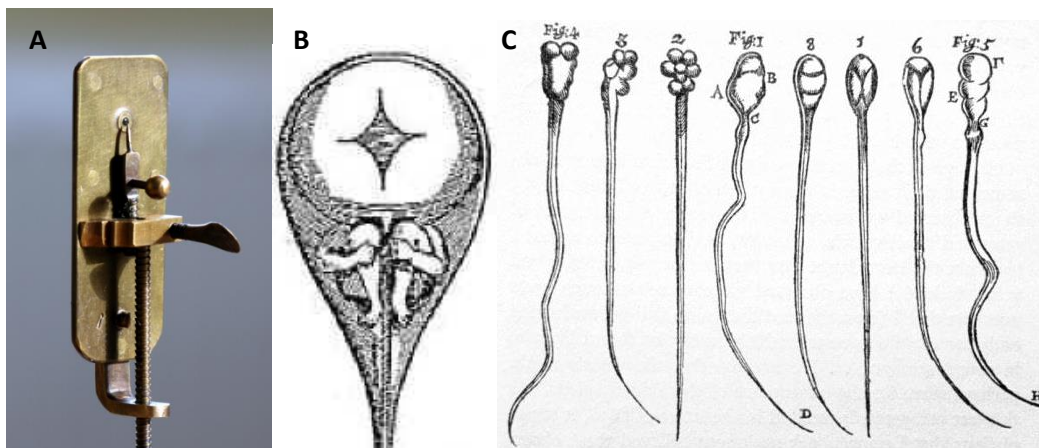


Figura 1. (A) Microscopio óptico de Leeuwenhoek. (B) Representación del animálculo espermático observado. (C) Espermatozoides de conejo y perro dibujados por Leeuwenhoek en 1678.

En el año 1755, Spallanzani demostró que se requieren espermatozoides y oocitos para formar un nuevo individuo. Recién en el año 1883, el belga Edouard van Beneden describe el proceso de

fecundación entre un pronúcleo femenino y un pronúcleo masculino en parásitos y, en 1887, postula el proceso de meiosis.

Jaques Loeb, en 1913, reconoce la función dual del gameto masculino: “El espermatozoide tiene dos tipos de efectos sobre el oocito: en primer lugar, induce el desarrollo promoviendo divisiones celulares y, en segundo lugar, transmite los caracteres paternos al embrión en desarrollo”. (Parrington et al., 2019).

Hoy sabemos que la fecundación es un proceso complejo que consta de distintas etapas, cada una de las cuales debe suceder de manera precisa para que la formación del embrión sea exitosa. Estudiar con detalle cada etapa, así como también los diversos factores que pueden afectarla, es de crucial importancia para aportar el conocimiento de esta sucesión de eventos afortunados que culminarán, nada menos que en la formación de un nuevo individuo y las posibles soluciones, cuando algo falle en este camino.

La formación del gameto masculino.

Espermatogénesis.

El primer evento que debe ocurrir a lo largo del trayecto de vida del espermatozoide es su formación; ocurre en los túbulos seminíferos del testículo y engloba una serie de procesos complejos que culminarán con la producción de un gameto masculino completamente diferenciado (Figura 2). El proceso comienza a partir de la diferenciación de células madre (espermatogonias) a espermatocitos por división mitótica y la producción de espermátides haploides a partir de espermatocitos primarios tetra haploides por división meiótica (Hao et al., 2019). Al final de la espermatogénesis ocurrirá un proceso de diferenciación, conocido como espermiogénesis, que dará lugar al espermatozoide propiamente dicho. La síntesis de RNA y proteínas es máxima durante la meiosis y disminuye abruptamente hasta niveles indetectables durante la espermiogénesis (Bustos Obregón et al., 1975).

Durante la espermatogénesis participan, además, otros tipos celulares que se encuentran dentro de los túbulos seminíferos. Las células de Leydig (en el espacio intersticial) son las productoras de testosterona, necesaria para el mantenimiento de la espermatogénesis (Kornbluth & Fissore, 2015), iniciada por acción de la FSH hipofisaria sobre las células de Sertoli. Las células de Sertoli, ubicadas en la base del túbulo seminífero y que presentan como característica fundamental la capacidad de formar uniones estrechas entre sí, dan sostén a las células germinales a lo largo de toda su etapa de

desarrollo y contactan con todos los restantes tipos celulares. Las espermatogonias se posicionan entre las células de Sertoli y la membrana basal, mientras que otras células de la progenie (espermaticitos, espermátides, etc.) se sitúan entre las células de Sertoli o están embebidas en su citoplasma. Se forman así dos compartimientos en los túbulos seminíferos: un compartimiento basal que permite acceder a sustancias que se encuentran en circulación y en donde se encuentran las espermatogonias, y un compartimiento adluminal por encima de las uniones estrechas (barrera hemato-testicular), cuya composición es regulada por las células de Sertoli, esenciales para la espermatogénesis (Johnson et al., 2008) y en el cual se encuentran las células en diferentes estadios de la espermatogénesis (Barratt, 1995). Cuando finaliza la espermiogénesis, las extensiones citoplasmáticas de la célula de Sertoli se rompen y se libera el espermatozoide (Figura 3).

Todo el proceso hasta la liberación de espermatozoides especializados al lumen de los túbulos seminíferos dura entre 42 a 76 días dependiendo la especie (Misell et al., 2006). La producción estimada por hombre es de 150 a 275 millones de espermatozoides por día (Neto et al., 2016).

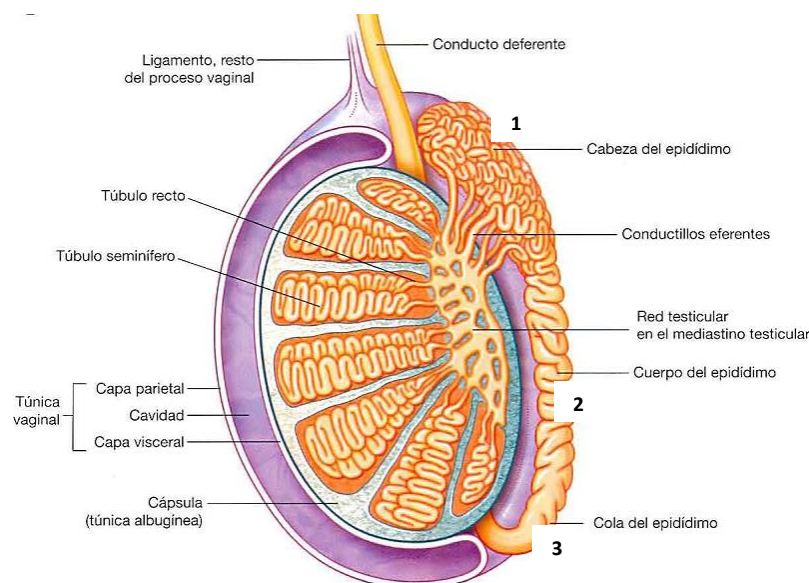


Figura 2. Esquema del testículo y epidídimo en donde se muestra la anatomía de los túbulos seminíferos. 1: desde la *rete testis* varios ductos eferentes delgados permiten el pasaje de los espermatozoides desde el testículo hacia la región del *caput* (cabeza del epidídimo). **2:** el diámetro de los túbulos seminíferos se amplía en la región del *corpus* (cuerpo del epidídimo) mientras se produce una disminución del grosor del epitelio. **3:** el túbulo seminífero en el *cauda* (cola del epidídimo) y en el *vas deferens*, es menos intrincado que en el *caput* y el diámetro del túbulo es mucho más amplio para permitir el almacenamiento de los espermatozoides.

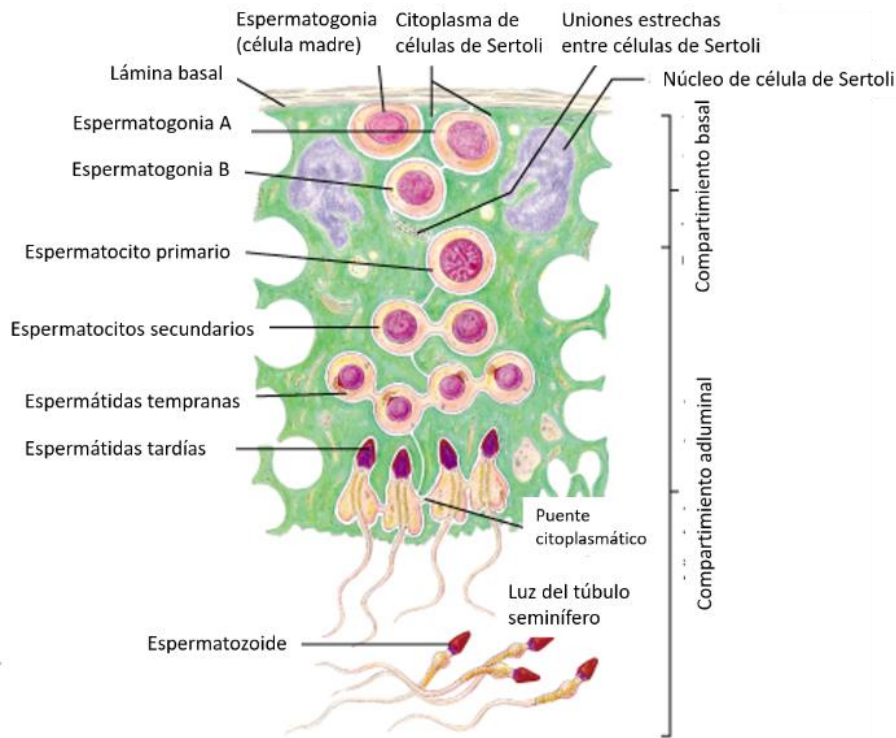


Figura 3. Espermatogénesis dentro del túbulo seminífero en humanos. Se observa cómo ocurre la espermatogénesis desde el compartimiento basal de los túbulos seminíferos hacia el luminal, finalizando con un espermatozoide anatómicamente completo. Tomado y modificado de Pearson Education Inc., Benjamin Cummings, 2003.

Espermiogénesis.

Durante este proceso, la espermátide desarrolla el citoesqueleto básico del espermatozoide y las distintas organelas celulares se reorganizan y modifican sustancialmente, dando lugar así a una célula altamente diferenciada desde el punto de vista morfológico, capacitada para llevar a cabo exitosamente su función reproductiva. Luego de esta diferenciación, los espermatozoides se dirigen del testículo hacia el epidídimo y es en este órgano donde adquirirán la capacidad fecundante potencial y cierta motilidad, a través del proceso conocido como maduración epididimaria. Estos espermatozoides maduros son los que serán eyectados a través del canal eyaculador hacia la uretra y, finalmente, hacia el exterior del pene (Figura 4).

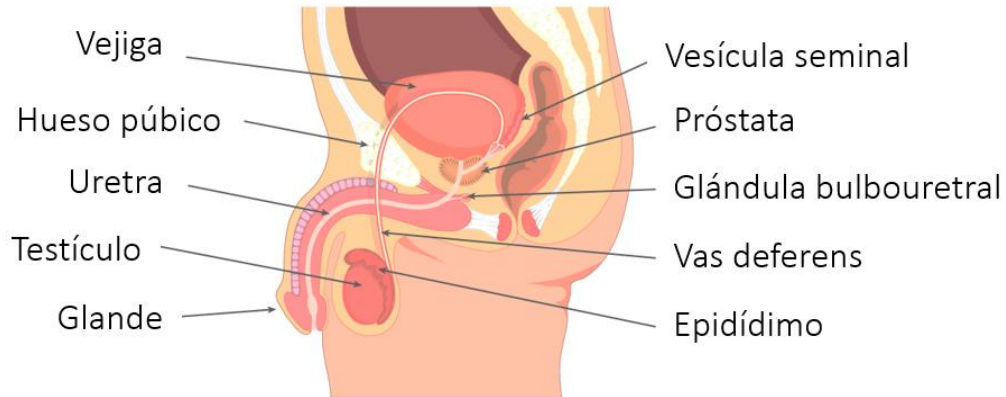


Figura 4. Sistema reproductor masculino. Se pueden observar los distintos órganos que forman el aparato reproductor. Los espermatozoides se forman en el testículo, maduran en el trayecto a lo largo del epidídimo, luego pasan por el vas deferens y la uretra hasta ser eyectados por el pene.

Estructura del espermatozoide.

El espermatozoide de mamíferos puede separarse en dos regiones morfológicas bien definidas: cabeza y cola (o flagelo), ambas unidas por el cuello (Figura 5).

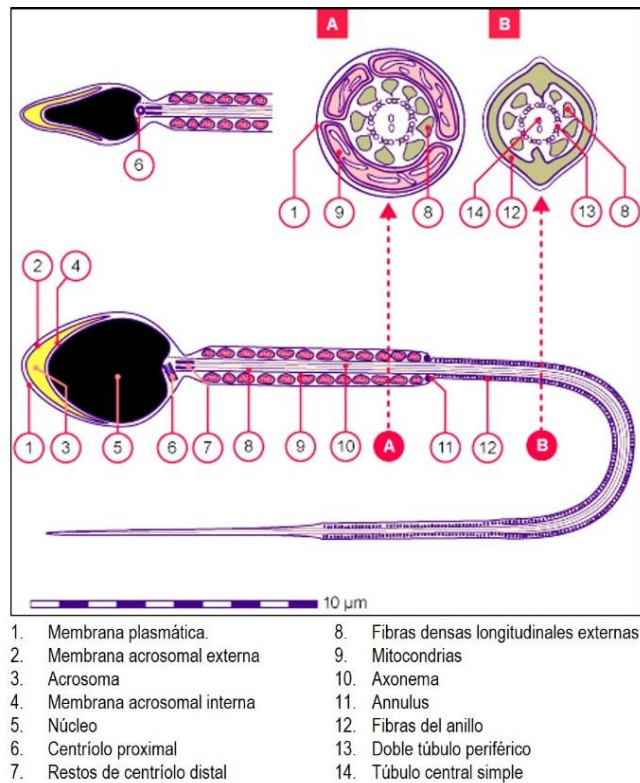


Figura 5. Representación esquemática de un espermatozoide maduro. Se pueden observar todas las estructuras del espermatozoide y dos cortes transversales en dos fragmentos del flagelo. Tomado y modificado de <http://www.embryology.ch/genericpages/moduleembryoen.html>

La cabeza del espermatozoide contiene estructura entre las que se encuentran el núcleo, que ocupa la mayor parte de la cabeza, el acrosoma y la región post-acrosomal (Figura 6). 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, son extremadamente variables entre especies. La evolución en tamaño y forma del gameto masculino fue conducida por dos fuerzas selectivas principales: la competencia espermática y la biología reproductiva de la hembra (Sanchez et al., 2013). Mientras que para el espermatozoide humano la forma es ovalada o espatulada, para el espermatozoide de ratón es falciforme (con forma de hoz).

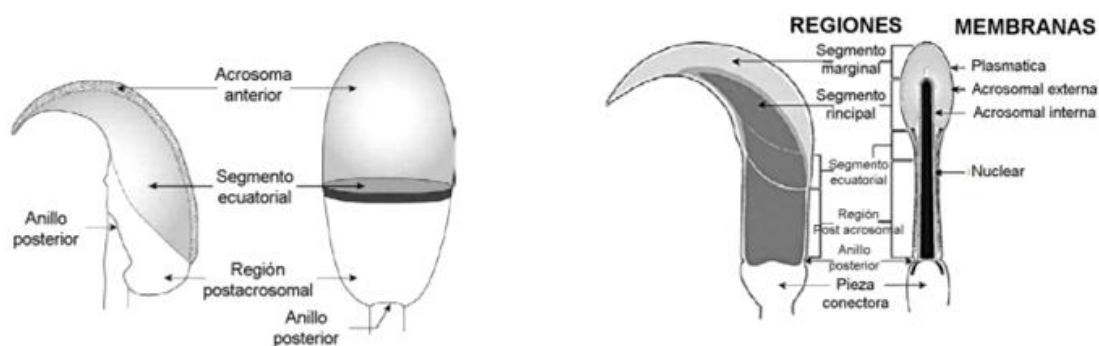


Figura 6. Cabeza del espermatozoide. A: se muestran las estructuras generales de la cabeza de un espermatozoide falciforme (izquierda) y otro con forma espatulada (derecha). B: se muestran las regiones y las membranas de un espermatozoide falciforme.

En el humano, la cabeza tiene un largo aproximado de 5 a 6 μm y un ancho de 2,5 a 3 μm . El acrosoma es una vesícula que contiene enzimas líticas en su interior y se forma por la fusión de vesículas provenientes del aparato de Golgi (Martinez-Menárguez et al., 1996). Divide a la cabeza en dos grandes regiones: acrosomal y post-acrosomal. Se delimita por una membrana acrosomal que, de acuerdo con su ubicación se denomina membrana acrosomal interna (adyacente a la membrana nuclear) o externa (adyacente a la membrana plasmática) (Figura 7). El anillo posterior, ubicado tras la región post-acrosomal, se forma por unión circunferencial entre la membrana plasmática y la membrana nuclear y, al igual que el *annulus* del flagelo, constituye una barrera física entre los dominios de las membranas plasmática y nuclear. Representa, además, el mayor punto de separación entre el flagelo y la cabeza (Curry et al., 1995).

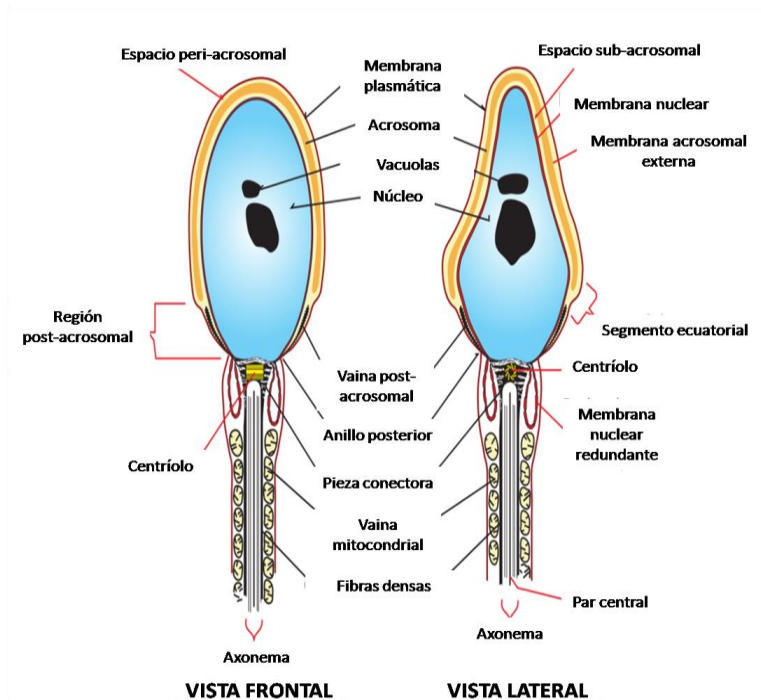


Figura 7. Detalle de la cabeza de un espermatozoide. En el esquema se observa: acrosoma, núcleo, segmento ecuatorial, región post acrosomal y cuello, y las membranas acrosomal externa e interna, nuclear y plasmática. (Tomado y modificado de [https:// commons. wikimedia. org/ wiki/ File: Complete_ diagram_ of_ a_ human_ spermatozoa_ en. svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Complete_diagram_of_a_human_spermatozoa_en.svg))

El acrosoma del espermatozoide.

El acrosoma comienza a formarse durante las primeras etapas de la espermiogénesis. Durante esta fase, el flagelo se elonga desde un polo de la célula definiendo su polaridad. El acrosoma se forma a partir de gránulos del aparato de Golgi y comienza a ubicarse por encima del núcleo (Figura 8). Se cree que las vesículas membranosas, cuyos productos parecen ser procesados a través del aparato del Golgi y repartidos en forma de vesículas, se fusionan unas con otras para formar una sola vesícula que se asocia íntimamente con la envoltura nuclear. A medida que la espermiogénesis continúa, las membranas forman un “capuchón” mientras que su contenido acrosomal se acumula, al mismo tiempo que ocurre la condensación nuclear (Tulsiani et al., 1998). El acrosoma en animales euterios consiste en dos compartimentos, un gran segmento anterior donde se encuentra la matriz que contiene las enzimas y un segmento posterior más pequeño y delgado llamado segmento ecuatorial (Fléchon, 2015). La matriz acrosomal, formada por componentes solubles y elementos particulados (Buffone et al., 2008; Foster et al., 1997; Kim et al., 2001; Westbrook-Case et al., 1994), contiene enzimas que degradan proteínas y glúcidos complejos (Ito & Toshimori, 2016). Entre ellas, la hialuronidasa y la acrosina son las mayoritarias. La membrana acrosomal que subyace a la membrana plasmática recibe el nombre de membrana acrosomal externa mientras que la

membrana que se sitúa sobre la envoltura nuclear se denomina membrana acrosomal interna. Las membranas acrosomal externa (MAE) y plasmática están en estrecha proximidad (O'Brien et al., 1994); sin embargo, no hay interacciones obvias entre estas dos estructuras hasta que el espermatozoide es estimulado en la proximidad del oocito, para sufrir el proceso de exocitosis acrosomal que se describirá más adelante (Buffone et al., 2014; Hirohashi, 2016; La Spina et al., 2016).

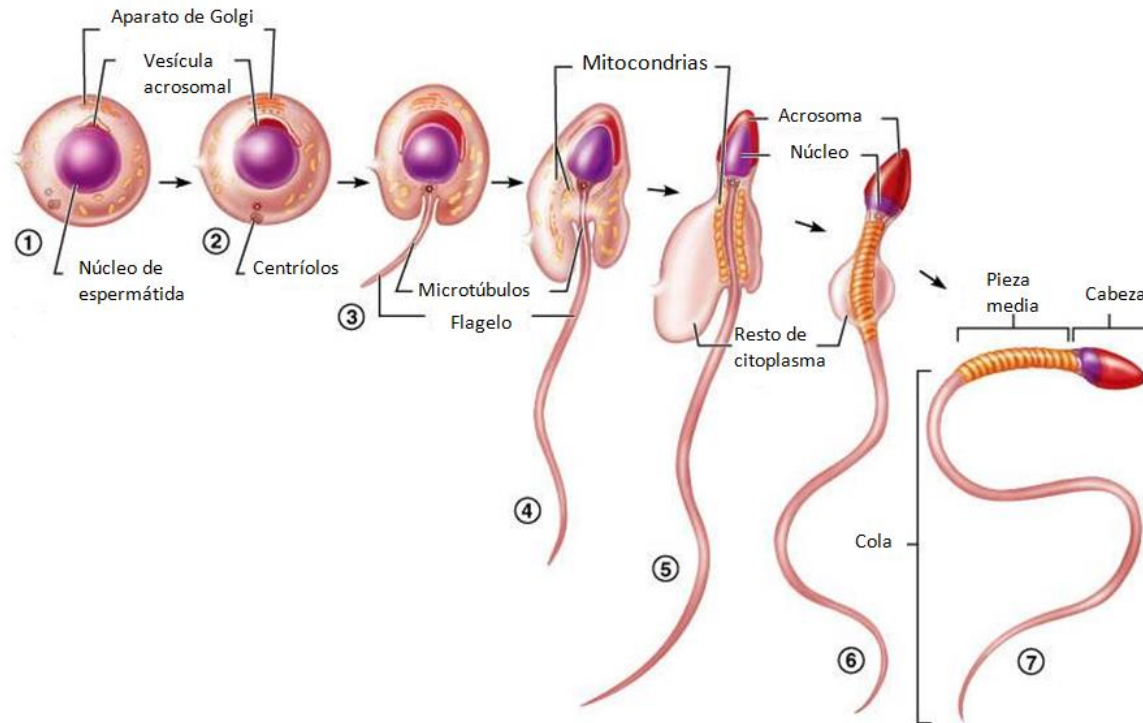


Figura 8. Esquema de diferenciación espermática. Se observa cómo una espermátide se diferencia hasta espermatozoide en el testículo. 1) Espermátide no diferenciada. 2) Comienzo de polarización celular. 3) Espermátide temprana. 4) Espermátide diferenciada, con el flagelo ubicado hacia la luz del túbulo seminífero. 5) Se termina de formar el acrosoma. 6) Se pierde la última gota de citoplasma del espermatozoide. 7) Espermatozoide formado con todas sus piezas: cabeza, pieza media y cola (Esquema modificado de Pearson, Benjamin Cummings, tomado de internet).

Directamente por debajo del acrosoma y separándolo del núcleo, hay una fina capa de material citoplasmático estabilizado por puentes disulfuro que forma la teca perinuclear. La función de la misma es unir el acrosoma al núcleo y se cree que también está involucrada en la activación del oocito una vez que ocurre la fecundación (Oko & Sutovsky, 2009).

En el cuello están localizados los centríolos: el centríolo proximal se sitúa en la parte basal del núcleo y el centríolo distal da origen a los microtúbulos del axonema.

La cola del espermatozoide se divide en cuatro regiones: pieza conectora o cuello (0,5 μm), pieza media (3,5 μm), pieza principal (50 μm) y pieza final (3 μm), lo que hace que el espermatozoide tenga un largo total aproximado de 60 μm . Estas regiones están compuestas por diferentes estructuras, que pueden o no estar presentes en cada una. El axonema, que constituye la base del aparato locomotor del espermatozoide, está compuesto por un par central de microtúbulos rodeado por nueve dobletes, dando una simetría de 9+2, que se extiende a lo largo de la totalidad de la cola del espermatozoide. Este axonema está protegido por fibras densas asociadas a microtúbulos y se extiende desde la pieza media hasta algún punto en la pieza principal (Figura 9). La pieza media contiene la vaina mitocondrial, formada por un número de mitocondrias, específico según la especie, distribuidas de manera helicoidal alrededor del axonema, que constituyen la fuente de energía para el movimiento del flagelo. La pieza principal se caracteriza por tener una vaina fibrosa que rodea a los microtúbulos y a las fibras densas asociadas, mientras que la pieza terminal está formada solo por axonema sin fibras densas asociadas.

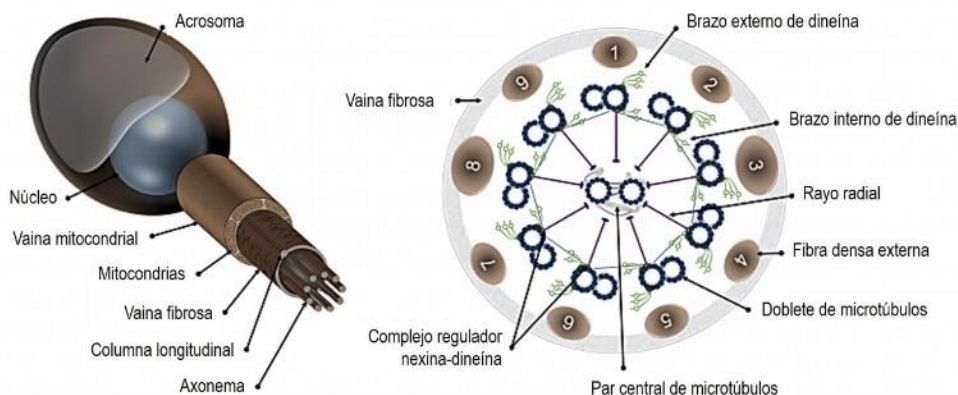


Figura 9. Representación esquemática del espermatozoide de mamíferos y la estructura del flagelo. Panel izquierdo: vista general del espermatozoide donde se muestran los principales segmentos de la cabeza y del flagelo. Panel derecho: corte transversal de la pieza principal del flagelo donde se muestra la organización del axonema: dobletes de microtúbulos, par central, rayo radial, complejo regulador nexina-dineína, brazos de dineína internos y externos, junto con algunas estructuras peri-axonémicas como la vaina fibrosa, la fibra densa externa y las columnas longitudinales. Adaptado de (Touré et al., 2020).

El núcleo del espermatozoide.

El núcleo es singular, ya que contiene la información genética en forma de cromatina altamente condensada debido a su compactación por protaminas, tal como se menciona a continuación. Es así, que se postula que no habría replicación ni transcripción en el espermatozoide (Balhorn, 2007). La inactividad transcripcional del núcleo hace que el gameto masculino sea dependiente de

modificaciones post-traduccionales, tal como la fosforilación de proteínas, para adaptar su función de acuerdo con las necesidades.

Condensación de la cromatina espermática.

En las células germinales masculinas, la arquitectura de la cromatina pasa por una *remodelación* dramática durante la maduración de espermátides a espermatozoides, cuando una cierta cantidad de histonas es sustituida por protaminas.

Estas protaminas son proteínas básicas, más pequeñas que las histonas y que pueden formar puentes disulfuro intracatenarios y entre las dos protaminas que aparecen, comúnmente, asociadas a esta cromatina condensada.

Este proceso lleva al ensamble de una arquitectura nuclear única, donde la cromatina es organizada de manera muy estable con estructuras en forma de toroide, lo que resulta en una cromatina seis veces más condensada que en el núcleo somático. Para lograr esto, las histonas pasan por una hiperacetilación que reduce su afinidad de unión al DNA y, así, promueve su desplazamiento. Luego de la hiperacetilación, las histonas son primero reemplazadas por proteínas de transición y luego por protaminas. Sólo un pequeño porcentaje del DNA (alrededor del 15% en espermatozoides humanos) queda asociado a las histonas, manteniendo la estructura de nucleosomas. Esta alta compactación en la estructura de la cromatina garantiza que el espermatozoide maduro adquiera una forma nuclear hidrodinámica y que el genoma paterno sea transportado de manera segura e intacto hacia el oocito (Seisenberger et al., 2013). La *remodelación* de la cromatina tiene también un rol pivotante en la reprogramación epigenética del DNA paterno luego de la fecundación. Las protaminas se unen con mucha afinidad al DNA y los puentes disulfuro entre los residuos de cisteína de las protaminas adyacentes (y los internos) condensan aún más la cromatina espermática. En humanos hay dos tipos de protaminas: protamina 1 (P1) y protamina 2 (P2) y defectos en su expresión o procesamiento pueden alterar la condensación de la cromatina del espermatozoide y afectar la fertilidad masculina (Muratori & De Geyter, 2019).

Los espermatozoides de mamíferos tienen dos proteínas nucleares mayoritarias, protaminas e histonas. Las protaminas son predominantes, están compuestas de 27 a 65 aminoácidos y están enriquecidas en aminoácidos muy básicos como arginina y cisteína. Las histonas remanentes están altamente acetiladas. Los humanos y los ratones poseen 2 tipos de protaminas, P1 y P2, y ambas son esenciales para la fertilidad.

Hay dos modelos generales para la asociación entre las protaminas y el DNA. El modelo ampliamente aceptado sugiere que las protaminas están presentes en una configuración extendida y se colocan en el surco mayor de la hélice de DNA, provocando que el DNA se empaquete en forma de toroide en lugar de solenoide. La mayor parte de la cromatina del espermatozoide está compactada en toroides que contienen aproximadamente 50 kb de DNA. Cada toroide de protamina-DNA forma un dominio de bucle, y estos están apilados lado a lado. Se cree que esta conformación toroidal le otorga protección a la cromatina contra el daño oxidativo y otras moléculas nocivas dentro del tracto reproductor femenino (Figura 10).

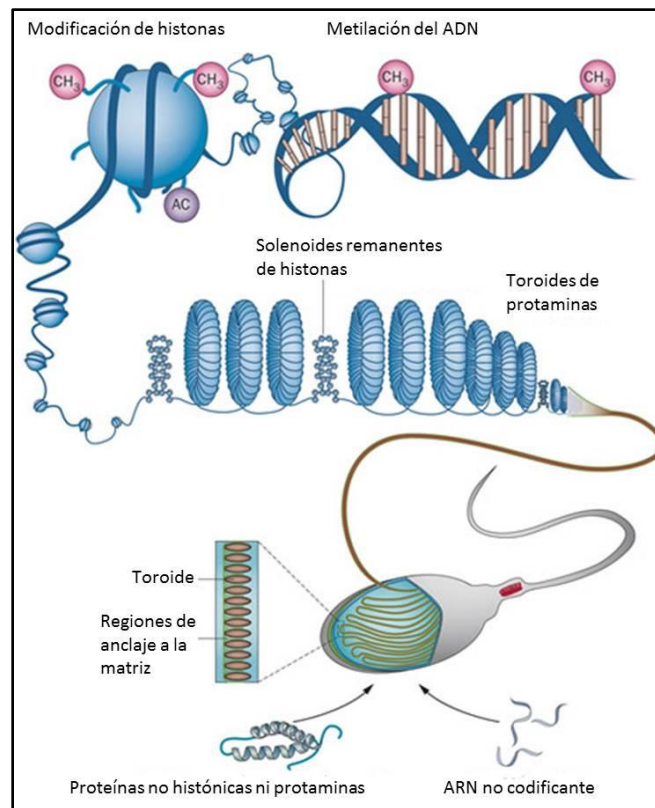


Figura 10. Empaquetamiento del DNA en el espermatozoide humano. La forma de solenoide adquirida al ser el DNA compactado por histonas se pierde en su gran mayoría y es reemplazada por un empaquetamiento en forma de toroide, más compacto, gracias a las protaminas. Finalmente, en la cabeza del espermatozoide habrá 80% protaminas, 5% de histonas, otras proteínas y RNA no codificante. Tomado y adaptado de (Schagdarsurengin et al., 2012).

Aunque la gran mayoría del DNA está empaquetado por protaminas, una pequeña cantidad (menos del 5 % en ratones y entre 10-15 % en humanos) permanece asociado a histonas (Meyer-Ficca et al., 2013), y el DNA está fuertemente asociado a una matriz nuclear de proteínas a intervalos de, aproximadamente, 50 kb. Las histonas están distribuidas de manera no azarosa en el genoma del espermatozoide y asociadas a genes específicos. Los segmentos de DNA unidos a histonas están

dispersos a lo largo del genoma paterno, mayormente en promotores de los genes (Arpanahi et al., 2009). Esto puede permitir que los espermatozoides transmitan las características estructurales de la cromatina basada en histonas y las histonas con modificaciones específicas del espermatozoide a oocitos recién fecundados, incluyendo tanto la cromatina unida a histonas como las regiones de unión a la matriz en el pronúcleo paterno recién formado. Se ha sugerido que la organización de la matriz nuclear es necesaria para la replicación del DNA en el embrión de una célula, con la cromatina unida a histonas identificando los genes paternos importantes para el desarrollo embrionario. La cromatina es estabilizada por la formación de puentes disulfuro entre las protaminas en hebras de DNA adyacentes. Defectos en la integridad del DNA espermático están asociados a fragmentación del DNA y apoptosis (Plant & Zeleznik, 2015).

La condensación nuclear tiene lugar en forma de gradiente desde la zona apical hacia la zona caudal de la cabeza del espermatozoide (De Vries et al., 2012). El primer paso de la transición de histonas a protaminas consiste en el reemplazo de las histonas del espermatozoide por proteínas básicas ricas en lisina llamadas proteínas de transición TP1 y TP2. TP1 es una proteína pequeña de 54 aminoácidos con una distribución uniforme de aminoácidos básicos, con capacidad de desestabilizar la doble hélice del DNA. TP2 es una proteína de 115 aminoácidos que tiene distintos dominios estructurales con numerosos residuos básicos hacia el extremo carboxilo terminal, mientras que hacia el extremo amino terminal contiene motivos con dedos de zinc y actúa de mejor manera estabilizando y condensando al DNA. Experimentos previos demostraron que TP2 aparece temprano en la espermátida y se une preferencialmente a secuencias CpG asociadas a dominios promotores de los genes, mediante su actividad dependiente de zinc que le da mayor afinidad por estas regiones (Lévesque et al., 1998). Además, dado que las islas CpG se encuentran presentes en estas regiones, se cree que la unión de TP2 tendría como consecuencia la represión de la actividad transcripcional, un evento que coincide con la aparición de las proteínas de transición (Kundu et al., 1996). En cambio, TP1 que aparece un día después, parece estimular la reparación de las rupturas simple cadena del DNA, sugiriendo que podría actuar uniéndose a las rupturas que ocurren durante la remoción de las histonas hasta que sean reparadas. Luego de la remoción de las histonas y la reparación del DNA, se depositan las protaminas en la cromatina de las espermátidas elongadas para completar la compactación de la misma y asegurar, de esta manera, que el genoma permanezca inactivo hasta que el oocito sea activado luego de recibir el material genético paterno (Brewer et al., 2002).

Las protaminas contienen una serie de dominios ricos en arginina que se unen al esqueleto fosfodiéster del DNA de un modo independiente de la secuencia de bases, neutralizando así sus cargas negativas. La remodelación de la cromatina, entonces, tiene como fin la formación de un toroide de 50 kb aproximadamente, en forma de “*doughnut*” (dona) 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 & Bedford, 1971; D’occhio et al., 2007). La conformación asociada a las regiones del DNA con histonas remanentes, se pliega para organizar la estructura nuclear específica de espermatozoides (Figura 10), la cual es mantenida por su asociación con la matriz nuclear en determinados sitios, también específicos (Santi et al., 1994) llamados MAR (del inglés: “matrix attachment region” o región de anclaje a la matriz). Se cree que en las regiones del DNA que se unen a la matriz nuclear se encuentran los genes activos (Ward, 1993). La organización estructural que incluye tanto a las histonas unidas al DNA como a los MARs, probablemente sea transmitida al pronúcleo paterno luego de la fecundación, indicando la necesidad de su presencia para una embriogénesis normal (Figura 11).

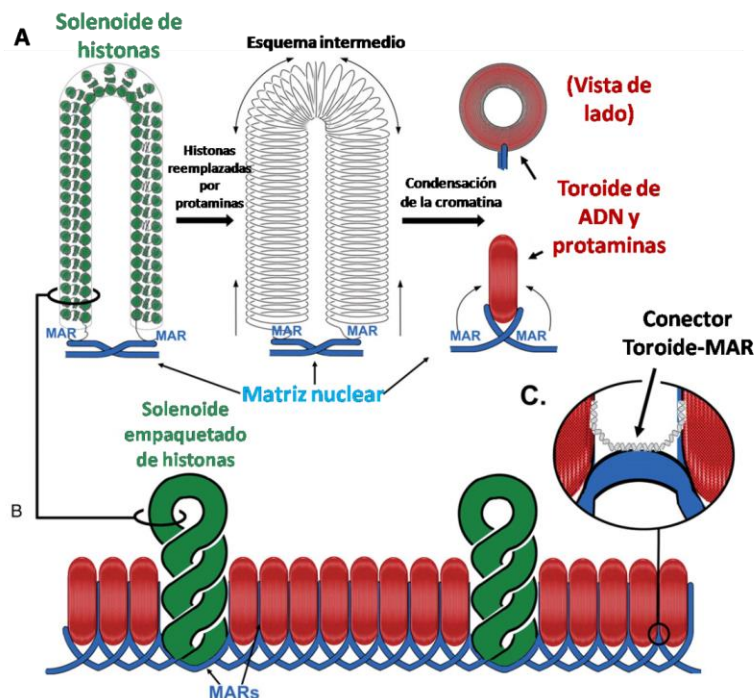


Figura 11. Principales elementos estructurales de la cromatina del espermatozoide. **A:** durante la espermiogénesis, las histonas son reemplazadas por protaminas, que condensan el DNA en forma de toroides altamente compactos. Cada protamina del toroide es un dominio de “loop” (la parte A de esta figura está modificada de una figura similar publicada por Ward y col 1993). **B:** los toroides son organizados lado a lado. Evidencia reciente sugiere que algunos fragmentos del DNA retienen histonas (solenoide verde). **C:** las cadenas del DNA que se unen a los toroides de protaminas son sensibles a nucleasas, y también podrían estar unidas a histonas. Modificado de Ward, 2009.

Cabe señalar que cualquier problema en la transición de histonas a protaminas puede alterar la condensación del DNA y modificar marcas epigenéticas generando cambios en el epigenoma del espermatozoide (Soubry et al., 2014), lo cual a su vez puede tener consecuencias severas en el desarrollo embrionario temprano. Se ha observado una asociación entre la variación en los niveles de metilación del DNA del espermatozoide y la configuración de anomalías en el DNA, donde las protaminas tienen una función significativa en la preservación de las marcas de metilación en los gametos masculinos (Filipponi & Feil, 2009).

Tal como se dijera previamente, hay 2 tipos de protaminas: P1 y P2. Las P1 poseen un gran contenido de cisteína y arginina y se encuentran presentes en todas las especies de vertebrados estudiadas (Balhorn, 2007; Bellvé et al., 1988; Boweret al., 1987; Gusse et al., 1986; McKay et al., 1985; Oliva & Dixon, 1991; Steger & Balhorn, 2018; Yoshii et al., 2005), mientras que las P2 están presentes en especies como el humano, el ratón y el toro (Balhorn et al., 1987; Hamilton et al., 2019; Kolk & Samuel, 1975; Pongsawasdi & Svasti, 1976), poseen histidina además de cisteína y arginina y pueden unir zinc, formando estructuras tridimensionales del tipo “dedos de zinc” (Bench et al., 2000; Pradeepa & Rao, 2007; Reyes et al., 1983). La cantidad de protaminas en relación al DNA es constante entre especies, pero la relación P1/P2 es variable (Corzett et al., 2002) y se cree que las especies que contienen ambos tipos de protaminas descondensarían más rápidamente que aquellas que poseen sólo un tipo de protamina (Perreault et al., 1988a; Perreault et al., 1987) (Tabla 1).

Especie	Protaminas
Humano	1 y 2 (50%)
Mono	1 y 2
Ratón	1 y 2 (67%)
Chinchilla	1 y 2
Hámster sirio	1 y 2 (33%)
Hámster armenio	1
Hámster chino	1
Rata	1
Toro	1

Tabla 1. Diferencias interespecie en el contenido de protaminas espermáticas. La proporción de protamina 2 (si se conoce), se da entre paréntesis. (Modificado de Perreault, 1990).

En ratones transgénicos con defectos en la expresión de protaminas se observan alteraciones estructurales del núcleo espermático, que resultan en diferentes grados de infertilidad (Cho et al., 2001). En humanos, se ha relacionado la alteración de la proporción P1/P2 o la ausencia de P2 a fallas en la fecundación (Balhorn et al., 1988; Belokopytova et al., 1993; de Yebra et al., 1993) y se han encontrado mutaciones en los genes de las protaminas en pacientes infértiles. Se ha propuesto que alteraciones en la relación P1/P2 generarían un empaquetamiento anormal de la cromatina lo que, a su vez, resultaría en una alteración de la fertilidad (Steger et al., 2008).

La proporción de histonas y proteínas transicionales en núcleos de espermatozoides eyaculados es considerablemente mayor en los hombres infértiles que en los hombres fértiles (Auger et al., 1993). Por otra parte, hay evidencias de que niveles alterados de protaminas podrían provocar un aumento de la susceptibilidad al daño del DNA espermático, causando infertilidad (Oliva, 2006), y que dicho aumento podría tener su origen en el efecto nocivo del aumento en especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre una cromatina deficientemente compactada (Agarwal et al., 2004; Shamsi et al., 2008).

El zinc está involucrado en la estructura y función del espermatozoide (Kerns et al., 2018). Iones de zinc ingresan a las células espermatogénicas en las últimas etapas de diferenciación de las espermatidas, donde son incorporados al núcleo (Barney et al., 1968) y a las fibras densas nacientes (ODF) (Baccetti & Afzelius, 1976; Bedford & Calvin, 1974). Aún más, Zn^{2+} se incorpora al núcleo al momento de la eyaculación (Björndahl et al., 1986). El Zn^{2+} nuclear se asocia a las protaminas para formar puentes de zinc, preferentemente con grupos imidazol de histidina y tioles de cisteína (Porath et al., 1975), para estabilizar la estructura de la cromatina del espermatozoide (Björndahl & Kvist, 2010, 2011).

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 capacidad de síntesis (Bedford & Hoskins, 1990).

El espermatozoide en el tracto reproductor femenino.

NOTA: debido a que en muchas partes de la introducción se hará referencia a datos en humanos y/o ratón, por una cuestión de simplicidad (y comprendiendo la diferencia anatómica y funcional) se usará en forma indistinta y/o complementaria: oviducto y trompa, o sus variantes gramaticales.

Idealmente, los espermatozoides eyaculados por un hombre entrarán dentro del tracto reproductor femenino. En primer lugar, deberán superar la barrera del moco cervical, para entrar en contacto con el útero, más precisamente, con las células epiteliales del endometrio. En el momento de la cópula, los espermatozoides son inmóviles, o poseen una motilidad muy reducida, razón por la cual se acepta que los mismos son arrastrados hacia el cérvix como consecuencia de las contracciones musculares del tracto reproductor femenino. Las contracciones uterinas facilitan, luego, el transporte de los espermatozoides a través del útero (Molina et al., 2018) hacia las trompas de Falopio en el humano. En el ratón, deben atravesar la unión útero-tubaria (UTJ) para ingresar al oviducto, donde interactuarán íntimamente con las células epiteliales oviductales (CEO) y se almacenarán conformando un reservorio oviductal en el istmo (Suarez, 2005). El epitelio del istmo genera un microambiente que estabiliza al espermatozoide por un tiempo determinado hasta que se desencadena la ovulación, momento en el cual factores femeninos estimulan la liberación del espermatozoide del istmo hacia la *ampulla* donde, finalmente, se encontrará con el oocito (Figura 12).

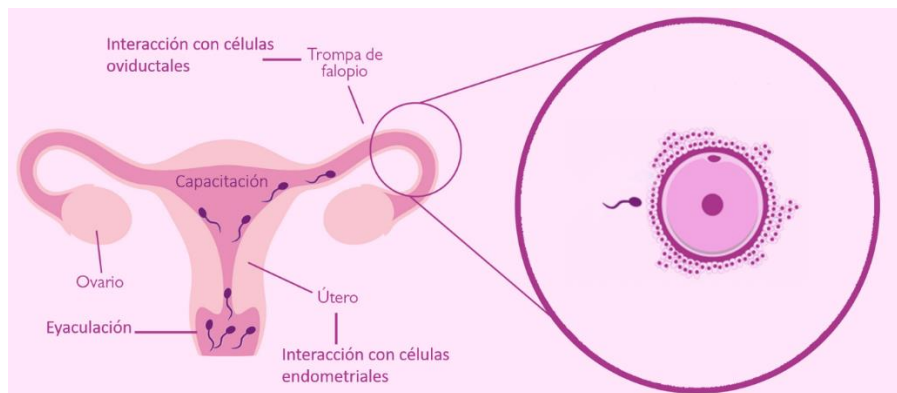


Figura 12. Esquema del trayecto de los espermatozoides a lo largo del tracto reproductor femenino hasta llegar al sitio de fecundación. Los espermatozoides son eyaculados dentro de la vagina, ascienden hasta el útero, donde interactúan con células endometriales. Comienza la capacitación, que finaliza con la formación del reservorio oviductal en la trompa de Falopio, hasta que, idealmente, el espermatozoide se encuentra con el oocito recientemente ovulado, y se produce la fecundación.

La liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal es gradual, de tal manera que se reduzca el número de espermatozoides disponibles en el sitio de fecundación, haciendo que la proporción *in vivo* espermatozoide:ooocito sea 1:1 o aún menor (Yanagimachi, 1994), minimizando así las posibilidades de que ocurra polispermia. Los espermatozoides son guiados hacia el oocito por secreciones del oviducto, las células del *cumulus* o el propio oocito y el avance hacia el sitio de

fecundación (*ampulla*) depende no solo del transporte pasivo llevado a cabo por el fluido oviductal, sino también de la motilidad de los espermatozoides (Demott & Suarez, 1992).

La peristalsis adovárica y el flujo de fluidos ayudan a dirigir a los espermatozoides hacia la *ampulla*. En las especies que ovulan más de un oocito, es sabido que hay pocos espermatozoides alrededor de los mismos durante la progresión de la fecundación hasta que todos los oocitos son fecundados (Cummins & Yanagimachi, 1982; Muro et al., 2016). Esto no significa, necesariamente, que solo unos pocos espermatozoides llegan a la *ampulla*. Es más probable que, tanto espermatozoides vivos como muertos, sigan ascendiendo por el oviducto antes, durante e incluso después de la fecundación. Cuando un complejo *cumulus*-oocito está en la *ampulla*, los espermatozoides vivos son captados por el *cumulus* y entran dentro de los oocitos (Bedford & Kim, 1993; Hino et al., 2016). Incluso después de que todos los oocitos fueron fecundados, los espermatozoides que no participaron en la fecundación son drenados fuera del cuerpo del animal, son fagocitados por las células epiteliales (Austin, 1957; Chakraborty & Nelson, 1975) o continúan ascendiendo por el oviducto y drenan dentro de la cavidad peritoneal.

Si bien la *ampulla* es el lugar donde ocurre la fecundación (Suarez & Pacey, 2006), poco se conoce acerca de cómo el espermatozoide interactúa con la pared del oviducto/trompas de Falopio *in vivo* en esa región. A través de experimentos *ex vivo* e *in vitro*, se identificaron patrones de movimiento flagelar del espermatozoide y de unión del espermatozoide a la *ampulla* diferentes a aquellos observados en el istmo (Ardon et al., 2016; Chang & Suarez, 2012); sin embargo, se desconoce si estos patrones son iguales a los que ocurren *in vivo*. Hay aspectos fundamentales, tales como el comportamiento que exhibe el espermatozoide previo a la fecundación y el rol que juegan las cilias del oviducto en la regulación de los comportamientos espermáticos, que permanecen sin resolver (Suarez, 2016; Wang & Larina, 2018). Se cree que, a través de experimentos *in vivo*, que la dinámica ciliar en la *ampulla* puede producir las señales mecánicas necesarias que regulan los comportamientos de los espermatozoides (Wang & Larina, 2018).

El oviducto/trompa de Falopio no es un simple tubo, sino que provee el microambiente ideal para que el espermatozoide se prepare para la fecundación, soporta la fecundación en sí y el desarrollo preimplantacional de los cigotos (Coy et al., 2012; Growe et al., 2013; Hunter, 1998; Hunter, 2012; Hino & Yanagimachi, 2019). El fluido oviductal (OF) está formado por la secreción de las células epiteliales y también por el trasudado del plasma sanguíneo que contiene glicosaminoglicanos, metabolitos, aminoácidos, sales inorgánicas y proteínas (Avilés et al., 2010; Leese et al., 2001; Leese

et al., 2008). Se ha demostrado que el proteoma oviductal en diversas especies cambia con los diferentes estadios del ciclo estral (Lamy et al., 2016; Soleilhavoup et al., 2016), la presencia de gametas (Georgiou et al., 2005) o la presencia de embriones (Smits et al., 2017). El proteoma de las células epiteliales oviductales también se ha estudiado en humanos (Wang et al., 2016) y en cerdos (Seytanoglu et al., 2008). Muchos trabajos sugieren que los genes que codifican para proteínas involucradas en la interacción entre el espermatozoide y el oocito deben atravesar un proceso de coevolución que también correlacionaría con las tasas evolutivas por los cambios compensatorios tanto en el espermatozoide como en el oocito (Claw et al., 2014). En el trabajo de Moros (2018) y en otro previo (Meslin et al., 2015) se hipotetiza que también la coevolución de proteínas se extiende a las proteínas del fluido seminal y del fluido oviductal (Moros-Nicolás et al., 2018).

Los espermatozoides tienen interacciones eficientes con el tracto reproductivo femenino que influyen sobre el embarazo y el desarrollo embrionario (Fazeli, 2008). Aproximadamente entre 40-50 % de todas las causas de infertilidad ocurren por factor masculino y, en consecuencia, parámetros espermáticos anormales (Kumar & Singh, 2015) que podrían resultar en una interacción deficiente entre el espermatozoide y el tracto reproductor femenino, valorizando así el estudio de esta interacción ya que deficiencias en las mismas podrían ser una posible causa de infertilidad (Zandieh et al., 2019).

Capacitación espermática.

Los espermatozoides recientemente eyaculados de los mamíferos, que ingresan al tracto reproductor femenino, no son capaces de fecundar al oocito, pues la capacidad fecundante que les confiere la maduración epididimaria es tan solo de carácter “potencial”; adquieren su capacidad fecundante en el tracto reproductor femenino, tras permanecer en él por cierto tiempo. El proceso que hace al espermatozoide competente para fecundar un oocito consiste en una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos denominados, en su conjunto, “capacitación espermática” (Austin, 1951; Austin & Braden, 1952; Chang, 1951; Yeste et al., 2013). La capacitación espermática es exclusiva de los espermatozoides de mamíferos. Aunque han pasado 60 años desde su descubrimiento, los mecanismos moleculares que la producen quedan aún por elucidarse por completo (Fujihara et al., 2018).

Durante el proceso de capacitación, ocurren grandes cambios en todos los compartimientos del espermatozoide: los factores originados en el fluido epididimario y el plasma seminal se pierden o redistribuyen, el colesterol y otros esteroides son removidos de la superficie espermática, otros

lípidos y proteínas de membrana se reorganizan, el flujo de iones induce modificaciones bioquímicas (entre ellas el incremento en el pH intracelular), los espermatozoides sufren hiperactivación de la motilidad y se inician complejas señales de transducción (de Lamirande et al., 1997) (Figura 13). Estas modificaciones crean de manera conjunta un ambiente de membrana más fluida, haciendo al espermatozoide competente para la fecundación (Ikawa et al., 2010).

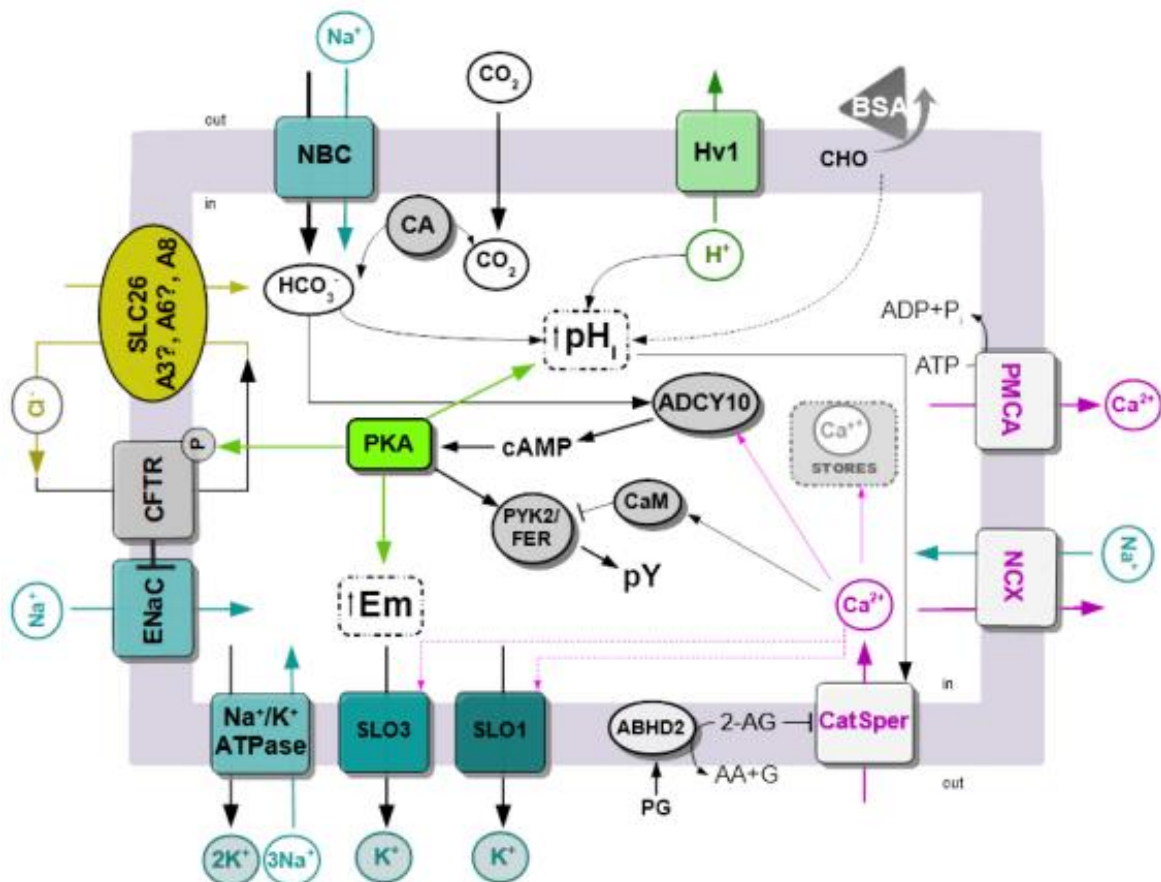


Figura 13. Modelo simplificado de los caminos de señalización involucrados en la capacitación espermática en humanos. ATPasa Na⁺/K⁺, bomba Na⁺/K⁺ ATPasa; SLO1 y 3, canal de K⁺ 1 y 3 específico de espermatozoide; ENaC, canales Na⁺ epiteliales, CFTR, canal de fibrosis quística regulador de la conductancia transmembrana; SLC26, transportador (“carrier”) de soluto 26, aún no hay evidencia de que A3 y A6 estén presentes en el espermatozoide humano maduro; Hv1, canales dependientes de voltaje H⁺; BSA, albúmina sérica bovina; CHO, colesterol; CA, anhidrasa carbónica; PYK2/FER, tirosina quinasa 2 rica en prolina; ADCY10, adenilil ciclasa soluble atípica; EPAC, proteína de intercambio activada por AMPc; CaM, calmodulina; CatSper, canal de Ca²⁺ específico de espermatozoide; NCX, intercambiador Na⁺/Ca²⁺; PMCA, ATPasa Ca²⁺ de membrana plasmática; PG, progesterona; ABDH2, dominio hidrolasa α/β conteniendo proteína 2; 2-AG, 2-araquidonoilglicerol; AA, ácido araquidónico; G, glicerol. Tomado de Molina et al., 2018.

En condiciones *in vitro*, se observó un aumento en la fosforilación en tirosina de proteínas durante la capacitación, siendo esta misma un sensor intracelular de la entrada de Ca²⁺ a través de la regulación del pH citoplasmático (Brukman et al., 2019). Existe una subpoblación de espermatozoides en la cual aumenta la [Ca²⁺]_i muy rápidamente durante la capacitación,

fundamentalmente por la entrada de calcio extracelular mediada por el transportador CatSper, aunque no se descartan otros sistemas de transporte (Luque et al., 2018).

La adquisición de motilidad hiperactivada durante la capacitación es crítica para la fecundación ya que facilita la liberación de los espermatozoides del reservorio oviductal y la penetración del *cumulus oophorus*, de la matriz extracelular que rodea al oocito y, también, de la ZP (Demott & Suarez, 1992). La hiperactivación de la motilidad fue definida por Yanagimachi en el año 1994, como un patrón de nado característico observado en la mayoría de los espermatozoides extraídos de la *ampulla* luego de la fecundación (Yanagimachi, 1994). El flagelo de los espermatozoides hiperactivados se mueve trazando una curva más profunda y, usualmente, su batido es menos asimétrico que el de los de espermatozoides activados. Como resultado de esto, los espermatozoides hiperactivados vistos sobre un portaobjetos nadan en círculo vigorosamente (Figura 14).

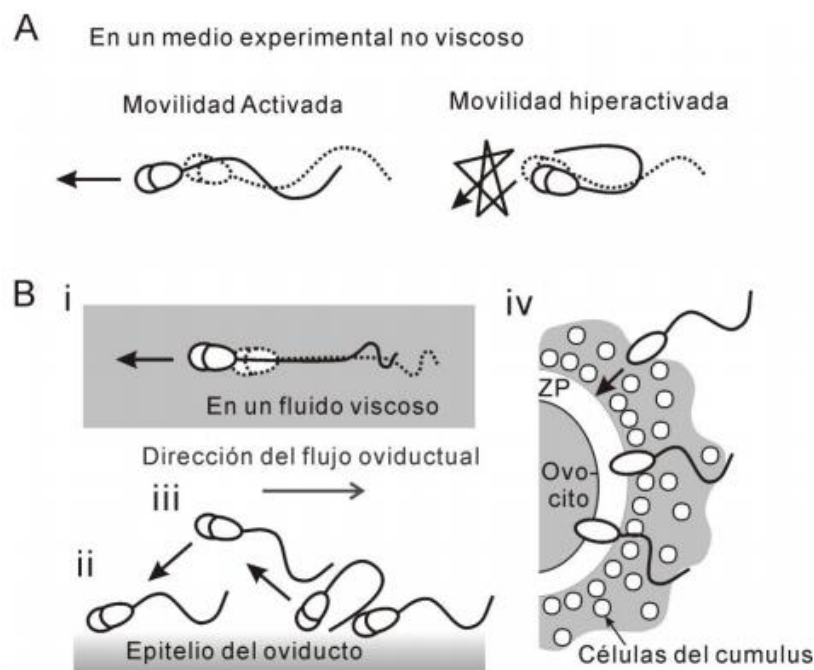


Figura 14. Propiedades y funciones de la hiperactivación del batido flagelar en mamíferos. Se puede observar el patrón de movimiento de los espermatozoides en las diferentes condiciones. Tomado de Nishigaki et al., Revista Iberoamericana en Ciencias. ISSN 2334-2501.

El patrón de motilidad es variable en distintas especies de mamíferos estudiadas. En algunas especies, por ejemplo en el ratón, los espermatozoides forman un círculo completo con dos batidos, dando la apariencia de formar una figura con forma de ocho, tal como se puede observar en la figura 15 (Ho & Suarez, 2001).

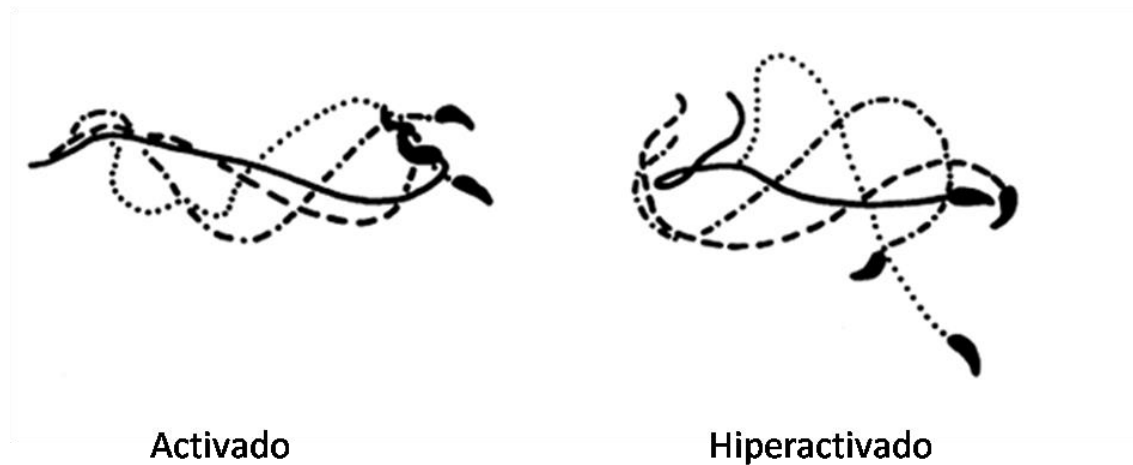


Figura 15. Hiperactivación en espermatozoides de ratón. Patrón de movimiento característico de espermatozoides activados e hiperactivados (Suarez, 2008).

Es poco probable que todos los espermatozoides se capaciten de manera sincronizada. Algunos pueden ser capacitados más rápidamente que otros (Hino, 2016), mientras que otros pueden que nunca se capaciten y, simplemente, mueran en el istmo. Los que sí se capacitan tienen menor afinidad por el epitelio del istmo que los no capacitados (Smith & Yanagimachi, 1991), por lo cual se despegan del epitelio asistidos por el movimiento vigoroso de la cola (Ho & Suarez, 2001; Suarez & Pacey, 2006). Luego de nadar libremente por un tiempo, se vuelven a unir a la pared del istmo (Hino & Yanagimachi, 2019). Los espermatozoides que alcanzan el istmo inferior del oviducto no han completado aún su capacitación (La Spina et al., 2016; Muro et al., 2016). Son mantenidos allí con sus cabezas unidas firmemente al epitelio del istmo hasta que son capacitados e hiperactivados (Smith & Yanagimachi, 1981; Suarez, 2016) (Figura 16).

Peristalsis adovárica del oviducto

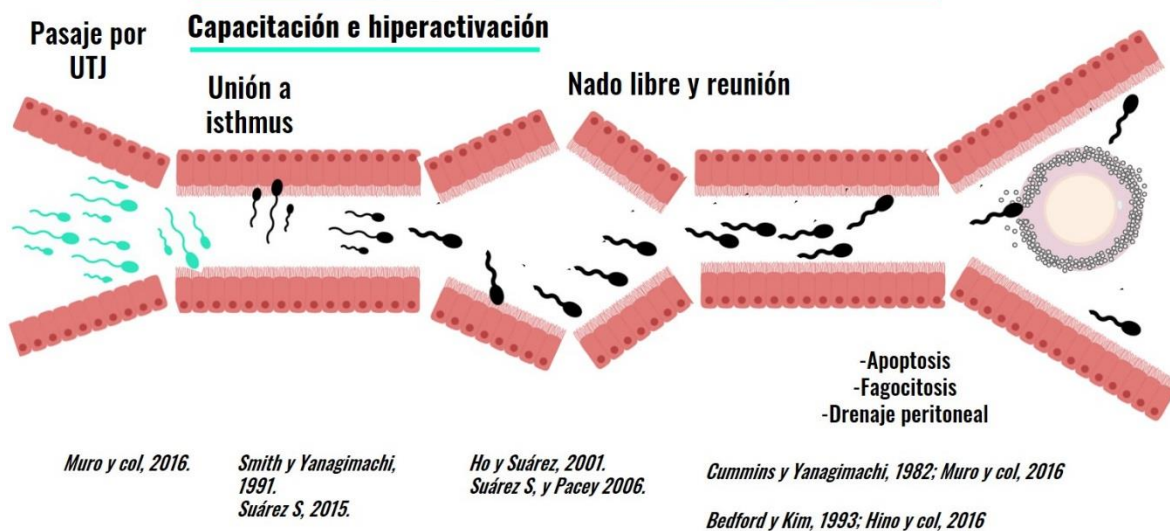


Figura 16. Representación de lo que ocurre con los espermatozoides en el oviducto. Llegan espermatozoides que luego de la unión a las células epiteliales del istmo se capacitan y continúan su trayecto hacia la *ampulla*; se mueven por hiperactivación y por peristalsis adovárica; una vez que llegan a la *ampulla*, algunos son fagocitados, otros mueren por apoptosis, otros son drenados hacia el peritoneo, y algunos son captados por quimiotaxis, reotaxis y termotaxis por el oocito, logran atravesar todas las capas que lo rodean y fecundarlo. Esquema de lo descrito por (Hino & Yanagimachi, 2019).

Los espermatozoides de mamíferos son capacitados *in vivo* por interacción con el tracto reproductor femenino (Figuras 17 y 18) o *in vitro* con un medio de composición definida que contiene BSA, calcio y bicarbonato. El rol del útero, de la trompa de Falopio y sus secreciones en la capacitación del espermatozoide humano es desconocido por limitaciones prácticas y éticas (De Jonge, 2017). Un gran número de moléculas que están presentes en el tracto reproductor femenino y que también han demostrado ser responsables de la modificación de la función espermática, no son usualmente incluidas en los experimentos de capacitación *in vitro* (Edwards et al., 2007; Garbarino Azúa et al., 2017; Luconi et al., 1995; Meizel, 1997).

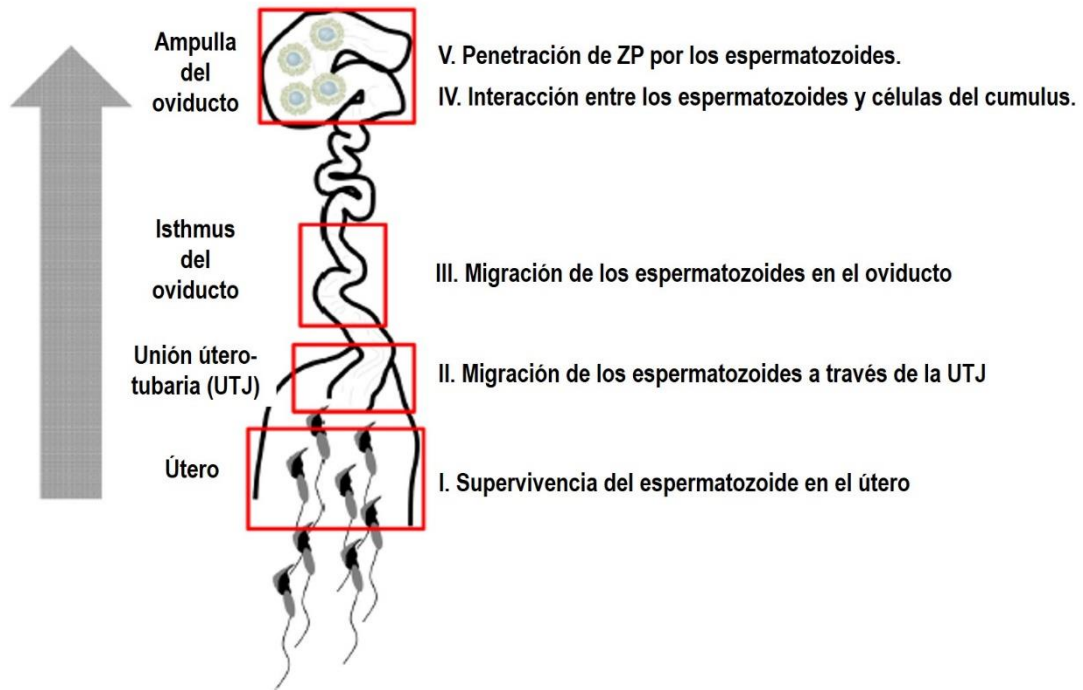


Figura 17. Visión general del viaje del espermatozoide de ratón en el tracto reproductor de la hembra. Los espermatozoides eyaculados sobreviven a numerosas amenazas en el útero y en el oviducto para llegar a fecundar a los oocitos. Se resumen en esta figura las cinco secciones de disección molecular de la migración de los espermatozoides revelada por modelos de ratones modificados genéticamente. Tomado y modificado de Fujihara et al., 2018.

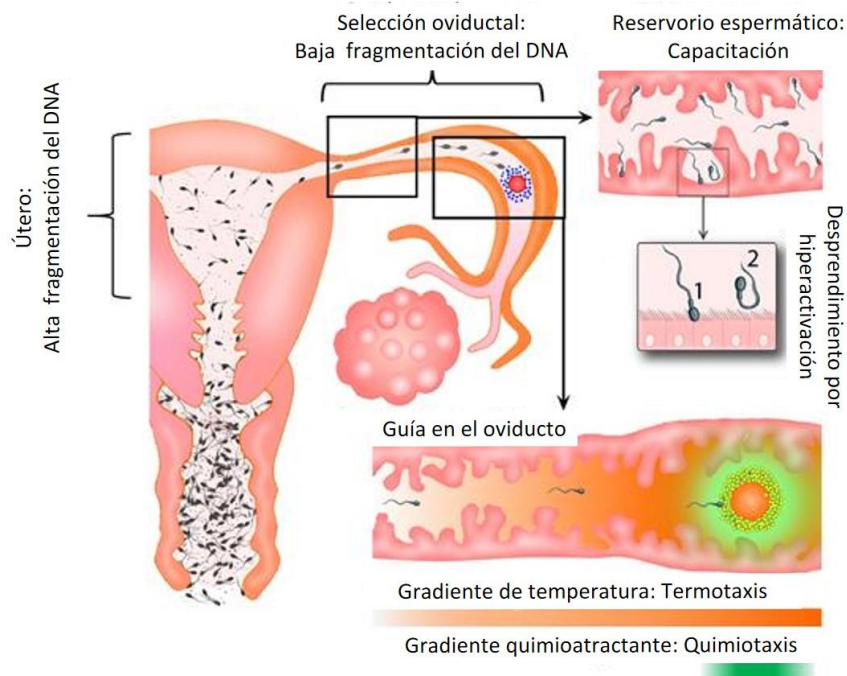


Figura 18. Representación esquemática de cómo se guían y son seleccionados los espermatozoides en la trompa de Falopio. La fracción de espermatozoides que alcanza al útero tiene altos niveles de fragmentación del DNA, motivo por el cual en esta región son seleccionados aquellos espermatozoides que poseen DNA sin daño. Cerca de la unión útero-tubaria, los espermatozoides se adhieren al epitelio en una región conocida como “reservorio espermático”, donde finalizan su maduración y se convierten en espermatozoides capaces de fecundar al oocito. Los espermatozoides capacitados en el reservorio espermático adquieren un patrón de motilidad conocido como motilidad hiperactivada, que les facilita liberarse del epitelio tubario al cual estaban adheridos. Los espermatozoides que fueron liberados son guiados a través de la termotaxis a las proximidades del oocito en la *ampulla*. Finalmente, un gradiente de quimioattractantes generado por el COC guía al espermatozoide cerca del oocito para fecundarlo. Adaptado de Pérez-Cerezales et al., 2018.

Reacción o exocitosis acrosomal.

Los cambios que se producen en el espermatozoide durante la capacitación son necesarios para que se pueda llevar a cabo la reacción o exocitosis acrosomal (RA) la cual, a su vez, es requisito para que pueda llevar a cabo la interacción y fusión del espermatozoide con el oocito (Yanagimachi, 1994). Se ha demostrado que los espermatozoides deben realizar la RA de manera ordenada para poder penetrar la ZP (Buffone et al., 2009; Yanagimachi, 1994).

En los espermatozoides de mamíferos la RA es un tipo de secreción controlada regulada por muchos caminos de señalización y el citoesqueleto de actina (Figura 19). Si bien se desconocen los cambios dinámicos que sufre el citoesqueleto de actina, de las seis regiones identificadas en la cabeza de espermatozoides de ratón que contienen F-actina, solamente algunas sufrieron una

despolimerización previa a la iniciación de la RA, mientras que otras permanecen inalteradas o se perdieron luego de la exocitosis (Romarowski et al., 2018).

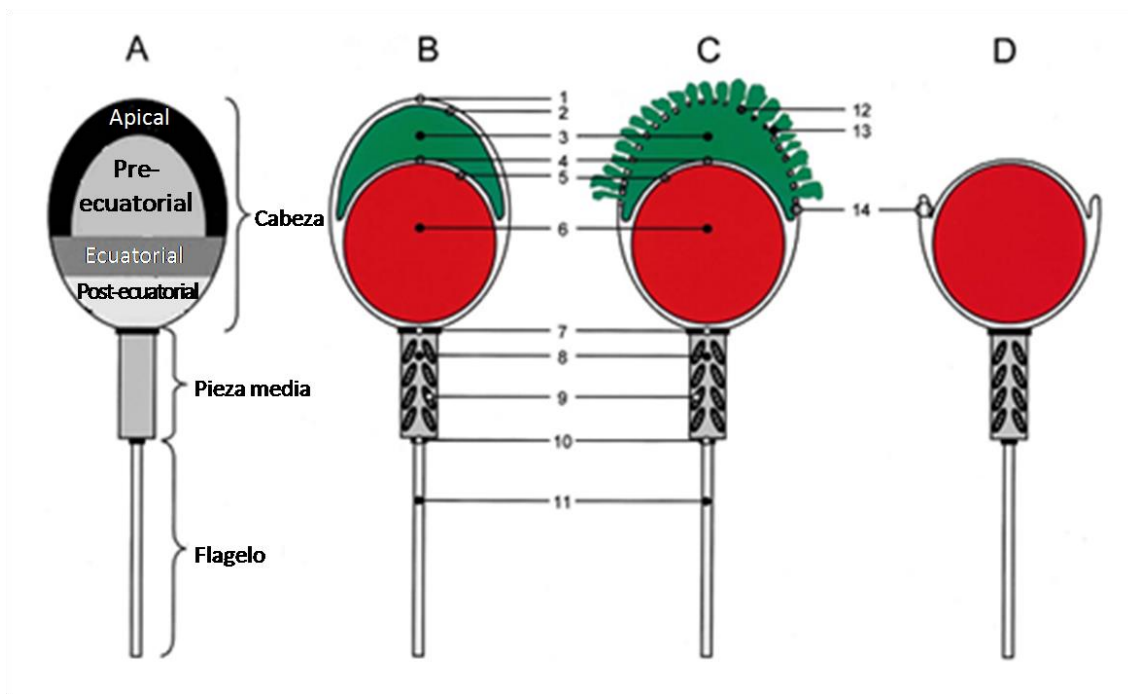


Figura 19. Esquema de los cambios producidos en las membranas del espermatozoide durante la RA. A: esquema de la superficie del espermatozoide. La cabeza puede ser subdividida en cuatro regiones: apical, pre-ecuatorial, ecuatorial y post-ecuatorial. El acrosoma se sitúa en la zona apical del núcleo; B: luego de unirse al oocito, la membrana plasmática apical se fusiona con la membrana acrosomal externa en múltiples sitios. C: el contenido del acrosoma (enzimas hidrolíticas) se secretan, permitiendo la digestión de la matriz extracelular del oocito (ZP). D: una vez finalizada la reacción acrosomal, la membrana acrosomal interna forma un continuo con la membrana plasmática. 1: membrana plasmática; 2: membrana acrosomal externa; 3: contenido acrosomal; 4: membrana acrosomal interna; 5: envoltura nuclear; 6: núcleo conteniendo el DNA condensado; 7: anillo posterior; 8: pieza media; 9: mitocondrias; 10: anillo anular; 11: flagelo; 12: vesícula mixta (membrana plasmática unida a la membrana acrosomal externa); 13: secreción acrosomal; 14: Sitio fusogénico. Modificado de Fleisch & Gadella, 2000.

Debido a que la RA tiene ciertas características que la diferencian de otros procesos excitóticos y, dado que los espermatozoides recuperados del espacio perivitelino pueden penetrar el *cumulus* y zona pelúcida de oocitos frescos por segunda vez y fecundarlos (Inoue et al., 2011; Kuzan et al., 1984), algunos autores han considerado que la reacción acrosomal no puede considerarse simplemente una exocitosis (Okabe, 2016).

La reacción acrosomal posee características especiales que juegan un rol central en el proceso de fecundación de diversas especies, incluyendo la humana. Involucra la apertura de una gran cantidad de poros de fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática del espermatozoide (ver sección Estructura del espermatozoide) que se expanden de forma particular

llevando a la liberación de vesículas híbridas. Luego de la fusión de las dos membranas, los componentes solubles del acrosoma comienzan a difundir, mientras que los componentes particulados de la matriz permanecen expuestos en la superficie hasta que la matriz se rompe y estos componentes son liberados (Buffone et al., 2009; Foster et al., 1997; Noland et al., 1994). La pérdida de la membrana acrosomal externa y de una gran región de membrana plasmática, expone a la membrana acrosomal interna al medio y cambia la composición y topología de la membrana plasmática, especialmente en el segmento ecuatorial del espermatozoide (Inoue et al., 2011).

Esta reacción es inducida por un estímulo que genera una cascada de señales compleja, provocando un aumento de la concentración de iones calcio intracelular, que se caracteriza por un aumento inicial transitorio (Darszon et al., 2011; Harper et al., 2003; Jimenez-Gonzalez et al., 2006; Sánchez-Cárdenas et al., 2014) que luego se continúa con un aumento sostenido en una pequeña población espermática (Costello et al., 2009; Darszon et al., 2011; Luque et al., 2018). Esta cascada conduce a la hinchazón del acrosoma y al acoplamiento del acrosoma a la membrana plasmática en los bordes sobresalientes de las invaginaciones profundas de la membrana acrosomal externa (Zanetti & Mayorga, 2009). Finalmente, los poros de fusión se abren, el contenido acrosomal se dispersa y la RA se completa.

La RA puede inducirse en presencia de estímulos fisiológicos, tales como el fluido folicular, la ZP o la progesterona y farmacológicos, como es el caso del ionóforo de calcio A23187 (Brewis et al., 1996; Caballero-Campo et al., 2006; Calvo et al., 1989; Harper et al., 2006; Harper et al., 2008; Henkel et al., 1998; Rockwell & Storey, 2000). Sin duda, *in vivo*, este proceso debe ser coordinado en el tiempo y el espacio para llevar a una fecundación exitosa.

La cinética de la reacción acrosomal gatillada por ionóforo de calcio A23187 o progesterona es la misma, pero el porcentaje de espermatozoides respondedores es muy diferente (Figura 20). La progesterona induce a una pequeña población de espermatozoides (se cree que aquellos que han completado la capacitación), mientras que el ionóforo de calcio A23187 gatilla la reacción acrosomal en una gran población de espermatozoides. Los requerimientos para responder al ionóforo de calcio A23187 deben ser diferentes e independientes de la capacitación espermática o, alternativamente, las altas concentraciones de iones calcio en el citosol pueden provocar que rápidamente el espermatozoide se sensibilice (Sosa et al., 2015). Se ha demostrado que solo bastan 10 minutos de incubación con ionóforo de calcio A23187 para que el espermatozoide pueda fecundar oocitos maduros (Tateno et al., 2013).

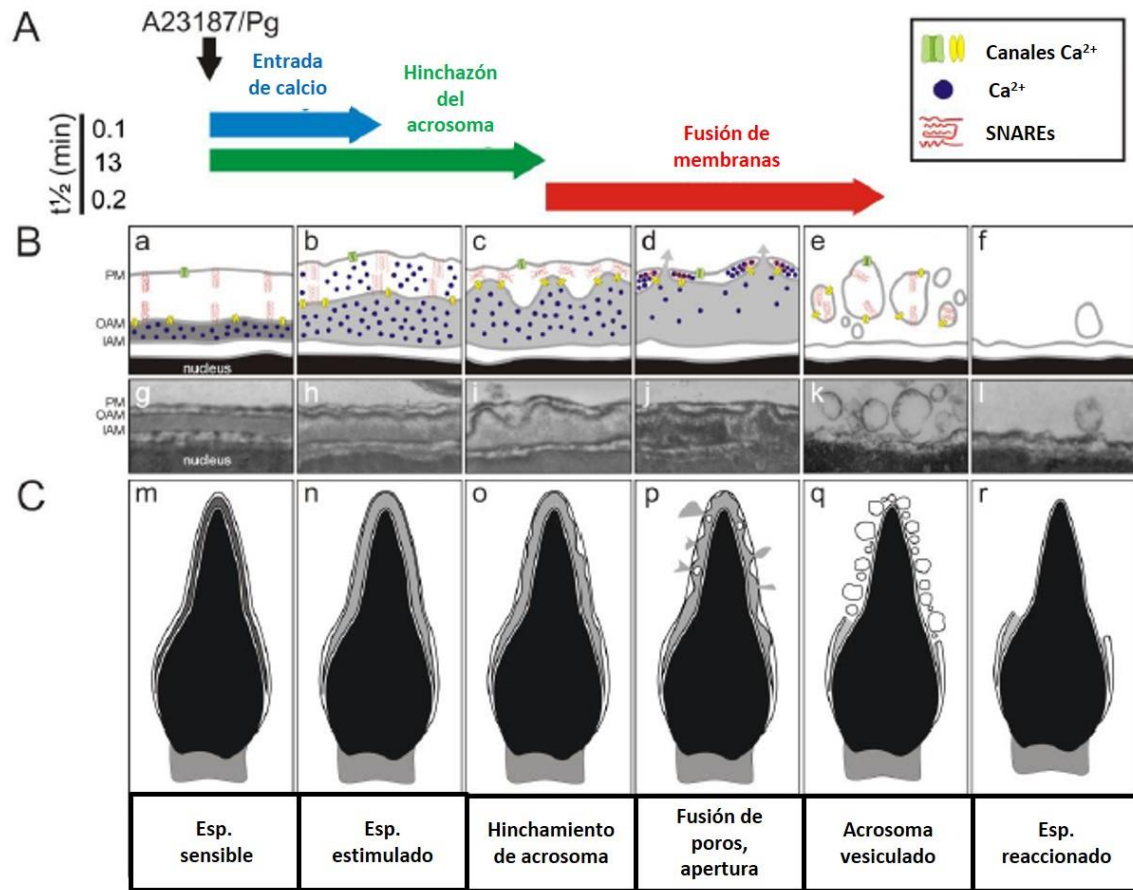


Figura 20. Modelo de la cinética de la reacción acrosomal. Se representan las diferentes etapas de la reacción acrosomal. Los espermatozoides capacitados sufren un gran y rápido aumento en la concentración de iones calcio citosólico que gatilla la hinchazón del acrosoma. Eventualmente, la membrana acrosomal externa se acopla con la membrana plasmática. La apertura de canales de calcio en la membrana acrosomal externa causa un aumento local de iones de calcio en la proximidad de la maquinaria de unión de fusión de membranas que gatilla la apertura de poros que conectan el compartimiento extracelular con el lumen acrosomal. La expansión de estos poros lleva a la vesiculización del acrosoma. El tiempo medio de estos procesos se muestran en el panel A. Los cambios de la topología de membrana, incluyendo algunas proteínas que participan del proceso se muestran sobre el panel B. Micrografías electrónicas representativas de cada uno de los pasos se muestran en la parte inferior del panel B. El panel C muestra los cambios morfológicos asociados que corresponden a cada uno de los pasos y que ocurren en la cabeza del espermatozoide durante la reacción acrosomal. Tomado y adaptado de (Sosa et al., 2015).

Existe aún controversia con respecto al lugar y/o momento en el que se produce la reacción acrosomal *in vivo* (Figura 21). Originariamente se postuló que la RA ocurría como consecuencia del contacto del espermatozoide con la ZP y que los espermatozoides que reaccionaban antes de contactar con la zona pelúcida del oocito eran incapaces de unirse a la misma, perdiendo la capacidad de fecundar (Saling et al., 1979). Sin embargo, se observó que, *in vivo*, la mayoría de los espermatozoides de hámster iniciaban su RA mientras avanzaban a través del *cumulus* (Yanagimachi & Phillips, 1984). Se propuso, entonces, que la RA sería un proceso gradual, espontáneo, acelerado,

pero no iniciado por la ZP (Kim & Gerton, 2003). En el ratón, la mayoría de los espermatozoides encontrados en el *cumulus*, ya han iniciado la RA y penetran la ZP sin detenerse demasiado tiempo en su superficie (Jin et al., 2011) y estudios más recientes han propuesto que Sindecán-1 (proteoglicano de heparán sulfato ubicado, generalmente, en membranas) está presente en las células del *cumulus* y posee la habilidad de inducir la RA *in vivo* (Joshi et al., 2014). Actualmente, se piensa que solamente algunos espermatozoides comienzan la RA en la ZP, y que estos serían la excepción en lugar de la regla.

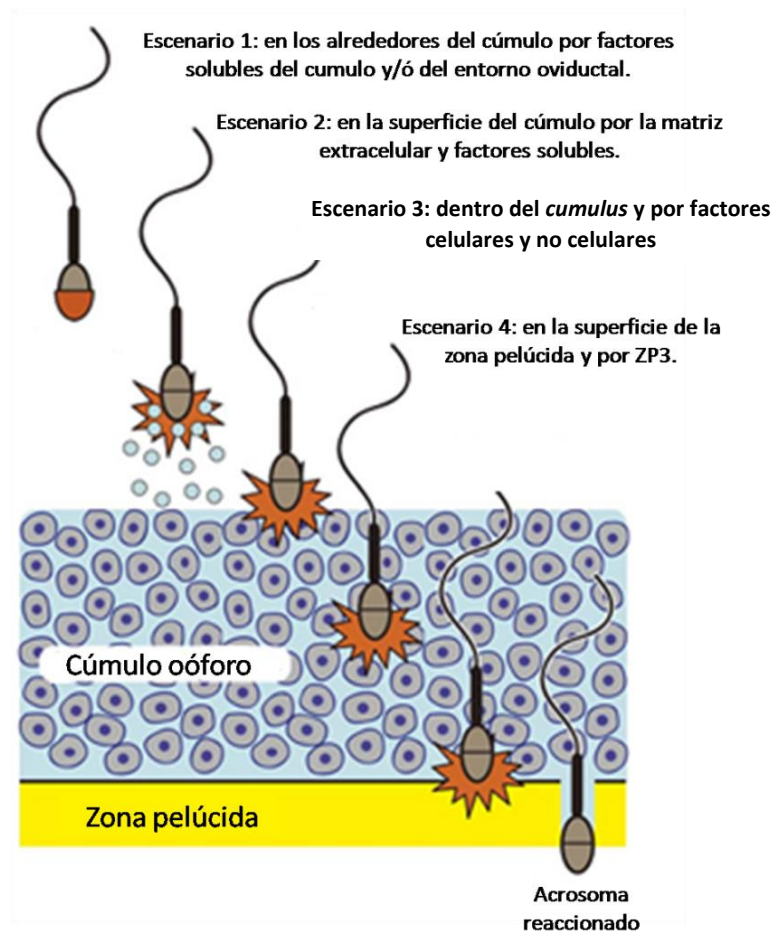


Figura 21. ¿Dónde se inicia la reacción acrosomal? Los escenarios 1-4 ilustran dónde los espermatozoides podrían sufrir la reacción acrosomal mientras viajan al sitio de fecundación. (Buffone, Hirohashi, & Gerton, 2014).

Fecundación.

La fecundación es un proceso maravilloso, donde dos gametas (masculina y femenina) se fusionan durante la reproducción sexual para crear un nuevo individuo con un genoma derivado de ambos progenitores. Como se dijo anteriormente, la fecundación ocurre en la *ampulla* del oviducto/trompa de Falopio. Los espermatozoides capacitados, que se encuentran en el reservorio del istmo de la trompa, tienen la capacidad de responder a un gradiente quimioattractante de progesterona en las proximidades del oocito (Gatica et al., 2013; Guidobaldi et al., 2008; Teves et al., 2009; Guidobaldi et al., 2012) que permite que ambos gametos lleguen en forma coordinada al sitio de fecundación. Una vez allí, el espermatozoide tendrá que atravesar las distintas barreras que rodean al oocito (arrestado en metafase II), antes de poder ingresar al ooplasma (Figura 22).

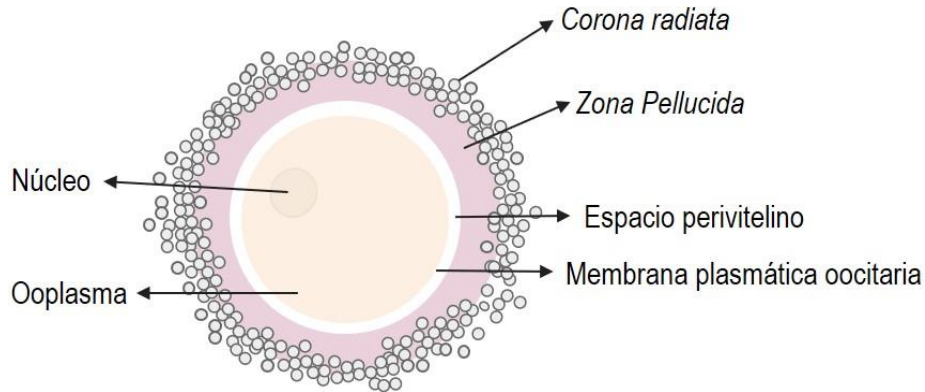


Figura 22. Capas que rodean el oocito. En el esquema se observa: el núcleo y el citoplasma, rodeado por la membrana plasmática. Entre el oocito y la zona pelúcida se encuentra el espacio perivitelino. Rodeando a la ZP se encuentra la densa masa de células del *cumulus* que habitualmente rodean el oocito (corona radiata).

La primera barrera con que se encuentra el espermatozoide capacitado al llegar al oocito es la corona radiata, formada por las células del *cumulus* y su matriz extracelular. La matriz es secretada por las células del *cumulus* durante la reanudación de la meiosis, causando su rápida expansión, antes de que ocurra la ovulación. El componente principal de la matriz es el ácido hialurónico (Russell & Salustri, 2006), que se encuentra asociado a distintas proteínas. Existen dos teorías sobre cómo se produce la penetración del *cumulus*: la teoría enzimática (el espermatozoide libera hialuronidasa durante su pasaje por el *cumulus*, permitiendo la degradación del ácido hialurónico de la matriz) y la teoría mecánica (el espermatozoide penetra únicamente por hiperactividad). Se cree que, en realidad, ocurre una combinación de ambas cosas: la motilidad hiperactivada del espermatozoide facilita la dispersión del *cumulus* en conjunto con la acción de la hialuronidasa y

otras enzimas líticas (acrosina, beta galactosidasa, arilsulfatasa) (Bedford, 1998; Green, 1988; Kim et al., 2008).

Una vez atravesado el *cumulus*, el espermatozoide debe interactuar con la ZP. La ZP posee la capacidad de seleccionar espermatozoides de la misma especie al momento de la fecundación, lo que se conoce como especie-especificidad (o especificidad de especie). Adicionalmente, es esencial para el desarrollo temprano del embrión *in vivo*, ya que mantiene los blastómeros unidos y regula el microambiente del espacio perivitelino (Oehninger et al., 1993; Wassarman, 1999).

Ya se ha mencionado que aún existe controversia acerca del estado acrosomal (intacto o reaccionado) del espermatozoide cuando llega a la ZP. Lo que sí se sabe es que la unión del espermatozoide a la ZP es un evento rápido y que los espermatozoides capacitados se unen firmemente a la ZP, mientras que los no capacitados se unen débilmente. En la ZP se encontró que ZP3 es una glicoproteína de unión primaria y actuaría como receptor de espermatozoides con el acrosoma intacto, y se propuso que ZP2 actúa como el receptor secundario para espermatozoides reaccionados; estas teorías continúan aún hoy en discusión (Gahlay et al., 2010; Gupta et al., 2012; Howes & Jones, 2002). Incluso, hay quienes sostienen que esta unión del espermatozoide a la ZP no sería importante (Rahman et al., 2012).

El espermatozoide que se ha unido a la ZP debe luego penetrarla y aquí también existe controversia acerca del mecanismo involucrado. La teoría enzimática propone que la acrosina del espermatozoide degrada la ZP y la teoría mecánica propone que el espermatozoide penetra la ZP por la fuerza que logra con el batido de su flagelo. En virtud de que no se ha observado ZP erosionada y, teniendo en cuenta que el ratón KO para acrosina es fértil, la balanza se inclina a favor de la teoría mecánica. Así, la penetración de la ZP, al igual que la del *cumulus*, sería un evento “físico” (de fuerza) más que “químico” (enzimático). Por otra parte, se presume que la anatomía de la cabeza del espermatozoide reaccionado favorecería el corte de la ZP y permitiría una mejor penetración de la misma. De esta manera, la RA sería necesaria para penetrar la ZP porque expone enzimas que participan en la unión a la ZP y porque el espermatozoide sin acrosoma tendría mejores propiedades físicas para penetrar la ZP con la fuerza de su motilidad hiperactivada (Bedford, 1998; Cuasnicú et al., 2001; E. Kim et al., 2009).

Se ha propuesto que el espermatozoide llega al oocito por motilidad y quimiotaxis, ocurre una unión primaria y secundaria a la ZP que es de reconocimiento y, luego ocurriría la RA para que, finalmente, el espermatozoide penetre la ZP y, ocurra la fusión con la membrana plasmática del oocito (Tosti &

Ménézo, 2016), ya que, al tener expuesto el segmento ecuatorial, posee la fusogenicidad suficiente para lograrlo. Se han encontrado diferentes ligandos en el espermatozoide y receptores en el oocito involucrados en la fusión de estos. En el espermatozoide: Fertilina (Myles & Primakoff, 1997); DE/CRISP1 (Ellerman et al., 2006) e Izumo (Inoue et al., 2005). En el oocito: CD9 y Juno (Bianchi et al., 2014) (Figuras 23 y 24)

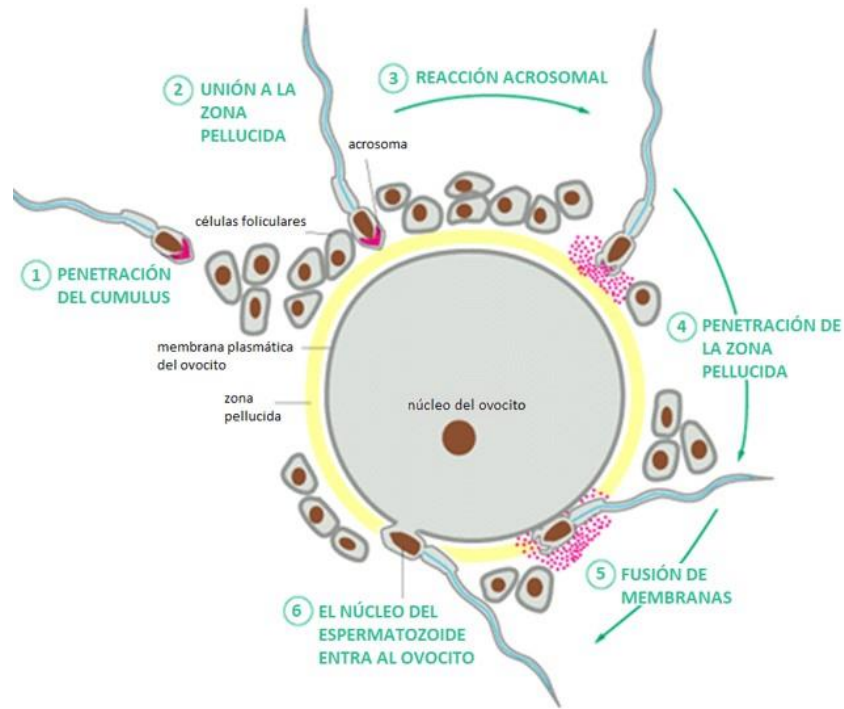


Figura 23. Esquema de fecundación de oocitos humanos: Se observa en la figura: 1) Espermatozoide en la región de las células de la granulosa degradan la matriz extracelular entre ellas. 2) Reconocimiento entre el espermatozoide y el oocito gracias a la interacción con la ZP. 3) El espermatozoide sufre la reacción acrosomal. 4) El espermatozoide penetra la zona pelúcida. 5) Fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del oocito. 6) penetración del espermatozoide. Tomado con autorización de la Dra. Guillermina Luque, presentación sobre actualización en fisiología de la fecundación.

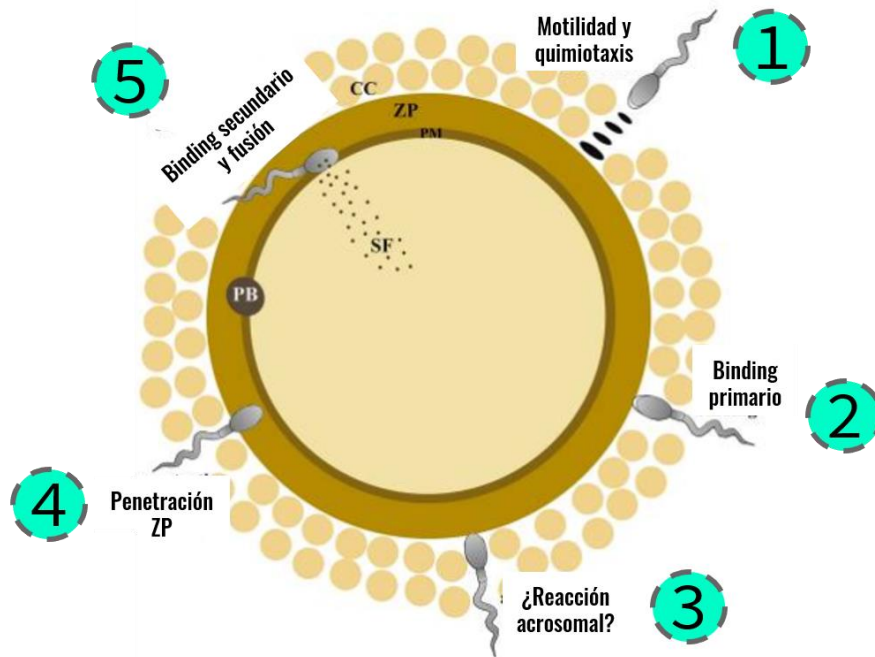


Figura 24. Nuevo paradigma de la secuencia de fecundación. 1) El espermatozoide llega a las proximidades del oocito guiado por quimiotaxis y utilizando su motilidad hiperactivada. 2) Se produce una unión (“binding”) primario de los espermatozoides a la zona pelúcida. 3) Se desconoce si en este punto se produce la reacción acrosomal o el espermatozoide ya llega reaccionado a las proximidades del oocito. 4) El espermatozoide penetra la zona pelúcida. 5) Ocurre una unión secundaria entre el espermatozoide y la membrana del oocito, logrando fusionarse. Tomado de Tosti & Ménez, 2016.

Una vez atravesada la ZP, el espermatozoide debe fusionarse con la membrana plasmática del oocito, última barrera que debe atravesar para completar la fecundación (Figura 25).

La membrana plasmática del oocito de ratón posee microvellosidades, excepto en la zona que recubre al huso meiótico en donde nunca ocurre la fusión. En humanos, la membrana plasmática del oocito tiene microvellosidades en toda su extensión (Gupta, 2018).

La fusión de las membranas ocurre mediante un proceso aún no dilucidado por completo. La motilidad del espermatozoide cesa inmediatamente luego de la fusión y todo el espermatozoide, excepto la región fusogénica, es envuelto por la membrana plasmática del oocito. Una vez que ingresó el espermatozoide se producen oscilaciones de iones calcio en el oocito (Miyazaki et al., 1993; Swann, 1996; Stricker, 1999) que gatillan, por un lado, el bloqueo de la polispermia (proceso en el cual se liberan los gránulos corticales) y, por el otro, el reinicio de la meiosis detenida en Metafase II con la consecuente extrusión del segundo cuerpo polar. Este proceso se conoce como activación oocitaria. Estas oscilaciones de iones calcio deben darse en una ventana temporal específica y son críticas para una correcta activación y subsecuente embriogénesis (Amdani et al.,

2016). Existe una reacción temprana de incremento de Ca^{2+} que se caracteriza por 3 a 6 picos rápidos, que son seguidos por picos de menor frecuencia para el resto del período de oscilaciones. Además, existen oscilaciones regulares y continuas durante varias horas, que cesan con la formación de los pronúcleos (Carroll, 2001). Es difícil imaginar cómo el breve encuentro entre el espermatozoide y el oolema durante la fecundación en mamíferos puede ser suficiente para soportar oscilaciones de calcio que duran muchas horas en estas especies (Parrington et al., 2019).

Construida en la propuesta original de Jacques Loeb (1913), la hipótesis del “factor soluble espermático” propuso que el espermatozoide contiene un factor soluble que, tras la fusión de gametas, entra al oocito y gatilla la liberación de calcio de reservorios intracelulares. La candidata actual a ser la responsable de inducir la activación oocitaria en ratones, hámsters, humanos y monos es una nueva isoforma del PLC ζ específica de espermatozoides (Cox et al., 2002; Saunders et al., 2002). Estudios de inmunofluorescencia revelaron que PLC ζ estaba mayormente localizada en la región ecuatorial/post-acrosomal del espermatozoide humano (Grasa et al., 2008; Yoon et al., 2012, 2008; Young et al., 2009), que es el área que primero fusiona con el oocito, consistente con el rol de gatillar la liberación de calcio luego de la fusión. En apoyo a esto, experimentos de microscopía electrónica demostraron que PLC ζ está localizada en la teca perinuclear de cara al acrosoma y probablemente asociada con la membrana acrosomal interna (Escoffier et al., 2015). Notablemente, la parte distal del acrosoma permanece casi inalterada durante la reacción acrosomal en humanos (Zanetti & Mayorga, 2009), una localización que preserva PLC ζ de la reacción acrosomal.

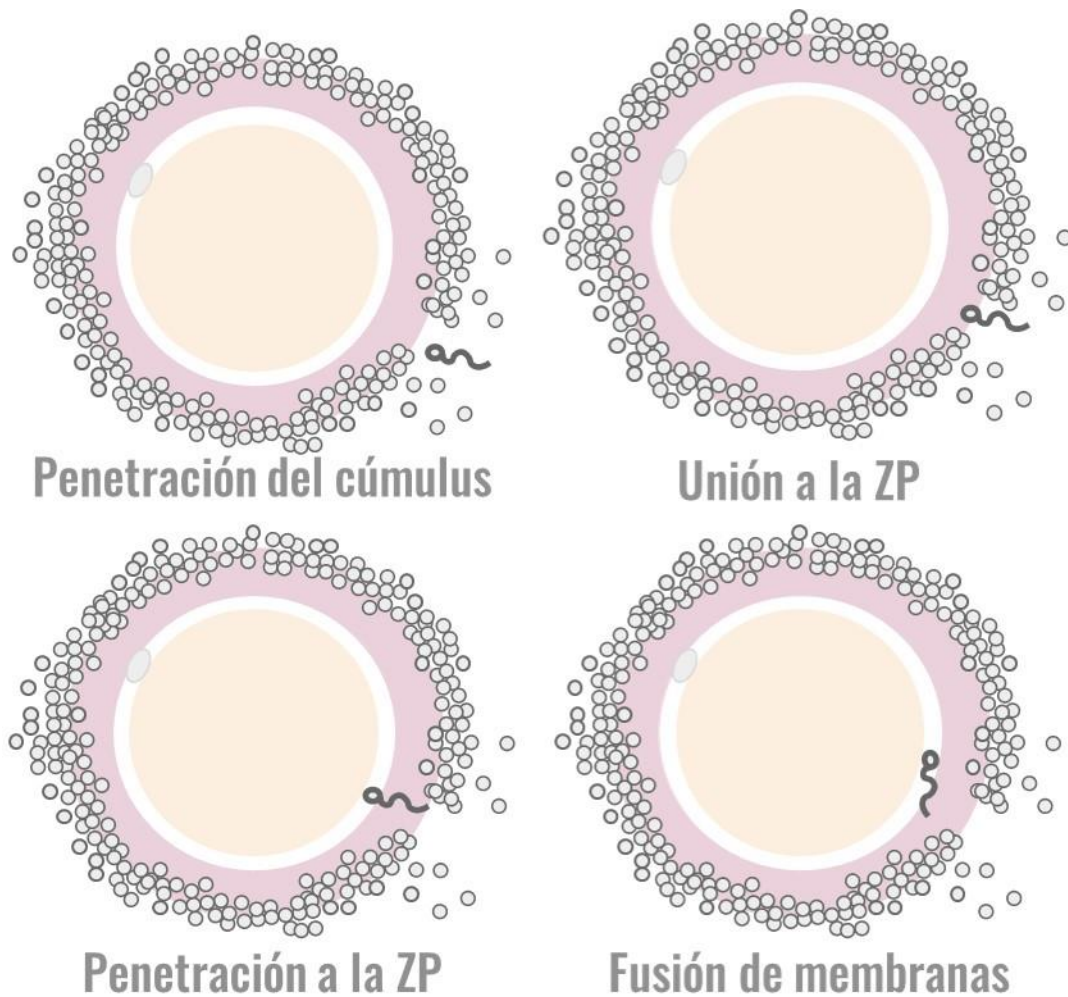


Figura 25. Proceso de fecundación paso a paso. Se observan claramente las dos etapas de penetración de envolturas que rodean al oocito (*cumulus* y ZP), donde el espermatozoide necesita de la fuerza de su batido flagelar, y la etapa de reconocimiento por la ZP del oocito y la fusión de las membranas del espermatozoide con el oocito, que requieren de moléculas de reconocimiento del tipo ligando-receptor.

Una vez que el espermatozoide logra atravesar la envoltura extracelular del oocito y se fusionan las membranas plasmáticas de ambos gametos, el largo viaje del espermatozoide finaliza, pero no así su función. Aún es necesario que ocurra la descondensación del núcleo espermático para lograr el objetivo final: la formación de los pronúcleos y la singamia.

Descondensación del núcleo espermático.

Una vez que ingresa al oocito, el espermatozoide sufre una serie de cambios ultraestructurales, siendo el primer cambio visible la descondensación de la cromatina y la formación del pronúcleo masculino propiamente dicho. La descondensación de la cromatina es necesaria para que se pueda formar el pronúcleo masculino (Lassalle & Testart, 1991; Tesarik & Kopecny, 1989) y, una vez formados ambos pronúcleos (masculino y femenino), ocurra la singamia (fusión del material genético proveniente de ambos gametos), de modo tal que la descondensación de la cromatina espermática es requisito fundamental para una fecundación exitosa.

El mecanismo mediante el cual se produce la descondensación de la cromatina no se ha esclarecido aún por completo. El hecho que aproximadamente un 15% de los oocitos no fecundados en procedimientos de reproducción asistida (por ejemplo, ICSI), contenga una cabeza de espermatozoide no descondensada en el interior del oocito, ha reactivado el interés en estudiar más exhaustivamente el núcleo del espermatozoide, el proceso de descondensación nuclear y los factores espermáticos y oocitarios que lo regulan (Alikani, 1993).

La descondensación de la cromatina espermática requiere que se reduzcan los puentes disulfuro intra e interprotaminas por acción del GSH oocitario. Se ha demostrado hace ya varios años que dicha molécula es el glutatión reducido (GSH) (Perreault et al., 1984; Reyes et al., 1989; Yoshida, 1993): el tratamiento de oocitos maduros con un agente bloqueador de sulfhidrilos como lo es la iodoacetamida o el oxidante de GSH, la diamida, produce inhibición de la descondensación en manera dependiente de la dosis, en espermatozoides microinyectados de hámster, que no pudo observarse luego del tratamiento *in vitro* con ditionitroto (DTT) previo a la microinyección (Perreault et al., 1988b).

La reducción de los puentes disulfuro de las protaminas es condición necesaria pero no suficiente para que ocurra la descondensación cromatínica dado que se requiere que se lleve a cabo el intercambio de estas proteínas por histonas oocitarias, probablemente gracias a la acción de alguna molécula con un alto contenido de carga negativa que competiría con el DNA por dichas proteínas. En nuestro laboratorio demostramos la presencia en el oocito y participación en este proceso del glicosaminoglicano (GAG) sulfatado heparán sulfato (HS) (Julianelli et al., 2012; Romanato et al., 2008; Romanato et al., 2003, 2005). El HS interviene en el proceso de descondensación en los modelos humano, murino y bovino, se encuentra en el citoplasma del oocito, en el espacio

perivitelino (Canel et al., 2017; Romanato et al., 2008; Sánchez et al., 2013) y en la membrana plasmática del espermatozoide (Ceballos et al., 2009). Los extractos oocitarios murinos poseen actividad descondensante de espermatozoides humanos, y la misma se pierde tras incubación previa con heparinasa pero no con otras glicosidasas (Romanato et al., 2008). La heparina (Hep), no puede estar involucrada en el proceso de descondensación del núcleo espermático *in vivo* como se postulara anteriormente (Feyerabend et al., 2006; Hagner-Mcwhirter et al., 2000), ya que sólo es producida en los mastocitos, pero puede ser utilizada en los experimentos *in vitro* por ser el análogo estructural y funcional por excelencia del HS (Bellin et al., 1986; Bertolesi et al., 1994; Canel et al., 2017; Eriksen et al., 1997; Jackson et al., 1991; Julianelli et al., 2012; Reyes et al., 1989; Romanato et al., 2008; Sánchez et al., 2013; Sánchez et al., 2018).

Se ha sugerido (Perreault et al., 1988a) que la descondensación espermática *in vivo* ocurriría en dos etapas: en primer lugar, la reducción temprana de algunas uniones disulfuro cuando el núcleo se encuentra intacto y, luego, la dramática expansión del núcleo como consecuencia del reemplazo de las protaminas por las histonas del oocito (Perreault et al., 1988b). Sin embargo, resultados de nuestro laboratorio han sugerido que participación de Hep y GSH en la descondensación sería simultánea y no sucesiva (Julianelli et al., 2012) y que el HS favorece la actividad tiorreductora del GSH de modo que solamente la acción combinada de ambas moléculas produce la máxima actividad descondensante, tanto en espermatozoides intactos como en núcleos aislados (Figura 26).

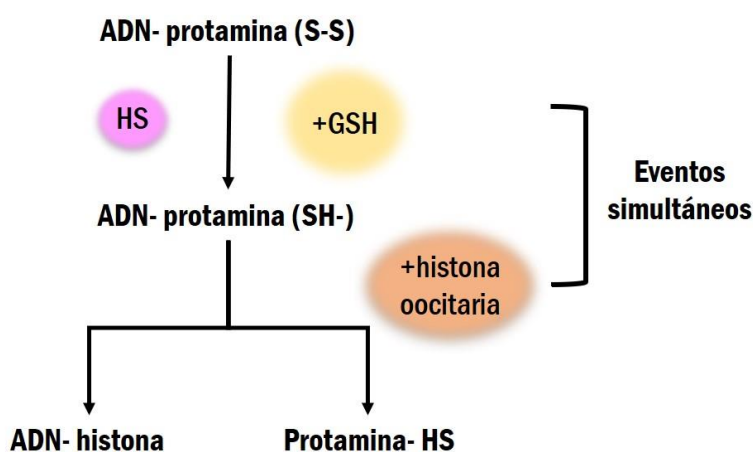


Figura 26. Esquema del modelo propuesto en nuestro laboratorio para la descondensación de la cromatina espermática. DNA unido a protaminas por puentes disulfuro. Estos puentes son reducidos por el GSH oocitario, mientras que el HS provoca la captura de las protaminas para luego, el DNA espermático unirse a histonas oocitarias.

Es interesante recordar que, en el humano, el HS se encuentra presente tanto en el tracto reproductor femenino (fluido folicular, complejo *cumulus*-oocito y oocito propiamente dicho) (Bellin et al., 1986), como en el espermatozoide (Ceballos et al., 2009) y que este último contiene además receptores para Hep (Delgado et al., 1982; Garénaux et al., 2015). Esta redundancia plantea, por un lado, la posibilidad de colaboración entre ambos gametos en el proceso de descondensación de la cromatina espermática *in vivo* y, por otro, la posible participación del HS en otras etapas del proceso reproductivo.

Existe sólo un trabajo que habla de la presencia del HS en el espermatozoide humano (Ceballos et al., 2009), sin indicar en qué región del mismo se encuentra, y otro más reciente que demuestra la presencia de HS en espermatozoides de carnero (van Tilburg et al., 2013). Durante mi tesis de licenciatura investigué la presencia del HS en la membrana del espermatozoide en diferentes estadios de la vida post-eyaculatoria mediante citometría de flujo, encontrando que el espermatozoide humano posee HS en la membrana tanto al haber sido seleccionado por “*Swim up*”, como luego de incubarlo en condiciones capacitantes y luego de haber sido estimulado para sufrir la reacción acrosomal (Figura 27).

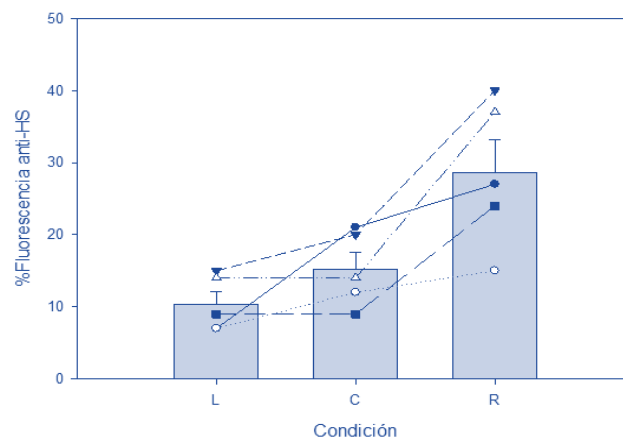


Figura 27. Porcentaje de marcación con anticuerpo monoclonal anti-HS medido por citometría de flujo en espermatozoides lavados (L), capacitados(C) y reaccionados(R). Cada curva representa el porcentaje de fluorescencia obtenido para las muestras de espermatozoides humanos provenientes de cada uno de los donantes normozoospermicos. Las barras representan el promedio de la marca obtenida (n=6; L vs C p= 0,5343; L vs R p=0,0035; C vs R p=0,0249. ANOVA para muestras apareadas y test de Tukey).

Glicosaminoglicanos, en particular HS y su análogo estructural, la heparina.

HS y Hep son glicosaminoglicanos sulfatados formados por la sucesión de unidades disacáridicas constituidas por un ácido urónico (glucurónico o idurónico) y un aminoazúcar (glucosamina) (Figura 28).

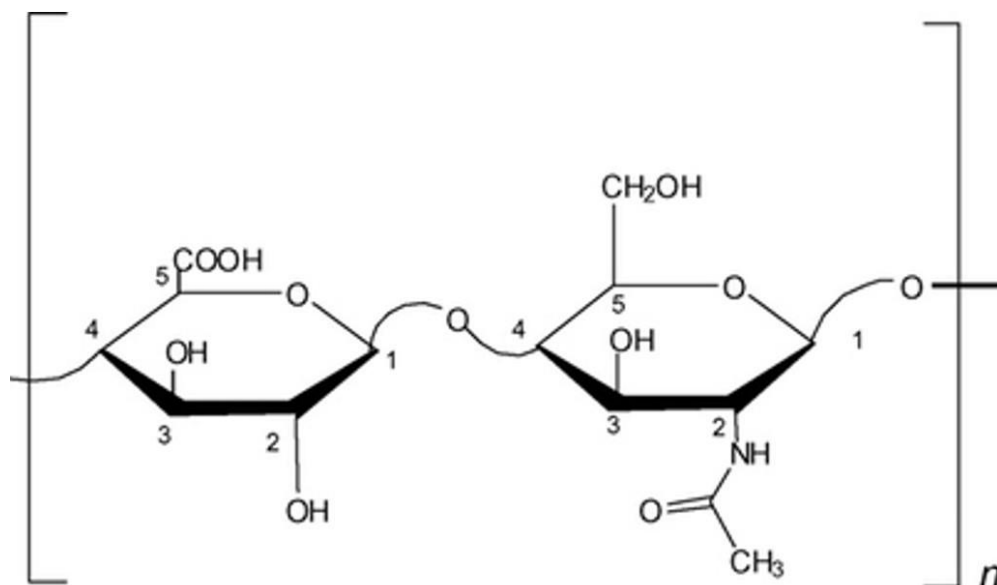


Figura 28. Estructura molecular del HS. Se observa una estructura de disacáridos que se repite en la molécula de HS.

La heparina es un polisacárido lineal polidisperso que consiste en enlaces 1→4 de ácido piranosilurónico y residuos de glucosamina (Comper et al., 1981). Los residuos de ácido urónico típicamente consisten en un 90% ácido idupiranosilurónico (ácido L-idurónico) y 10% en ácido glucopiranosilurónico (ácido D-glucurónico). El HS también es un copolímero lineal de ácido urónico unido 1→4 a glucosamina, pero tiene una estructura más variada. El ácido D-glucurónico predomina en el HS, aunque pueden estar presentes cantidades sustanciales de ácido L-idurónico.

La síntesis de Hep y HS comienza de la misma manera (Figura 29). Paso a paso se adhieren residuos de xilosa, galactosa y ácido glucurónico para formar el enlace tetrasacárido GlcA-(b1 43)-D-Gal-(b1 43)-D-Gal-(b1 44)-D-Xyl. La elongación de la cadena de HS ocurre en el extremo no reductor por la adición de residuos alternados de 1→4 ácido glucurónico y N-acetilglucosamina, hasta un largo total de 30 a 200 disacáridos. Al continuar la síntesis, algunas regiones sufren modificaciones por una serie de reacciones enzimáticas interdependientes. Primero, la glucosamina se desacetila y se N-sulfata gracias a la acción de N-desacetilasas/N-sulfotransferasas, lo que crea dominios altamente sulfatados. Dentro de estas regiones el ácido glucurónico se epimeriza a ácido idurónico, y se

agregan grupos O-sulfato a la glucosamina en el C6 y al ácido idurónico en C2. Para aumentar la variabilidad de la estructura, puede que se produzca una sulfatación menor en el C3 de la glucosamina y en el C2 del ácido glucurónico, y algunos residuos de glucosamina desacetilados permanezcan sin sustituciones. Las modificaciones de la cadena también resultan en regiones altamente sulfatadas flexibles ricas en ácido idurónico, flanqueados por secuencias donde se mezcla la N-sulfatación/N-acetilación. Estas regiones sulfatadas están dispersas con algunos dominios rígidos que contienen muy pocos sulfatos. Típicamente, entre el 40-50% de la glucosamina está N-sulfatada en HS, mientras que en la heparina, el 80-90% de la cadena está N-sulfatada (Tumova, Woods, & Couchman, 2000). De esta forma, mientras que la heparina tiene un promedio de 2,7 cargas negativas por disacárido, el HS tiene <2 cargas negativas por disacárido, provistas por los grupos sulfo y carboxilo. Estas características estructurales hacen que la interacción más prominente entre la Hep o el HS y las proteínas sea iónica. Los sitios de unión a heparina en las proteínas están caracterizados por la presencia de grupos de aminoácidos básicos cargados positivamente que forman pares iónicos con los grupos negativamente cargados sulfo o carboxilo de la cadena del GAG (Nelson & Greer, 2008).

Los GAGs se expresan en todo el cuerpo humano, generalmente formando parte de la matriz extracelular. El HS, tanto de la superficie celular como el que forma parte de matriz extracelular, está generalmente unido en forma covalente a proteínas específicas que le permite actuar como ligando o como molécula señal transmembrana, constituyendo los proteoglicanos de HS, HSPGs.

Los HSPGs existen en tres formas diferentes: como sindecan (proteínas transmembrana), como glipican (proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI)) y como perlecan (agrina y colágeno XVIII) que son las formas secretadas (Bernfield et al., 1999; Bülow & Hobert, 2006; Lázaro-Peña, Díaz-Balzac, Bülow, & Emmons, 2018; Poulain & Yost, 2015).

Estas características de interacción por carga van a ser fundamentales para el papel que nuestro laboratorio ha asignado al HS oocitario *in vivo* o a la heparina *in vitro*, como molécula aceptora de las protaminas espermáticas en el proceso de descondensación de la cromatina espermática.

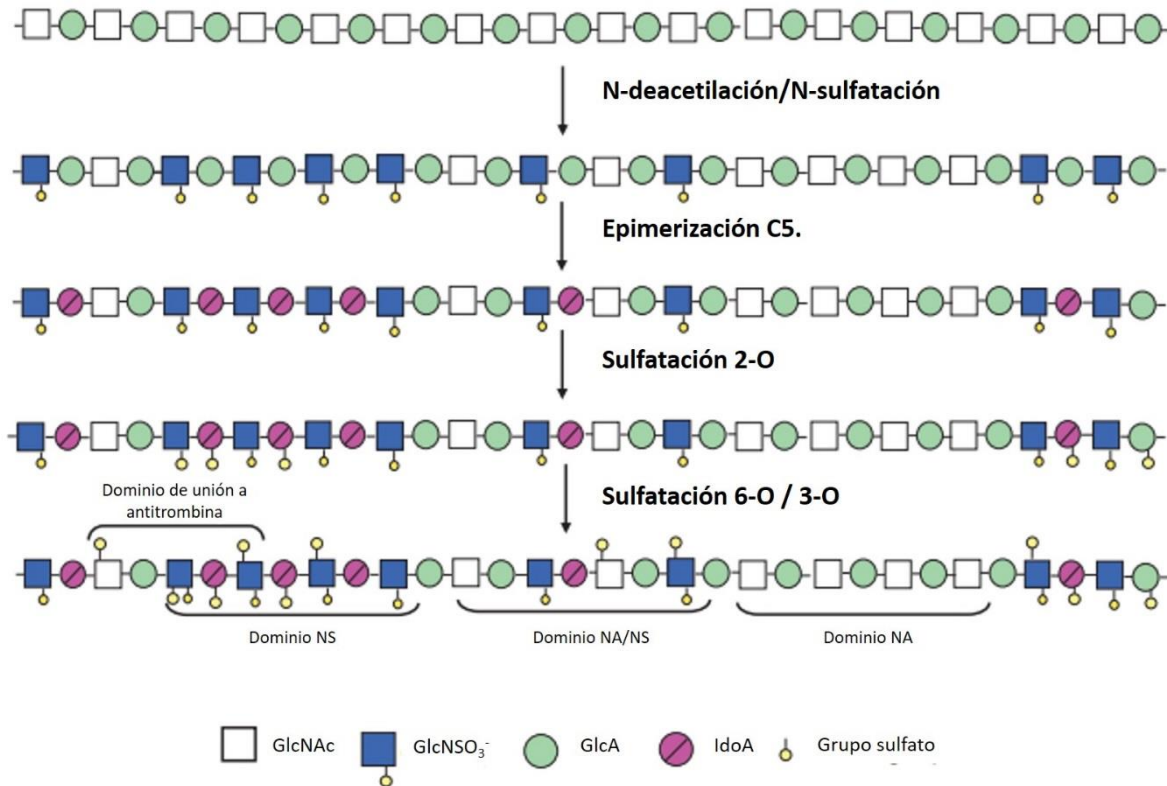


Figura 29. Esquema que representa la síntesis de HS. Puede observarse la acción de cada enzima de la síntesis de HS a lo largo de una secuencia hipotética de polisacáridos. Tomado y adaptado de Li & Kusche-Gullberg (2016). Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function. International Review of Cell and Molecular Biology, 215–273. doi:10.1016/bs.ircmb.2016.02.009

Funciones HS y HSPGs.

La ubicuidad del HS y su posibilidad de interacción con un gran número de proteínas, confieren a esta molécula (como GAG o como proteoglicano HSPG) de una capacidad para involucrarse en un sinnúmero de procesos biológicos: coagulación sanguínea, metabolismo de lípidos, regulación del desarrollo embrionario, neurogénesis, angiogénesis, cardiogénesis, guía de axones, interacción con citoquinas y factores de crecimiento, (Aquino et al., 2010; Bartlett & Park, 2010; Gorski & Stringer, 2007; Iozzo et al., 2001; Pan et al., 2014; Parish, 2006; Stringer, 2006; Tiwari et al., 2012; Wadström & Ljungh, 1999), adhesión de patógenos a células eucariotas (Aquino et al., 2010; Bartlett & Park, 2010; Wadström & Ljungh, 1999), unión de virus a espermatozoides mediante la interacción de proteínas de la cápside viral con HSPG en la superficie de la cabeza de los espermatozoides (Mao et al., 2019).

Los HSPGs están distribuidos a lo largo y ancho del tracto reproductor femenino y hay evidencia de que los mismos se encuentran involucrados en la regulación de la foliculogénesis (Rodgers et al.,

2003), la modulación de la viabilidad y capacitación espermática a lo largo del transporte de los espermatozoides por el oviducto (Bergqvist & Rodríguez-Martínez, 2006; Tienthai et al., 2000), la regulación del ciclado endometrial (Germeyer et al., 2007; Kelly et al., 1995; Lai et al., 2007; Potter & Morris, 1992; Xu et al., 2007), la transmisión de la infección genital de HIV (Bobardt et al., 2007; Saïdi et al., 2007) y el crecimiento vaginal (Cano-Gauci et al., 1999; Inki, 1997).

El HS es abundante en el estroma del istmo y *corpus* de la trompa de Falopio, no así en el cérvix; la concentración de HS en esas regiones es la misma en mujeres embarazadas y no embarazadas (Cabrol et al., 1985) y los niveles de expresión de HSPG en el ovario permanecen constantes a lo largo del ciclo (De Agostini, 2006).

Los GAGs encontrados en los fluidos tubario y folicular estimulan de manera dependiente de la dosis la capacitación y la reacción acrosomal en los espermatozoides de jabalí, carnero y toro *in vitro* (Chavarría & Reyes, 1996; Lenz et al., 1982; Mahmoud & Parrish, 1996; McNutt & Killian, 1991; Medeiros & Parrish, 1996; Parrish et al., 1988; Varner, 1995). En el toro y el conejo se encontró que el grado de sulfatación del GAG está relacionado con la potencia de la inducción de la RA. Los GAGs están presentes en el oviducto de cerdos, particularmente en el lugar en que se forma el reservorio espermático, aumentando la concentración de los mismos durante el estro preovulatorio (Tienthai et al., 2000).

Se han descrito efectos significativos sobre la reproducción como resultado de alteraciones en el metabolismo de HS. Los ratones deficientes en *Hs3st1*, la enzima HS-3-O-sulfotransferasa (3-OST-1), esencial en la síntesis de HS y limitante de velocidad de la misma, han demostrado disminución en su fertilidad (Mohammadi et al., 2003), exhibiendo una reducción en el número de embriones preimplantatorios, un período reproductivo acortado y un ciclo estral alterado. Los embriones que logran implantarse mueren por hemorragias masivas e inflamación del tracto genital y los que sobreviven exhiben un fenotipo consistente con restricción de crecimiento intrauterino (Nelson & Greer, 2008).

Por otra parte, los efectos de la acumulación indebida de GAGs sobre la función reproductiva, por ejemplo, en las mucopolisacaridosis (MPS), son prácticamente desconocidos, pero se cree que la acumulación de estos podría influenciar parámetros reproductivos morfológicos y fisiológicos. Se han observado cambios morfológicos significativos en los testículos, epidídimos y espermatozoides de ratones macho con MPS I. El desempeño reproductivo de los ratones KO se ve perjudicado, no

se observa eyaculación en los ratones macho independientemente de la edad, y se ve un pobre desempeño sexual, aunque son capaces de fecundar hembras sanas (Barbosa Mendes et al., 2019).

El glicocáliz del espermatozoide.

“Los glicanos espermáticos parecen estar en un lugar privilegiado para transmitir una gran y variada cantidad de información en un paquete pequeño y dulce ” (Teclé & Gagneux, 2015).

El glicocáliz espermático comprende una serie de glicoproteínas, glicanos simples y ramificados, algunos formando largas cadenas polisacarídicas (Cohen & Varki, 2010; Teclé & Gagneux, 2015) (Figura 30). Los proteoglicanos que albergan glicosaminoglicanos largos (p. ej., heparán sulfato o condroitín sulfato) se superponen y se extienden hacia el exterior de la membrana. Abundantes glicoproteínas ancladas con GPI añaden grosor al glicocáliz y las glicoproteínas poco asociadas se adhieren sin anclaje directo a la membrana por debajo (Teclé et al., 2019).

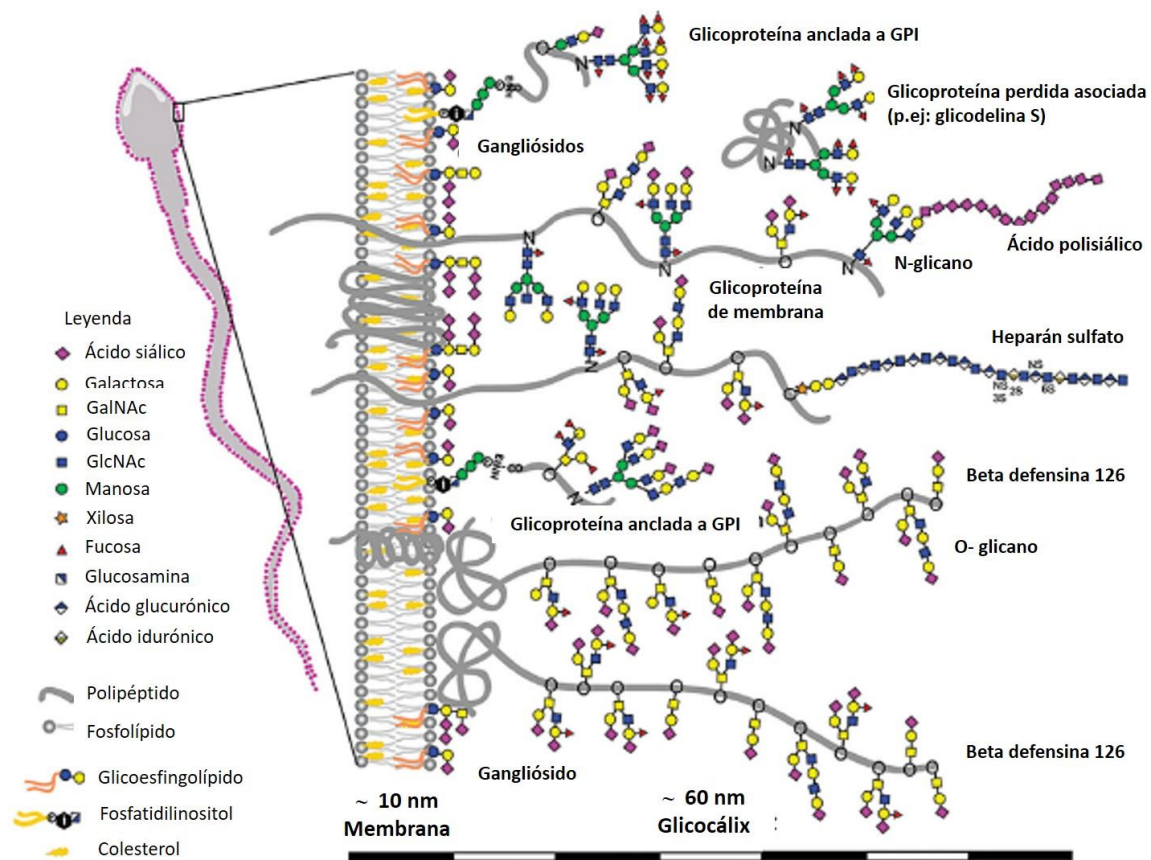


Figura 30. Disposición del glicocáliz espermático. Se puede observar cómo se disponen los diferentes glicanos, glicoconjugados, glicolípidos, glicoproteínas y demás, en una porción de la membrana plasmática del espermatozoide humano según lo que se conoce hasta el momento. Tomado y adaptado de Teclé & Gagneux, 2015.

El glicocáliz del espermatozoide se va modificando a lo largo de su vida. En el epidídimo, la actividad de glicosidasas y glicosiltransferasas modifica los glicanos que se formaron en el testículo (Bernal et

al., 1980; Tulsiani, 2006); el glicocálix del espermatozoide se modifica a medida que los glicoconjugados y epididimosomas, secretados por las células epiteliales se incorporan en la membrana del espermatozoide (Kirchhoff & Hale, 1996; Sullivan et al., 2007). Un glicocálix maduro le permite al espermatozoide penetrar el moco cervical en las especies que utilizan inseminación vaginal (Gilks et al., 1989; Tollner et al., 2008) y protege a los espermatozoides de la inmunidad humoral y celular en el útero (Pandya & Cohen, 1985; Thompson et al., 1992).

Como ya se ha mencionado, el pasaje desde el útero hacia el oviducto/trompa de Falopio requiere que el espermatozoide transite por la unión útero-tubaria, donde la anatomía femenina es compleja y existe una selección contra espermatozoides con proteínas mal plegadas (Nakanishi et al., 2004). Las interacciones mediadas por glicanos parecen estar involucradas en la adhesión de los espermatozoides al epitelio oviductal (Suarez & Pacey, 2006; Suarez, 2008; Tollner et al., 2008a; Tollner et al., 2008b) durante la formación del reservorio espermático en mamíferos (Pollard et al., 1991) en el istmo del oviducto/trompa. Asimismo, la capacitación modifica este glicocálix espermático (Ma et al., 2012; Tollner et al., 2012; Diekman, 2003) (Figura 31).

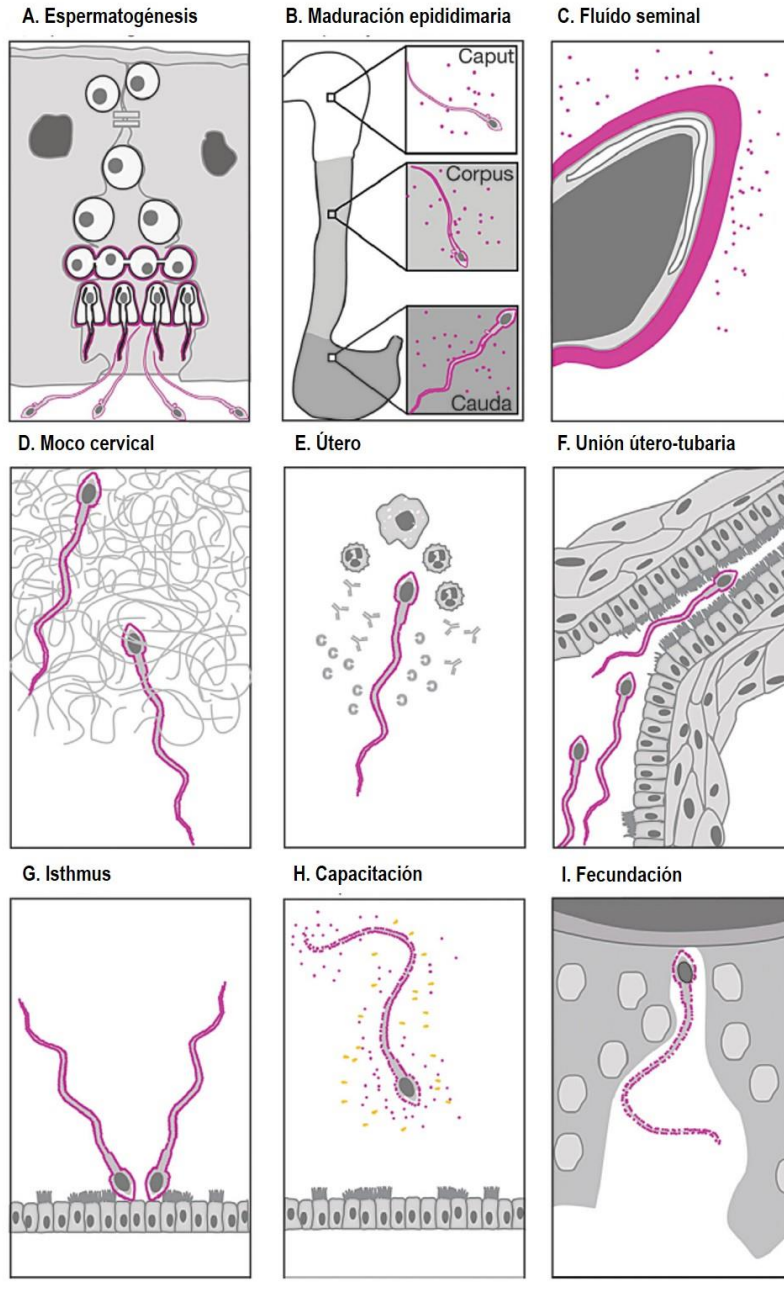


Figura 31. Funciones del glicocáliz espermático. **A.** Plegamiento de proteínas dependiente de N-glicosilación durante la espermatogénesis y adhesión de células espermáticas-Sertoli. **B.** Modificación de glicanos del espermatozoide definida espacialmente en el epidídimo. **C.** Los componentes seminales agregados al glicocáliz mantienen al espermatozoide no capacitado y con el acrosoma intacto. **D.** El paso a través del moco cervical requiere de glicoproteínas beta-defensinas sialiladas en primates. **E.** Glicanos inmunomoduladores, incluidos los "patrones moleculares autoasociados" y las señales inmunosupresoras, ayudan a la supervivencia de los espermatozoides en el útero. **F.** El paso de los espermatozoides a través de la unión útero-tubaria es facilitado por el plegamiento dependiente de la glicosilación de proteínas ADAM. **G.** Formación del reservorio de espermatozoides por la unión de estos al epitelio oviductal, que se cree es dependiente de glicanos. **H.** Pérdida de glicanos, glicoproteínas y colesterol durante la capacitación. **I.** Exposición de moléculas funcionales enmascaradas en la superficie del espermatozoide que permiten la interacción de los espermatozoides con el oocito. Tomado y adaptado de Teclé & Gagneux, 2015.

Fragmentación del DNA del espermatozoide.

La fragmentación del DNA es un proceso natural que le ocurre a las células al entrar en apoptosis y que, en general, se da como consecuencia del daño producido por especies reactivas del oxígeno (ROS). Los espermatozoides, a pesar de la protección que les otorga su organización nuclear compacta y en forma de toroide (Aitken et al., 2012), son vulnerables al daño por estrés oxidativo ya que sufren una pérdida casi completa del citoplasma, que deja al núcleo más expuesto a noxas en general y ROS en particular. Si bien el plasma seminal posee grandes concentraciones de antioxidantes que ayudan al espermatozoide a disminuir el daño al DNA por estrés oxidativo (Lazzarino et al., 2019), un desbalance en la relación entre el estrés oxidativo generado y la actividad antioxidante posibilita que las ROS provoquen fragmentación del DNA espermático (Saleh et al., 2002; Simon et al., 2017).

Se ha descrito que el estrés oxidativo puede llevar a fallas en la remodelación de la cromatina durante las últimas etapas de la espermiogénesis y a una pobre protaminación de la misma (Aitken, 2017), y es bien sabido que existe relación entre una pobre condensación de la cromatina y una mayor susceptibilidad al ataque de especies reactivas del oxígeno (Aitken & Baker, 2013). Por otra parte, la expresión aberrante de pequeños RNA no codificantes, incluyendo los miRNAs (Gou et al., 2014), o de modificaciones postraduccionales de histonas (Das et al., 2017) están asociadas a daños en la funcionalidad de las células germinales y entre ellos un aumento de la apoptosis, mecanismo testicular principal que origina fragmentación del DNA espermático (Muratori & De Geyter, 2019).

Actualmente se sabe que la fragmentación del DNA espermático afecta tanto a la reproducción natural (Evenson, 1999; Giwercman et al., 2010; Muratori et al., 2015) como a la asistida (Robinson et al., 2012; Simon et al., 2017) y, así, representa un serio problema en la sociedad actual, en la cual la infertilidad de las parejas se está convirtiendo en un tema de prioridad para la salud pública (Muratori et al., 2019). Más aún, estudios en modelos animales demuestran importantes efectos en la salud de la descendencia, tal como el desarrollo de tumores, después de ICSI con espermatozoides a los cuales se les indujo fragmentación del DNA por criopreservación (Fernández-Gonzalez et al., 2008). Es de tal importancia el daño por estrés oxidativo en los espermatozoides y la subsecuente fragmentación del DNA espermático, que recientemente se estableció un consenso a nivel mundial en el cual se propuso una nueva categoría de infertilidad masculina: MOSI (Infertilidad Masculina por Estrés Oxidativo, por sus siglas en inglés). Se trataría un descriptor de infertilidad masculina que

presenta parámetros seminales anormales y estrés oxidativo, lo que incluye a muchos pacientes que antes eran clasificados como con infertilidad idiopática (Agarwal et al., 2019).

La relación observada entre estrés oxidativo y fragmentación espermática llevó a postular que las terapias con antioxidantes deberían ayudar a los pacientes con altos índices de fragmentación del DNA, pero sin embargo no hay aún consenso a este respecto entre profesionales y expertos.

Además de los ya mencionados defectos intrínsecos que pueden predisponer al espermatozoide a daño del DNA, factores ambientales como el fumar, inflamación del tracto genital, varicocele y deficiencias hormonales se han asociado con un aumento del nivel de daño al DNA en humanos y animales (Palermo et al., 2014). Una edad avanzada en el varón también está relacionada con la mayor ocurrencia de daño en el DNA espermático.

Sin duda la estabilidad del DNA espermático está relacionada con la fertilidad masculina, tomada como la capacidad de promover el desarrollo embrionario normal tras la fecundación. Esto sugiere que el estado de la cromatina espermática en el momento de la fecundación podría influir sobre el desarrollo de la expresión de genes paternos, lo cual podría ser tomado como el “factor de fertilidad masculina” en el desarrollo embrionario (D’occhio et al., 2007).

Hay un gran número de trabajos en la literatura que estudian la relación entre el daño del DNA espermático y la capacidad fecundante o el desarrollo embrionario. Muchos sostienen que conocer el estado del daño del DNA espermático, sería beneficioso para predecir la capacidad fecundante de un paciente o el desarrollo embrionario temprano luego de FIV/ICSI (Henkel et al., 2003; Tarozzi et al., 2009; Tavalae et al., 2009). Otros postulan lo contrario, sosteniendo que los niveles de daño del DNA espermático no estarían relacionados con dichos parámetros (Collin et al., 2008; Lin et al., 2008; Muriel et al., 2006). Se ha propuesto que el daño postmeiótico del DNA en el gameto masculino ocurre con regularidad y que la maquinaria de un oocito sano podría subsanarlo (Palermo et al., 2014).

Evenson y col. (2002), han sugerido que una combinación de parámetros convencionales y, en alguna medida el estado de la cromatina, deberían ser tenidos en cuenta para poder predecir la fecundidad masculina. Asimismo, Dozortsev y col. han considerado que es necesario que se conozca el estado del núcleo de los espermatozoides previo a la utilización de estos en un ICSI, no sin reconocer que se necesita más investigación para determinar las condiciones óptimas en las cuales se preservaría la integridad del DNA espermático (Dozortsev et al., 2003).

Es tal la importancia que se le ha asignado al estudio de la fragmentación del DNA espermático, que hay ocho ensayos diferentes para medirlo que ya están disponibles para su uso clínico. Brevemente, todos pertenecen a una de dos categorías principales: (a) los que directamente miden las fragmentaciones del DNA del espermatozoide ya sea por unión a una sonda o marcación del daño (TUNEL) o por visualización de la dispersión del DNA fragmentado al aplicar un campo eléctrico al espermatozoide en un gel (ensayo de COMET) y, (b) aquellos que miden la susceptibilidad al daño en el DNA espermático por condiciones generadas en el ensayo (SCSA o Ensayo de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD)) (Erenpreiss et al., 2006; Evgeni et al., 2014; Palermo et al., 2014). De los 9 meta-análisis realizados entre 2006 y 2017, concluyen que existe una relación perjudicial entre la fragmentación del DNA y el resultado clínico, y 3 no encuentran esa asociación (Pacey, 2018). Estos resultados deben ser considerados con cuidado, ya que no solo cada análisis utiliza diferentes métodos para medir la fragmentación del DNA, sino que también el resultado clínico se mide de diferente manera: tasa de embarazo, nacidos vivos, tasa de abortos espontáneos.

A pesar de las discrepancias entre los resultados publicados con respecto al efecto de la calidad del DNA sobre la reproducción, se ha llegado a sugerir que la evaluación del DNA del espermatozoide podría ser un indicador tanto de la salud del individuo y de su capacidad reproductiva, como de la importancia del ambiente y sus efectos (Bosco et al., 2018).

Uno de los ensayos más utilizados hoy en día es el ensayo de TUNEL, que mide directamente el nivel de fragmentación del DNA a través de la incorporación de desoxiuridina trifosfato (dUTP) a rupturas de simple y doble cadena del DNA en una reacción catalizada por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal, independiente de templado (Gorczyca et al., 1993) y que puede ser cuantificado por citometría de flujo o microscopía óptica de fluorescencia (Tarozi et al., 2007).

Importancia de esta investigación.

I. Relevancia del HS en la funcionalidad espermática.

Tal como se mencionara anteriormente, se ha descrito la presencia de HS en el espermatozoide humano (Ceballos et al., 2009) y que dicha molécula actúa como mediador en interacciones del tipo ligando-receptor específicas (FGF, HIV, HPV, entre otros) (Ceballos et al., 2009; Foresta et al., 2011; Lin et al., 1999; Vivès et al., 2014), pero aún se desconoce cuál es su localización en el gameto masculino.

En nuestro laboratorio, se ha estudiado y demostrado que el HS presente en el oocito participa del proceso de descondensación de la cromatina espermática luego de la fecundación. Por lo tanto, resulta de sumo interés dilucidar si el HS presente en la superficie del espermatozoide humano participa también en este proceso, o está involucrado en otros eventos a lo largo del proceso reproductivo.

El HS se encuentra presente en el tracto reproductor femenino en el humano tanto en el complejo *cumulus*-oocito (COC), como en el fluido folicular, donde su concentración varía de acuerdo con la maduración del folículo (Hunter, 2003) y en el fluido tubario, donde podría participar en la regulación de la interacción espermatozoide-oviducto (Talevi & Gualtieri, 2010).

La participación de la dupla GSH / HS que se describiera en nuestro laboratorio en el proceso de descondensación de la cromatina espermática, también fue observada en otros eventos que involucran al espermatozoide durante su trayecto hacia el oocito en el tracto reproductor femenino como, por ejemplo, en el proceso de capacitación (Bergqvist & Rodríguez-Martínez, 2006) y en la interacción con células oviductales/tubarias (Batista et al., 2016; Gualtieri, Mollo, Barbato, & Talevi, 2010a) La existencia de esta última interacción ha sido demostrada en diferentes especies, incluida la humana (Baillie et al., 1997) y es fundamental para la formación de un reservorio de espermatozoides funcionales en el oviducto/trompas de Falopio de modo de asegurar un adecuado número de espermatozoides viables, potencialmente fértiles y capaces de fecundar (Talevi & Gualtieri, 2010). Esta interacción se ha estudiado en detalle en el bovino y se ha propuesto que tanto el GSH como glicosaminoglicanos tipo HS, modularían directamente la afinidad entre proteínas de la superficie del espermatozoide y el epitelio tubario (Talevi & Gualtieri, 2010). Si bien se ha descrito la existencia de reservorios espermáticos funcionales *in vivo* en el humano (Baillie et al.,

1997), las moléculas que regulan la interacción entre espermatozoide y epitelio tubario no han sido aún caracterizadas (Talevi & Gualtieri, 2010).

Se ha mencionado previamente que el glicocálix del espermatozoide humano participa en la interacción tanto con células epiteliales del útero como de las trompas de Falopio (Ardon et al., 2016; Suarez, 2016; Töpfer-Petersen, 1999). En porcinos, se encontró que distintos GAGs, entre ellos la heparina, están presentes en el oviducto y modulan la actividad de las proteínas secretadas por el epitelio y que estas, a su vez, modulan los parámetros espermáticos (Batista et al., 2015). En el bovino, los glicoconjugados sulfatados y tiorreductores presentes en el fluido oviductal son capaces de liberar a los espermatozoides bovinos unidos al epitelio oviductal *in vitro* a través de la tiorreducción de proteínas de superficie (Gualtieri et al., 2010).

Por lo tanto, se podría especular que el HS presente en la superficie del espermatozoide humano, podría participar en la interacción de este gameto con las células del tracto reproductor femenino, dado que tanto las células epiteliales de endometrio humano como las células epiteliales tubarias poseen receptores para heparina (Mo et al., 2006; Suarez, 2002; Watson et al., 2012).

Por otra parte, cabe recordar que se ha descrito la presencia de receptores para heparina en el espermatozoide humano, con lo cual resulta de interés evaluar la posible interacción entre el HS de las células endometriales y tubarias y los receptores de HS del espermatozoide, lo cual permitiría proponer la existencia de un mecanismo del tipo doble cerradura asociado a la formación del reservorio de espermatozoides en el istmo de la trompa de Falopio.

El conocimiento más acabado de los mecanismos moleculares involucrados en las distintas etapas del proceso reproductivo es de vital importancia no solo para poder identificar posibles fallas en el mismo, sino para el desarrollo tanto de nuevas metodologías diagnósticas como de estrategias de tratamiento de la infertilidad.

II. Implicancias clínicas de la descondensación sobre la funcionalidad espermática.

La infertilidad es un tema complejo que afecta, aproximadamente, al 15% de las parejas alrededor del mundo (Inhorn & Patrizio, 2015), y el factor masculino está involucrado en el 40% de los casos de infertilidad (Kumar & Singh, 2015). Si bien muchos estudios indican que la oligozoospermia es considerada como la causa más común de los problemas de fertilidad en las parejas, las anomalías hormonales, las anomalías genéticas como aberraciones en el cariotipo y microdeleciones del

cromosoma Y también son causales bien reconocidas (Gelbaya et al., 2014; McLachlan & O'Bryan, 2010; Olszewska et al., 2017). Finalmente, en los últimos años, se ha puesto de manifiesto la importancia de las modificaciones epigenéticas, es decir aquellas alteraciones en la expresión génica que no involucran cambios en la secuencia del DNA (Jones et al., 2015) en el estado reproductivo de un individuo (Rousseaux et al, 2005; Benchaib et al., 2005; Laqqan et al., 2019; Montjean et al., 2013; Filipponi & Feil, 2009; Aston et al, 2015; Jenkins et al., 2016; Laqqan et al., 2017).

Ya se ha mencionado que nuestro laboratorio estudia desde hace un tiempo el proceso de descondensación de la cromatina espermática *in vitro* en presencia de Hep y GSH, intentando desentrañar los mecanismos subyacentes a dicho proceso *in vivo*.

Se ha postulado que las alteraciones en el proceso de descondensación *in vitro* podría indicar un mal empaquetamiento de la cromatina del espermatozoide humano durante la espermiogénesis (Caglar et al., 2005). Esto a su vez, podría generar mayor daño al DNA como consecuencia de la acción de ROS, dando como resultado un aumento de la fragmentación del DNA espermático, tal como se observara en espermatozoides provenientes de muestras de semen de pacientes infértiles (Sakkas et al., 1996). Por otra parte, se ha demostrado que los pacientes infértiles que contienen mayor cantidad de espermatozoides apoptóticos en semen y, por ende, un elevado nivel de fragmentación del DNA espermático, presentan una disminución en la tasa de descondensación de la cromatina espermática *in vitro* luego de su inyección en ovocitos de hámster (Grunewald et al., 2009).

Sin embargo, se observan discrepancias en la importancia que se le atribuye al proceso de descondensación espermática en los ensayos de ICSI. Hay autores que indican que el resultado del ICSI no está influenciado por la condensación de la cromatina (Karydis et al., 2005) y otros que plantean que, tanto en procedimientos de inseminación intrauterina (IIU) como así también en ICSI, los resultados obtenidos se relacionan con la capacidad descondensante de los espermatozoides (Irez et al., 2015).

En nuestro laboratorio se llevó a cabo un estudio piloto hace ya unos años, en el que se evaluó la descondensación *in vitro* en presencia de Hep y GSH en un pequeño grupo de pacientes infértiles tomados al azar (n=29). Al analizar la cinética de descondensación de cada paciente individualmente (Gaubeca-Klix et al., 1998), se encontró que los pacientes podían agruparse en dos poblaciones diferentes: descondensadores rápidos que, al igual que los donantes fértiles alcanzan su

descondensación máxima a los 30 minutos de incubación, y descondensadores lentos, que alcanzan descondensación máxima a tiempos de incubación mayores.

Más recientemente, un nuevo estudio comenzado en nuestro laboratorio en pacientes infértiles sometidos a tratamientos de fertilización asistida, sugirió que los parámetros de descondensación *in vitro* en presencia de Hep y GSH no se relacionarían con la tasa de fertilización o la tasa de clivaje, pero sí con la calidad embrionaria al día 3 (Julianelli et al., 2013). Valdría la pena recordar aquí que el día 3 de desarrollo embrionario en el humano, marca el comienzo de la expresión del genoma paterno, con lo cual la descondensación *in vitro* en presencia de Hep y GSH podría estar relacionada con la competencia del genoma paterno.

Por último, en nuestro laboratorio se pudo evaluar la capacidad descondensante *in vitro* en presencia de heparina y GSH en un grupo muy pequeño (n=6) de pacientes que presentaron fallas de descondensación *in vivo* en procedimientos de ICSI (Galotto, 2015). Los resultados pusieron de manifiesto que, si bien todos los pacientes habían tenido una falla de descondensación *in vivo*, los niveles de descondensación máxima alcanzada *in vitro* fue muy variable: 1 alcanzó niveles de descondensación comparables a los donantes, 2 descondensaron más y 3 menos. Por supuesto que una falla en la descondensación nuclear *in vivo* podría ser tanto de origen espermático como oocitario; sin embargo, un paciente que descondensa *in vitro*, pero no *in vivo* (procedimiento de ICSI) sería diferente que aquel que no descondensa de ninguna manera. En el primer caso, podría tratarse de una falla oocitaria y en el segundo podría en cambio tratarse de una falla espermática. Así el ensayo de descondensación *in vitro* en presencia de Hep y GSH podría tener implicancias en el futuro terapéutico de estos pacientes.

Desafortunadamente los resultados de este estudio no pudieron corroborarse con un número mayor de pacientes dado que estas muestras son extremadamente difíciles de conseguir, porque hay que volver a citar al paciente para que provea una nueva muestra de semen una vez realizado el ICSI y observada la falla de descondensación. A pesar de ello, apoyan la idea que el ensayo de descondensación *in vitro* en presencia de Hep y GSH podría resultar de utilidad en el diagnóstico y tratamiento de parejas infértiles.

Toda la evidencia reunida en nuestro laboratorio y aquí señalada, sumada a la controversia existente en la literatura acerca de la relación entre descondensación espermática, fragmentación del DNA

espermático y capacidad fecundante, fueron el punto de partida para llevar a cabo el estudio con pacientes que realizaron tratamiento de fertilización asistida que se incluye en esta tesis.

Hipótesis

El heparán sulfato, asociado a la superficie del espermatozoide, actúa como co-receptor para favorecer la interacción de este gameto con la superficie del oviducto. Una vez liberado el espermatozoide del “reservorio funcional”, se produce la interacción con el oocito y sus envoltorios. Dentro del oocito, el heparán sulfato presente en el ooplasma, junto con el GSH oocitario, promueven la descondensación de la cromatina espermática, requisito indispensable para la formación del pronúcleo masculino y la singamia y, por ende, para una fecundación exitosa.

Objetivos

Objetivos generales.

Consecuentemente, para este proyecto se han planteado los siguientes objetivos generales:

1. Estudiar la presencia de HS endógeno y/o adquirido en espermatozoides humanos a lo largo de su vida post eyaculatoria con miras a dilucidar la dinámica de la interacción entre el espermatozoide y el HS y el posible rol biológico del mismo.
2. Caracterización de la interacción entre las células epiteliales de trompas de Falopio y espermatozoides humanos mediada por HS y sus receptores.
3. Correlacionar el proceso de descondensación del espermatozoide humano *in vitro* con lo observado en la clínica a través de los procedimientos de fertilización asistida, poniendo énfasis en el papel de heparina/HS.

Objetivo general 1. HS en el espermatozoide y su rol biológico.

1.1 Determinar la localización celular del HS expresado por el espermatozoide eyaculado y evaluar la permanencia, desaparición o relocalización de éste durante la capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide humano *in vitro*.

1.2 Evaluar la posibilidad de asociación del HS / heparina al espermatozoide humano en distintos estadios después de la eyaculación: espermatozoides eyaculados, capacitados, reaccionados y núcleos espermáticos aislados.

1.3 Evaluar el posible rol biológico del HS espermático, ya sea endógeno o adquirido, en el proceso de descondensación nuclear *in vitro*.

1.4 Evaluar el posible rol biológico del HS espermático en el proceso de fertilización, en la interacción con las células del *cumulus*, con la zona pelúcida y con la membrana plasmática del oocito.

Objetivo general 2. Caracterización de la interacción entre las células epiteliales de trompas de Falopio y espermatozoides humanos, mediada por HS y sus receptores.

2.1 Realizar un cultivo estable de células epiteliales obtenidas de la zona del istmo de la trompa de Falopio. Determinar la interacción entre estas células y los espermatozoides humanos, mediante la cuantificación de espermatozoides unidos a las mismas por observación al microscopio invertido con contraste de fase.

2.2 Estudiar dicha interacción en diferentes condiciones, estableciendo específicamente cómo es la interacción mediada por HS y sus receptores, presentes ambos tanto en las células epiteliales de la trompa de Falopio como en el espermatozoide.

Objetivo general 3. Correlacionar el proceso de descondensación del espermatozoide humano *in vitro* con lo observado en la clínica a través de los procedimientos de fertilización asistida, poniendo énfasis en el papel de heparina/HS.

3.1 Correlacionar la descondensación de la cromatina espermática *in vitro* en presencia de heparina o HS en espermatozoides provenientes de muestras de semen de pacientes infértiles con: fragmentación del DNA espermático, tasa de fertilización *in vitro*, tasa de clivaje y calidad embrionaria, tasa de implantación y embarazo.

Materiales y métodos.

Muestras de semen de donantes.

Para llevar a cabo los experimentos relacionados con espermatozoides humanos, se utilizaron muestras de semen provenientes de donantes voluntarios normozoospermicos de acuerdo con los criterios establecidos en el Manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS 4ª Edición, 2010). Se determinaron diferentes parámetros espermáticos (volumen, motilidad, viabilidad, concentración y porcentaje de descondensación de la cromatina) y se las procesó según los requerimientos de los diferentes ensayos que se describirán más adelante.

Los donantes normozoospermicos fueron individuos sanos, sin antecedentes de problemas de infertilidad conocidos, con declaración de no pertenecer a grupos de riesgo o potencialmente portadores de virus de Hepatitis B o HIV, según su leal saber y entender, tal como se desprende del consentimiento informado que firmaron. Dicho consentimiento, permanece en el laboratorio del Dr. Calvo para preservar el anonimato de los donantes, y expresa que el uso del material biológico será exclusivamente experimental, según los protocolos detallados y que la muestra será procesada de inmediato, quedando inutilizada para cualquier tipo de ensayo de fertilización homóloga o heteróloga. Los Comités de Ética del Hospital Italiano y del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) revisaron y aprobaron el consentimiento informado y el protocolo de investigación.

Las muestras de semen fueron obtenidas por masturbación y entregadas por los donantes en el IBYME, mediando aviso previo a las personas encargadas de recibirla. La entrega se realizó tal como se indica en el procedimiento de Bioseguridad elaborado por la Comisión correspondiente del IBYME, es decir en doble contenedor para evitar cualquier derrame y, al momento de ingresar a la institución, fue considerada como muestra potencialmente riesgosa y manipulada como tal. Esto implica el uso de guantes, protección ocular, guardapolvo y el personal involucrado cuenta con la vacunación requerida (antitetánica, Hepatitis B). Una vez procesada la muestra, el sobrante fue descartado como material patogénico junto con los recipientes utilizados para su manejo y los espermatozoides recuperados fueron utilizados para los experimentos correspondientes.

Muestras de semen de pacientes.

Las muestras de semen de pacientes fueron provistas por la clínica de fertilidad PROCREARTE y por la División de Andrología del Servicio de Urología del Hospital Italiano de Buenos Aires (HIBA), de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión elaborados oportunamente. Brevemente, se incluyeron parejas con indicación de realizar un procedimiento de FIV con técnica de ICSI, con oocitos propios o donados, cuyas mujeres presentan cavidad uterina normal y cuyos varones poseían semen apto para aquel procedimiento. No participaron del estudio aquellas parejas que cumplían con uno o más de los siguientes criterios:

- 1) muestras de semen que tenían menos de 5 millones de espermatozoides/mL,
- 2) menos de 4 oocitos maduros para inseminar,
- 3) 2 o más ciclos previos de FIV (consecutivos o no) con baja respuesta a la estimulación hormonal (3 o menos oocitos),
- 4) 3 o más ciclos previos consecutivos de FIV sin un embarazo bioquímico o clínico,
- 5) falla de fertilización previa en ICSI,
- 6) intento previo de FIV sin espermatozoides móviles o adecuados (no se permite espermatozoides epididimarios o testiculares),
- 7) síndrome de hiperestimulación ovárica (SHEO) severo previo,
- 8) historia de tumor hipofisario o hipotalámico,
- 9) historia o presencia de cáncer mamario, uterino u ovárico,
- 10) historia o presencia de aumento ovárico o quiste de etiología no conocida,
- 11) presencia de endometriosis grado III o IV,
- 12) presencia de hidrosalpinx uni o bilateral,
- 13) sangrado ginecológico anormal de origen no determinado,
- 14) contraindicación de embarazo,
- 15) historia de 3 o más abortos o pérdidas preclínicas por cualquier causa,
- 16) embarazo ectópico en los 3 meses previos, o enfermedad sistémica significativa,
- 17) HIV, hepatitis C o B conocida en el hombre o la mujer,
- 18) alergia a las gonadotrofinas u otra medicación administrada durante el tratamiento,
- 19) abuso de drogas o alcohol en los 5 años previos,
- 20) FIV en los 30 días previos a la firma del consentimiento,
- 21) fumar más de 5 cigarrillos por día,

22) Si requiriera “hatching” asistido o PGD (Diagnóstico Genético Preimplantacional, por sus siglas en inglés).

Utilización de ratones.

Para los experimentos con ratones (hembra y macho) se utilizaron ratones provenientes del Bioterio de IBYME, siguiendo la reglamentación de la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), que evaluó y aprobó los protocolos experimentales. Los animales fueron hospedados en jaulas, agrupados de a 3 o 4 animales del mismo sexo, recibieron alimento “Balanceado Cooperación Rata-Ratón” (Asociación Cooperativas de Alimentos S.A., Buenos Aires, Argentina) y agua *ad libitum*; y se criaron a una temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ con períodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. El cuidado y la manipulación de los animales se realizaron respetando la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud (NIH, 8th ED. 2010, NRC, USA) de Estados Unidos y de la Directiva 2010/63/UE.

Obtención de muestras del istmo de la trompa de Falopio.

Las muestras de tejido tubario fueron obtenidas gracias a la colaboración establecida con el Hospital Italiano de Buenos Aires (HIBA), previa aprobación de los Comités de Ética tanto del HIBA como del IBYME. Las personas involucradas, otorgaron su consentimiento por escrito y recibieron una copia firmada del mismo. Se siguieron los principios de Buenas Prácticas Médicas acorde a la Declaración de Helsinki y a la Ley Nacional 25326 de protección de datos personales. El material obtenido se utilizó exclusivamente para los experimentos que conciernen a esta Tesis Doctoral. Los criterios de inclusión de las pacientes fueron: pacientes que debieron ser sometidas a un procedimiento quirúrgico de anexectomía o anexohisterectomía por indicación médica; edad mayor de 18 años; edad fértil y fertilidad previa probada (al menos un embarazo a término). Los criterios de exclusión fueron: patología tubaria conocida (salpingitis, absceso tuboovárico, obstrucción tubaria, hidrosalpinx); diagnóstico de endometriosis y enfermedad oncológica. El tejido tubario humano se obtuvo por intervención quirúrgica y fue procesado dentro de las 2 horas posteriores a la cirugía, siendo transportado en hielo desde el HIBA hacia el IBYME.

Evaluación de parámetros del espermograma

Concentración espermática.

La concentración de espermatozoides se determinó utilizando una cámara de Neubauer. Para ello, se diluyó la muestra de semen (1:20) en agua y se colocaron 7 μL de la misma en cada grilla de la cámara. Se contó el número de espermatozoides por observación en el microscopio de contraste de fase (Olympus CH2) a 400x (valor normal: mayor a 20×10^6 espermatozoides/mL). Simultáneamente, se determinó la cantidad de células redondas, siendo un valor normal menor a 1×10^6 células/mL.

Motilidad.

Para la determinación del porcentaje de espermatozoides móviles se colocó una alícuota de 10 μL de semen entre porta y cubreobjetos y se observó al microscopio de contraste de fase a 400x. Se determinó el porcentaje de espermatozoides móviles sobre un total de 200 células observadas.

Viabilidad.

El porcentaje de espermatozoides vivos se determinó utilizando el colorante de exclusión Eosina Y. Una alícuota de 5 μL de muestra de semen se mezcló con 5 μL de colorante (0,5 mg/mL en PBS) y se homogeneizó cuidadosamente entre porta y cubreobjetos. Se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos (no teñidos de rojo) sobre un total de 200 espermatozoides mediante observación al microscopio óptico a 400x. (Valor normal: >70% células vivas).

Procesamiento de la muestra de semen.

Todas las muestras de semen utilizadas en los experimentos fueron tratadas como se describe a continuación:

Luego de la licuefacción (media hora o más luego de la obtención la muestra), y con el objeto de remover el plasma seminal, las muestras de semen fresco se lavaron por centrifugación a 300 xg durante 10 minutos en medio HTF (Human Tubal Fluid), diluyendo la muestra a 3 o 4 veces su volumen. Al pellet resultante, se lo lavó dos veces más resuspendiendo en 1 mL de HTF-BSA 2,6 % (albúmina sérica bovina, HTF 26B) (Sigma Aldrich, N° Cat: 5479; Bovine serum albumin fraction V) a 300 xg durante 10 minutos, cada vez. Con el fin de obtener la fracción de espermatozoides móviles, al pellet obtenido se lo resuspendió en medio HTF 26B aplicando la técnica de “*Swim up*” tal como se detalla a continuación.

Obtención de una fracción altamente mótil.

A los espermatozoides lavados se les aplicó la técnica de “*Swim-up*” para obtener una fracción con alto porcentaje de espermatozoides móviles. Para ello, sobre el pellet de espermatozoides, se agregó 1 mL de medio HTF 26B gota a gota y con cuidado para no remover el pellet formado y se incubó en tubos inclinados a un ángulo de 45° durante 90 minutos a 37 °C en atmósfera de 5 % CO₂ en aire. Al cabo de dicho tiempo se recuperó cuidadosamente el sobrenadante, con cuidado de no remover el pellet que contiene los espermatozoides con pobre motilidad o motilidad nula, y se calculó la concentración y motilidad de los espermatozoides recuperados tal como se detallara anteriormente.

Incubación en condiciones capacitantes.

La concentración de espermatozoides recuperados del “*Swim-up*” se ajustó entre 3 a 5 x 10⁶ espermatozoides/mL y se incubó (en los casos donde se especifica) durante 18 h en HTF 26B en tubos cónicos de 15 mL, parcialmente tapados, a 37 °C y en una atmósfera de 5 % CO₂ en aire. Estas condiciones promueven la capacitación espermática (Brackett & Oliphant, 1975), simulando lo que ocurre *in vivo* en el tracto reproductor femenino.

Inducción de reacción acrosomal.

Espermatozoides incubados en condiciones capacitantes se resuspendieron en 400 µL de solución de ionóforo de calcio (A23187) 10 µM en HTF-26B o en 400 µL de solución DMSO (Sigma Aldrich, N° Cat: D5879) en HTF-26B (control negativo). Pasados 45 minutos de incubación, a temperatura ambiente y en oscuridad, se frenó la reacción agregando el doble de volumen de medio HTF 26B y se lavó durante 5 minutos a 300 xg.

Preparación de las distintas condiciones para inmunocitoquímica de espermatozoides humanos.

La fracción de espermatozoides recuperados de “*Swim up*” (llamada SUP) se lavó dos veces con 1 mL de PBS a 37 °C (1400 rpm, 10 minutos cada vez). Se sembraron 20 µL (1 x 10⁶ espermatozoides/mL) sobre portaobjetos con pocillos pretratados con 0,01 % de poli-L-lisina en PBS (Sigma Aldrich, N° Cat: 5920). Se dejó secar sobre platina térmica, se fijó con 20 µL de

paraformaldehído al 4 % (PFA; Sigma Aldrich, N° Cat: P6148) durante 15 minutos. Luego se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-Tween 0,1 % (PBS-T) (Tween 20, US Biological, N°Cat: P4379), se dejó secar y se guardó en heladera en cámara húmeda y oscuridad.

Al resto de la muestra SUP, se la incubó en condiciones capacitantes tal como se detallase previamente y a esta muestra se la llamó ICC (*Incubados en Condiciones Capacitantes*). Al día siguiente, se tomó una alícuota de 20 μ L y se la fijó sobre portaobjetos tal como se detallara para la muestra SUP.

Al resto de la muestra ICC, se la incubó en condiciones inductoras de la reacción acrosomal tal como se detallase previamente y se la llamó RAI (*Reacción Acrosomal Inducida*). Tal como se hiciera para SUP e ICC, se fijaron 20 μ L de muestra RAI (Figura 32).

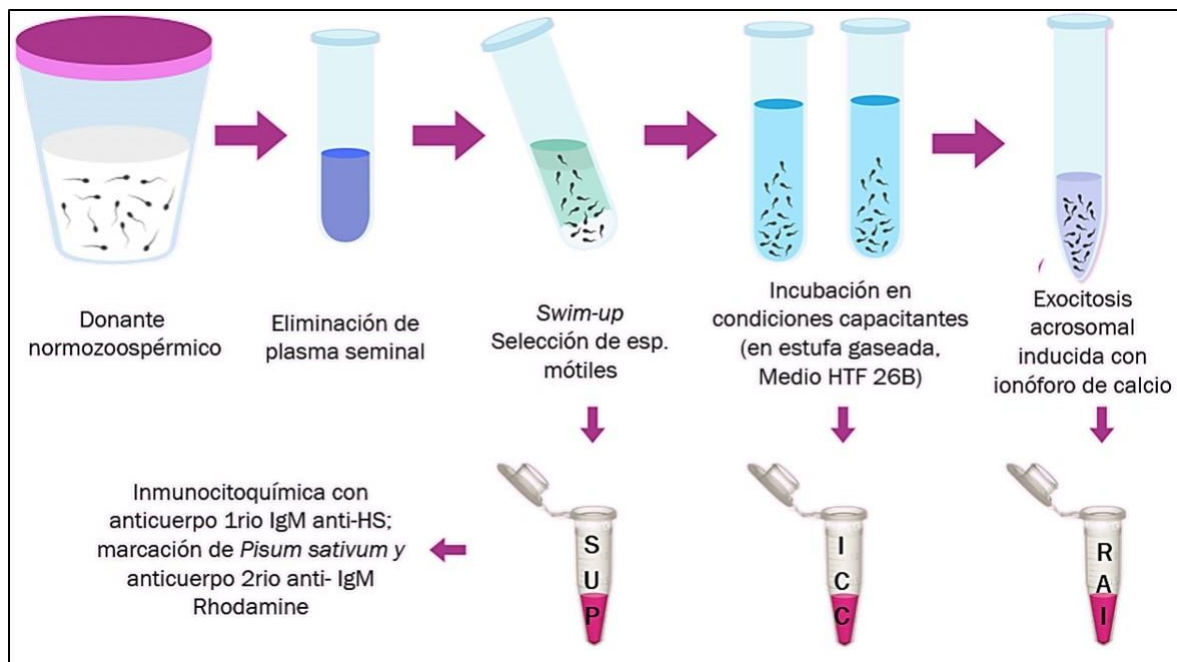


Figura 32. Diseño experimental de la preparación de muestras para inmunocitoquímica de espermatozoides humanos.

Se explica, en detalle desde la llegada de la muestra, cuáles fueron las condiciones analizadas. A muestras de donantes normozoospermicos, se las lavó, se les realizó la selección de espermatozoides móviles por "Swim up", se incubó en condiciones capacitantes y se indujo la reacción acrosomal con ionóforo de calcio. Luego, a cada una de las tres alícuotas se les realizó el protocolo de inmunocitoquímica.

Inmunocitoquímica de espermatozoides SU, ICC y RAI.

Todos los pocillos sembrados se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada vez con PBS-T 0,1 %. Luego, se agregó a cada pocillo 20 μ L de solución de bloqueo (BSA 10 % en PBS-T 0,1%) durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Pasado dicho tiempo, se retiró la gota de bloqueo y se agregó 20 μ L de solución de anticuerpo primario (dilución 1:20) (monoclonal IgM anti-HS de ratón (US Biological; N° Cat: H1890 anti-Heparán Sulfato (epitope 10e4) Mab MoxHu) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se descartó la solución de anticuerpo primario y se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno, con PBS-T 0,1 %. Se agregaron, en oscuridad, 20 μ L de solución de lectina de *Pisum sativum* marcada con fluoresceína (PSA; Sigma Aldrich; N° Cat: 0770) (100 μ g/mL) durante 1 h a temperatura ambiente. Pasado dicho tiempo, se retiró la gota de PSA y se lavó 3 veces (10 minutos cada vez) con PBS-T 0,1%. Posteriormente, a cada pocillo se le agregaron 20 μ L de solución de anticuerpo secundario durante 2 h a temperatura ambiente, en cámara húmeda y oscuridad (anticuerpo policlonal anti-IgM conjugado con Rodamina hecho en cabra, US Biological, N° Cat: I1904-48F7). Finalmente, se hicieron 3 lavados con PBS (10 minutos cada vez), se agregaron 3 μ L de Vectashield H-1000 (VectorLabs) en cada pocillo, se colocó el cubreobjetos con cuidado de no hacer burbujas y se selló con esmalte. Se observó al microscopio invertido con Contraste de Interferencia Diferencial (DIC) para campo claro con módulo DSU (Disk Spinning Unit) en fluorescencia a 600x, se tomaron fotos de diferentes campos y se contaron los diferentes patrones de marcación.

Citometría de flujo.

Se siguió un protocolo modificado de Ceballos y col. (2009); brevemente:

Se tomaron 3×10^6 espermatozoides para cada condición SUP, ICC y RAI (positivo y negativo de cada fracción) y se lavaron con 500 μ L de PBS durante 8 minutos a 3000 rpm y 4 °C. Se descartó el sobrenadante y sobre el pellet seco se agregaron 20 μ L de solución de anticuerpo primario (19 μ L de buffer de citometría (SFB 1%; azida sódica 0,1 % en PBS) y 1 μ L de anticuerpo monoclonal anti-HS). Al control negativo se le agregaron 20 μ L de buffer de citometría. Se incubó durante 30 minutos a 4 °C y se lavó con 500 μ L de buffer de citometría durante 15 segundos, a 13000 xg a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y sobre el pellet seco se agregaron 20 μ L de solución de anticuerpo secundario policlonal anti-IgM-FITC de ratón (dilución 1:100 en buffer de citometría). Se incubó durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad y se lavó con 500 μ L de buffer de citometría durante 15 segundos, a 13000 xg a 4 °C. Cada pellet se fijó en 300 μ L de paraformaldehído al 1 % en buffer de

citometría y se guardaron en heladera, en oscuridad, hasta el momento de pasarlos por el citómetro de flujo (BD FACS CANTO 2. Software: FACS DIVA). Los datos se analizaron con el programa FlowJo, evaluándose la intensidad de fluorescencia para cada uno de los tres estadios espermáticos post-eyaculatorios analizados.

Cultivo de línea celular de epitelio endometrial humano (células ECC-1).

Se obtuvieron cultivos en monocapa de células de la línea ECC-1 (línea celular proveniente de células epiteliales de endometrio humano) en medio RPMI adicionado con 10 % piruvato de sodio y SFB al 10 % (Natocor), (línea ECC-1 donada por la Dra Gabriela Meresman del IBYME). Al llegar a monocapa, las células fueron repicadas utilizando tripsina-EDTA 0,25 % (Gibco; N° Cat: 25200072) a 37 °C durante 5 minutos. Para frenar la reacción enzimática se agregó el doble de volumen de medio RPMI 10 % SFB y se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm. Luego, se sembraron las células en una placa de 12 pocillos con medio RPMI, suplementado con 10 % SFB, y se las cultivó en estufa gaseada (5% CO₂ en aire) a 37 °C hasta llegar a confluencia.

Cocultivo de células ECC-1 y espermatozoides humanos.

Para evaluar la interacción mediada por HS y sus receptores, al cultivo de células en confluencia, obtenido tal como se indicara en el párrafo anterior, se le agregaron 500 µL de suspensión de espermatozoides humanos provenientes de SUP (8 x 10⁶ espermatozoides en medio RPMI-10 % SFB). Se cocultivaron ambos tipos celulares durante 2 h a 37 °C en atmósfera de 5 % CO₂ en aire. Luego se retiró la suspensión de espermatozoides y se lavó 5 veces con 1 mL de PBS (10 minutos cada vez). Luego del último lavado, se eliminó el sobrenadante y se fijó el pellet con glutaraldehído al 2,5 % en PBS (Sigma Aldrich; N° Cat: G6257).

Las condiciones evaluadas fueron las siguientes:

1. Células ECC-1 pretratadas con Hep 46 µM durante 2 h en medio RPMI-10 % SFB.
2. Espermatozoides pretratados con Hep 46 µM durante 30 minutos en medio HTF 26B.
3. Células ECC-1 pretratadas con heparinasa III (*Flavobacterium heparinum*) (0,04 mUI/mL) en medio RPMI 10% SFB, durante 1 y 3 h.
4. Espermatozoides pretratados con heparinasa III durante 30 minutos en medio HTF 26B.

5. Espermatozoides o células ECC-1 pretratadas con Hep 46 μM y heparinasa III (ambas en simultáneo) en medio RPMI 10 % SFB, durante 30 (Hep) o 120 (enzima) minutos.
6. Células ECC-1 y espermatozoides sin pretratar como control.

Se tomaron 20 fotos de cada pocillo a 400x, en microscopio invertido con contraste de fase y se contaron los espermatozoides unidos a las células endometriales.

Debe tenerse en cuenta que la heparinasa III de *Flavobacterium heparinum* es específica para HS, ya que cliva la unión 1 \rightarrow 4 entre la hexosamina y el residuo de ácido glucurónico en el HS, dejando mayormente disacáridos, y no degrada Hep o heparinas de bajo peso molecular, tal como se observa en la figura 33. Con lo cual, el pretratamiento combinado permitió observar, al mismo tiempo, el efecto del bloqueo de los receptores para HS y la falta de HS en ambos tipos celulares.

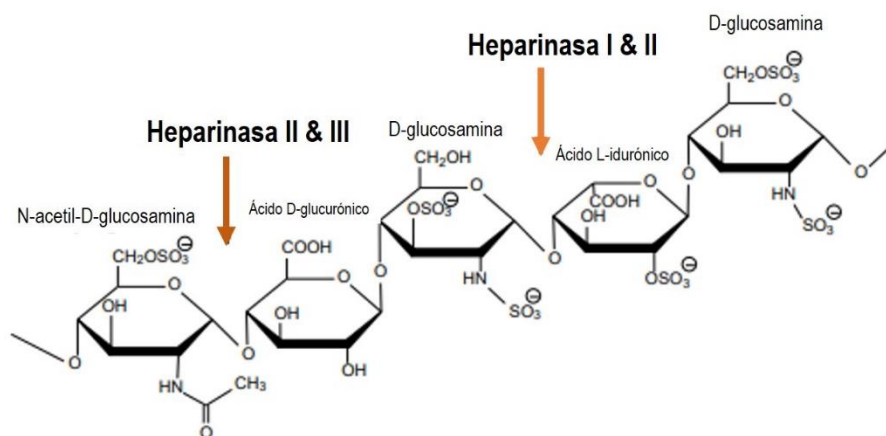


Figura 33. Acción de heparinasa III de *Flavobacterium heparinum*. Se señala el sitio de corte de la enzima utilizada en los experimentos, específica para HS.

Cultivo primario de células epiteliales de trompa de Falopio humana.

Las muestras de trompas de Falopio se obtuvieron de pacientes premenopáusicas, siguiendo los criterios de exclusión previamente descriptos.

Durante el desarrollo de esta Tesis, se pusieron a punto diferentes protocolos para la obtención del cultivo primario de células epiteliales a partir del istmo de la trompa de Falopio, (Morales et al., 1996; Quintero et al., 2005). Se utilizaron células del istmo de la trompa de Falopio. Estas células se mantienen estables a lo largo del ciclo menstrual, característica que elimina variabilidad asociada a las distintas regiones de la trompa (Pollow et al., 1982).

El primero de los protocolos utilizados fue el siguiente: 1) En el cuarto de cultivo y bajo campana de flujo laminar se colocó el istmo de la trompa de Falopio en una placa de Petri estéril para quitar el excedente de tejido conectivo. 2) En otra placa de Petri estéril se sostuvo un extremo con pinza y se colocó la hoja de la tijera en el interior del tubo, para cortar a lo largo y exponer el interior de ésta (tejido rosa claro). 3) Se colocaron 8 mL de PBS-EDTA 0,1 mM en una placa nueva y el trozo de trompa se colocó con su cara interna recién expuesta, ubicada hacia el piso de la placa para asegurar el contacto con el medio. Se incubó en estufa gaseada (5 % CO₂ en aire) y 37 °C durante 1 h. 4) Luego, se dio vuelta el tejido y con una hoja de bisturí se raspó la cara interna para separar mecánicamente las células epiteliales, descartando el resto de tejido. A las células así obtenidas se las lavó 2 veces con 500 µL de PBS a 300 xg durante 10 minutos, en tubos cónico de 15 mL. 5) Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de Buffer ACK (*Ammonium-Chloride-Potassium*, Cloruro de potasio y amonio, para la lisis de glóbulos rojos), durante 10 minutos. 6) Se agregó 1 mL de PBS y se centrifugó a 300 xg durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se volvió a lavar con PBS a 300 xg por otros 10 minutos. 7) Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en medio para cultivo de células tubarias (D-ME/F-12 suplementado con 10% de SFB, antibiótico PENSTREP (100 U/mL) y 2 mM de Glutamina). 8) Se aplicó la técnica de pegado diferencial para eliminar los fibroblastos de la muestra, es decir: en una placa de cultivo P100 (100 mm de diámetro) se colocaron 8 mL de suspensión celular en medio de cultivo y se incubaron durante 1, 2 y 24 h en estufa gaseada (5 %CO₂ en aire) a 37 °C.

Debido a que en estas condiciones no se logró separar los fibroblastos de las células epiteliales de interés, se lavaron las células nuevamente con medio de cultivo y se guardó la suspensión celular. En paralelo, a una placa de 24 pocillos, a cada pocillo se lo pretrató con 200 µL de solución de colágeno para formar una red de colágeno en su base. Luego de 1 h, se quitó el colágeno sobrante y se dejó secar la placa tapada. En cada pocillo con base de colágeno formada, se sembró 1 mL de células suspendidas en medio de cultivo, suficiente como para sembrar entre 5 y 8 pocillos, según la concentración obtenida. Luego de 48 h de cultivo, a 37 °C en estufa gaseada (5% de CO₂ en aire), se lavó 2 veces con 1 mL de PBS (5 minutos cada vez) y se colocó 1 mL de medio de cultivo fresco. Finalmente, el cultivo se mantuvo con cambios de medio (1 mL) en intervalos de 48 h, luego de un primer lavado con 1 mL de PBS, teniendo mucho cuidado para no remover las células adheridas a la base de la placa.

Ese protocolo presentó muchas dificultades a la hora de aplicarlo y no fue efectivo para eliminar los fibroblastos o pegar las células a la placa. Por lo tanto, se continuó con la puesta a punto de otros protocolos para, finalmente, llegar al que se utilizó en los experimentos que se muestran en este trabajo de tesis doctoral.

1. La muestra se procesó entre 1 y 2 h luego de la cirugía. En cuarto de cultivo y bajo campana de flujo laminar, se limpió el trozo de tejido (istmo de la trompa de Falopio) quitando grasa y restos excedentes de tejido conectivo. Se lavó exhaustivamente con PBS y se inyectaron 50 μ L de tripsina al 0,25 % en EDTA dentro del trozo de trompa Falopio, sosteniendo cada extremo con tijeras “*clamp*”, para impedir que la solución escapara del tejido. Se incubó durante 20 minutos, se retiraron las tijeras y se inyectaron otros 20 μ L de tripsina, agitando la trompa de izquierda a derecha durante 5 minutos.
2. Se sostiene un extremo del tejido con pinza y se coloca la hoja de la tijera en el interior del tubo, cortando a lo largo. Con una hoja de bisturí se raspó la cara interna para separar mecánicamente las células epiteliales y se descartó el resto de tejido. Las células así obtenidas se colocaron en medio D-MEM/F-12 base (Gibco; N° Cat: 12400024), suplementado con 10 % de SFB (Gibco) y 2 mM de Glutamina. Se lavó a 300 xg durante 10 min y, luego, se lavó nuevamente con 2 mL de PBS y se colocó en cada tubo cónico de 15 mL en el cual había sido dividida la muestra, 1 mL de buffer ACK para eliminar los glóbulos rojos. Se incubó con agitación a intervalos cortos, durante 15 minutos. Se agregó 1 mL de PBS, para lavar nuevamente a 300 xg durante 10 min; se resuspendió el pellet en 2 mL de PBS y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Luego, cada pellet de células resuspendido en medio de cultivo se colocó en una placa de cultivo de 60 mm de diámetro y se incubó en estufa gaseada (5% de CO₂ en aire, 37 °C) toda la noche, para lograr el pegado diferencial de los fibroblastos. Paralelamente, durante toda la noche, se incubó una placa de 48 pocillos con 400 μ L de solución colágeno de cola de rata (gentilmente donado por el laboratorio de la Dra Dalhia Abramovich, IBYME).
3. Al día siguiente, se lavaron los pocillos conteniendo colágeno con 1 mL de PBS. Se recuperaron las células epiteliales provenientes de la placa de pegado diferencial y se sembraron en 800 μ L de medio oviductal. Se incubaron en estufa gaseada a 37 °C y 5 % CO₂ durante 3 días. Finalmente, se descartó el medio y los pocillos con células adheridas se lavaron 2 veces con 500 μ L de PBS. Luego del segundo lavado, se agregaron 800 μ L de medio

fresco y se controló el crecimiento diariamente por observación al microscopio invertido, hasta llegar a confluencia.

Inmunofluorescencia de células epiteliales del istmo de la TF.

Para realizar la inmunofluorescencia de las células, primero las lavó 3 veces con 500 μ L de PBS y, luego, se las fijó durante 20 minutos a TA con paraformaldehído al 4 % en PBS. Después, se repitió el lavador por 2 veces con PBS, de 3 minutos cada vez. Para permeabilizar las células se utilizó Tritón X-100 al 0,2 % en PBS durante 15 minutos a TA y, nuevamente, se lavó 2 veces con PBS por 3 minutos. Se delimitaron pocillos pequeños sobre la placa, con el fin de utilizar menor volumen de reactivos.

Se realizó el bloqueo con suero normal de cabra (SCAN) al 10 % en PBS durante 45 minutos en cámara húmeda y TA. Posteriormente, se retiró la solución y, sin lavado, se incubó con 10 μ L de solución de anticuerpo primario anti-citoqueratina (dilución 1:200) (detecta citoqueratina presente en células epiteliales; Dako mouse monoclonal (clon A1-A3) anti-human cytokeratin) y anti-vimentina (dilución 1:5000) (detecta vimentina presente en fibroblastos únicamente; Dako mouse monoclonal (clon V9) anti-human VMT) diluidos en la solución de bloqueo, durante 2 h a TA y en cámara húmeda. Paralelamente, se incubó el control negativo en la solución de bloqueo. Se lavó 3 veces con 20 μ L de PBS (3 minutos cada una). Luego, se incubó durante 1 h a TA en cámara húmeda con 10 μ L de la solución que contiene anticuerpo secundario anti-mouse IgG-FITC (Sigma, N° Cat: F2057, producido en cabra) diluido 1:200 en la solución de bloqueo. Se volvió a lavar 3 veces (3 minutos por vez) con PBS. Posteriormente, se incubó con Ioduro de Propidio para marcar los núcleos. Se lavó con PBS 2 veces más, se secó a TA y se montó con 5 μ L de Vectashield, sellando el borde de los cubreobjetos con esmalte para preservar el preparado. Se conservó la placa a -20 °C hasta su observación en el microscopio invertido de fluorescencia.

Cocultivo de células epiteliales del istmo de la TF con espermatozoides humanos.

Para el cocultivo de células oviductales y espermatozoides, en la muestra de semen se determinaron volumen, concentración, motilidad y viabilidad espermática, lavando el semen en medio HTF a 1400 rpm durante 10 minutos. Para recuperar los espermatozoides altamente móviles, se realizó la técnica de "Swim-up" en medio oviductal (D-MEM/F-12, Glutamina 2 mM, 10 % SFB, 1 % antibiótico PenStrep), durante 90 minutos a 37 °C en atmósfera de 5 % CO₂. Se recuperaron los espermatozoides del sobrenadante y se lavaron a 1400 rpm durante 10 minutos. Al pellet resultante

se lo resuspendió en 1 mL de medio oviductal suplementado con piruvato de sodio 0,1 mM (GIBCO), aminoácidos no esenciales 100 x (GIBCO) y glutamina 2 mM.

En paralelo, se retiró el medio del cultivo primario (95% de confluencia), se lavaron las células con PBS a 37 °C durante 5 minutos, se incubó durante 3 h en estufa a 37 °C y bajo atmósfera de 5 % CO₂ en aire, con el pretratamiento correspondiente y, luego, se agregaron los espermatozoides (pretratados o no con heparina 46 µM durante 30 minutos o con Heparinasa III de *Flavobacterium heparinum* por 3 horas (0,04 mUI/mL) (Sigma Aldrich, N° Cat: H8891) resuspendidos en medio oviductal suplementado (entre 8-10 x 10⁶ espermatozoides/mL para cada pocillo), prosiguiendo el cultivo durante 2 h en estufa a 37°C y bajo atmósfera de 5% CO₂ en aire. Luego de las 2 h de cocultivo, se hicieron 5 lavados consecutivos y exhaustivos con PBS y se fijó con glutaraldehído al 2,5 % durante 20 minutos. Para analizar los resultados, se tomaron fotografías de 20 campos, a un aumento de 400X, contando solamente los espermatozoides unidos a las células en confluencia.

Se llevaron a cabo las siguientes condiciones experimentales para analizar la interacción mediada por receptores de HS y por el HS propiamente dicho:

- a) Control: células oviductales y espermatozoides, ambos sin tratar.
- b) Células pretratadas con heparinasa III y espermatozoides sin tratar.
- c) Células y espermatozoides pretratados ambos con heparinasa III.
- d) Células pretratadas con heparinasa III y espermatozoides pretratados con heparina.
- e) Células pretratadas con heparina y espermatozoides sin tratar.
- f) Células y espermatozoides pretratados ambos con heparina.
- g) Células pretratadas con heparina y espermatozoides pretratados con heparinasa III.
- h) Células sin tratar y espermatozoides pretratados con heparina.
- i) Células sin tratar y espermatozoides pretratados con heparinasa III.

Evaluación de la interacción mediada por HS/receptor para HS en el modelo murino de ratón.

Por cuestiones éticas relacionadas con el trabajo con gametos humanos, para poder evaluar los procesos de interacción de gametos (fusión, interacción con células del *cumulus* y penetración), se recurrió al modelo murino (ratón).

Al cambiar de modelo, primero debió corroborarse que el espermatozoide murino también poseyera HS en su membrana. Para ello, utilizamos ratones modificados genéticamente que expresan acrosina-GFP de manera constitutiva, con lo cual se puede observar el acrosoma teñido de verde. De esa forma, podemos observar el estado de reacción acrosomal, al mismo tiempo que se estudia la localización de la marca de HS.

Se analizó la presencia de HS en espermatozoides murinos (ratón) obtenidos del *cauda* epididimario por la técnica de “Swim-out” (SO) en Medio A + B (ver Anexo) (Figura 34). Se los incubó durante 90 min en condiciones capacitantes (ICC) y se les indujo la reacción acrosomal con progesterona 15 μ M (RAI).

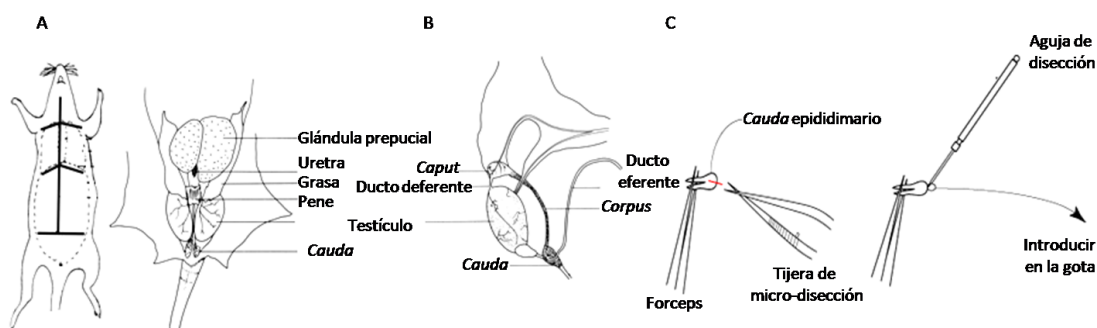


Figura 34. Esquema de la técnica de recuperación de espermatozoides a partir de cauda epididimario. A: a ratones macho se les realizó una incisión transversal en el abdomen. B: usando pinzas se tiró suavemente de una de las almohadillas de grasa testicular; los testículos asociados, conductos deferentes y epidídimo salieron con la misma. Sujetando una parte del conducto deferente fue posible cortar el *cauda* epididimario. C: finalmente, sosteniendo el tejido con una pinza, se realizaron dos o tres cortes pequeños en el mismo y se introdujo en una gota de medio A+B para producir el “Swim out”. Tomado de la Tesis Doctoral de Melisa Sánchez, con autorización de la autora.

Luego del “Swim-out” en medio A+B (espermatozoides SO), se incubó a los espermatozoides en medio A+B con 3 mg de BSA/mL durante 90 min en estufa a 37 °C, con atmósfera de 5 % CO₂ en aire. Una alícuota se fijó para realizar inmunocitoquímica de espermatozoides ICC. A otra alícuota de estos espermatozoides se la utilizó para inducir la reacción acrosomal con progesterona 15 μ M (Sigma Aldrich; N° Cat: P0130) durante 30 min a 37°C.

Para hacer ICQ de cada condición, una alícuota de espermatozoides SO, ICC y RAI se fijó en aire sobre portaobjetos de la siguiente manera: cada alícuota fue centrifugada a 2000 xg durante 3 minutos. El pellet obtenido fue resuspendido en 1 mL de PBS y lavado a 8000 xg durante 2 minutos. Posteriormente, se fijaron las muestras en presencia de 20 μ L de PFA al 4 % durante 15 minutos sobre portaobjetos tratados con poli-L-lisina al 0,01 %. Se hicieron 3 lavados de 5 min cada uno con

40 μ L de PBS-Tween 0,1 % (PBS-T), se agregaron 20 μ L de solución de bloqueo (BSA 3 % en PBS-T) durante 1 h a TA en cámara húmeda, para evitar que se deshidrate la gota. Pasado el tiempo de bloqueo, se retiró la gota y se agregaron 10 μ L de anticuerpo primario monoclonal anti-HS (dilución 1:20 en solución de bloqueo), durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda y oscuridad. Al día siguiente, se lavó durante 5 minutos con 40 μ L de PBS-T 0,1% y se incubó con 20 μ L de anticuerpo secundario anti-IgM acoplado a Rodamina (dilución 1:75 en PBS-T) durante 2 h en oscuridad y cámara húmeda. Nuevamente, se realizaron 3 lavados con PBS-T 0,1% (5 minutos cada vez) y se procedió a montar con Vectashield (3 μ L por pocillo). Luego, se colocó un cubreobjetos que se selló con esmalte para la posterior observación en el microscopio. Al día siguiente, se observaron las muestras en microscopio Olympus-DSU, se tomaron las fotografías correspondientes en aumento 600x y se contabilizó la marca para HS y el porcentaje de reacción acrosomal.

Descondensación de espermatozoides humanos in vitro en presencia de oocitos frescos de ratón (micrométodo).

La técnica de micrométodo fue descrita en nuestro laboratorio (Romanato et al., 2008). Brevemente, ratones hembra F1 (c57xBalBc) de 8 semanas de edad fueron superovuladas inyectando, primero 7,5 UI de PMSG y, luego de 48 h, 7,5 UI de hCG. Entre 16-17 horas post-hCG los animales se sacrificaron por dislocación cervical, se recuperaron los complejos *cumulus*-oocito (COC) de cada oviducto, pinchando con aguja de jeringa tipo tuberculina en la región de la *ampulla* (Figura 7), y se colocaron en 100 μ L de medio A+B para lavar. Cada COC fue, luego, colocado en una gota de 90 μ L de medio A+B conteniendo 0,1 % de hialuronidasa para eliminar las células del *cumulus*. Posteriormente, cada oocito fue tratado con medio Tyrodes ácido (pH= 3) para eliminar la zona pelúcida (ZP) (Figura 35). Se utilizaron extractos oocitarios de 36 oocitos murinos por condición.

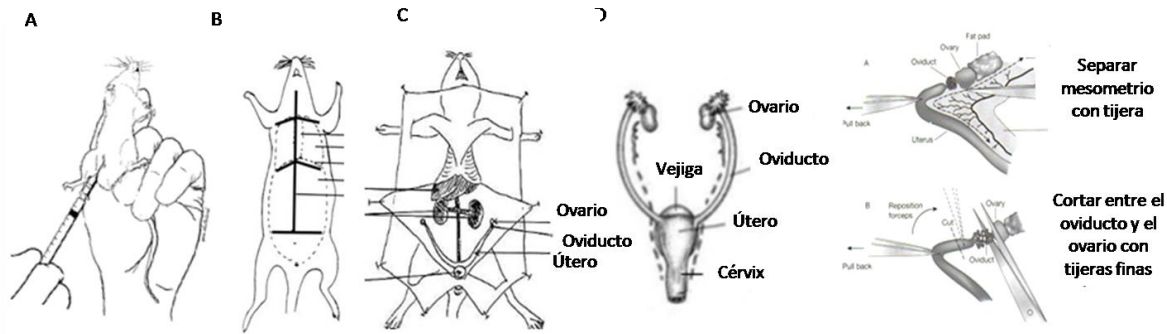


Figura 35. Esquema de la técnica de obtención de oocitos de ratón. **A:** Estimulación hormonal por vía intraperitoneal y sacrificio. **B:** para realizar la disección del animal, se realizó un corte longitudinal por el vientre y se expusieron los ovarios (**C**). **D:** entre el extremo de cada ovario y el útero se encuentra el oviducto con forma de ampolla pequeña. Se retiró la grasa que rodea el oviducto y se cortó para poder separarlo del ovario. Cada oviducto se colocó en una gota de medio A+B, se pinchó y se extrajeron de esta manera los complejos *cumulus*-oocito. Tomado de la Tesis Doctoral de Melisa Sánchez, con autorización de la autora.

Se analizó la función del HS tanto espermático como oocitario a través de la técnica del micrométodo. En Romanato y col. (2008) se demostró que la descondensación *in vitro* en estas condiciones disminuye significativamente cuando se lleva a cabo en la presencia de heparinasa III (enzima que corta HS). Para discernir si el HS espermático interviene en este proceso junto con el HS oocitario, los espermatozoides humanos fueron pretratados con heparinasa III, lavados y luego incubados junto con los oocitos murinos. Las condiciones fueron las siguientes (entre porta y cubre objetos) (Figura 36):

- 1- Extractos oocitarios de 36 oocitos murinos + espermatozoides control (20 x 10⁶espermatozoides/mL) + GSH (90 mg/mL)
- 2- Extractos oocitarios de 36 oocitos murinos + espermatozoides preincubados con HASA III (0,04 mUI/μL) + GSH
- 3- Extractos oocitarios de 36 oocitos murinos + espermatozoides control + HASA III (0,04 mUI/μL) **SIMULTÁNEAMENTE** + GSH
- 4- Espermatozoides control en HTF26B + Hep 46 μM + GSH (90 mg/mL)
- 5- Espermatozoides preincubados con HASA III (0,04 mUI/mL) + Hep 46 μM + GSH

Concentración de HASA III: 10 mU/mL en 1μL de mezcla descondensante final (3 μL finales). Tiempo de incubación con la enzima: 3 horas.

Tubo	1	2	3
Heparina 46 μM (μL)	10	10	-
GSH 10mM (μL)	10	-	10
HTF26B (μL)	180	190	190
Espermatozoides (μL)	100	100	100
Volumen total (μL)	300	300	300

Tabla 2. Protocolo del ensayo de descondensación aplicado en cada experimento, estandarizado en el laboratorio por Romanato y col. (2003).

Utilizando el criterio descrito previamente (Bedford et al., 1973; Galotto et al., 2019; Romanato et al., 2003, 2005) se determinó el porcentaje de descondensación total máximo alcanzado en cada condición. La capacidad descondensante de la muestra se determina por sus diferentes estadios de descondensación (Figura 37). Estos son:

U (unchanged): sin cambios, la cabeza del espermatozoide permanece refringente y mantiene su forma y tamaño intactos.

M (moderately decondensed): moderadamente descondensado, la cabeza del espermatozoide comienza a aumentar de tamaño, pierde su refringencia y tiene aspecto apenas más granular.

G (grossly decondensed): groseramente descondensado, la cabeza del espermatozoide posee un tamaño muy aumentado, un aspecto granular característico y es muy difícil de observar.

El porcentaje de espermatozoides descondensados se calculó como la suma de las formas M y formas G **%(M+G)**. Todas las condiciones se contaron por duplicado y se evaluaron al menos 200 espermatozoides en cada condición.

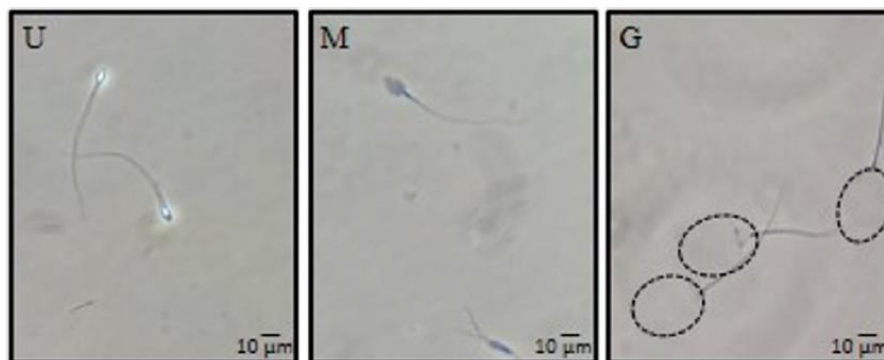


Figura 37. Fotografía en contraste de fase (400x) donde se observan los diferentes estadios de descondensación espermática S, M y G. Tomado de (Galotto et al., 2019).

Se comparó el porcentaje de descondensación máximo obtenido a los 60 minutos $\%(M+G)$, con los resultados de TUNEL de cada paciente que recibió tratamiento de ICSI. También, se comparó la capacidad descondensante de cada paciente con la calidad embrionaria alcanzada al día 3 de tratamiento.

El porcentaje de espermatozoides descondensados se calculó como la suma porcentual de las formas M y formas G: $\%(M+G)$. Además, se analizó la cinética de descondensación de esos donantes determinando el porcentaje de descondensación a los 15, 30 y 60 minutos de incubación. Por último, se estableció la velocidad de descondensación como el cociente entre el $\%(M+G)$ a los 60 minutos (D60) y a los 30 minutos (D30) (Gaubeca-Klix et al., 1998).

Este ensayo se utilizó para evaluar la velocidad de descondensación en espermatozoides obtenidos de muestras de semen provenientes de pacientes infértiles ($n=129$), que realizaban un procedimiento de fecundación asistida (FA). Sobre dos alícuotas de la misma muestra utilizada para realizar el procedimiento de ICSI, se evaluaron dos parámetros relacionados con la funcionalidad del núcleo espermático: fragmentación del DNA (por medio de TUNEL) y velocidad de descondensación (por medio del ensayo de descondensación *in vitro*) (Figura 38).

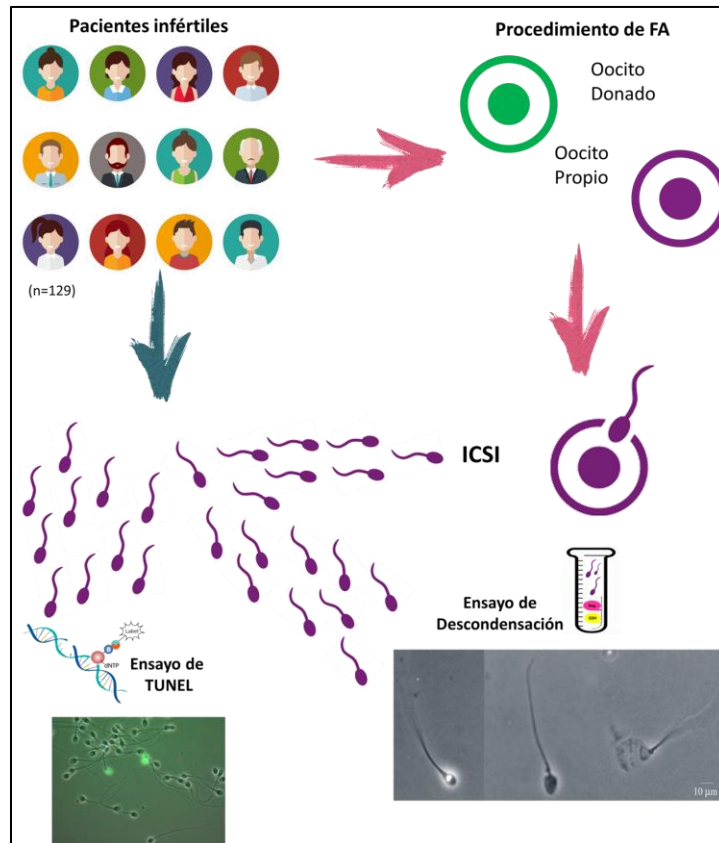


Figura 38. Diagrama de experimento de descondensación y TUNEL. A una alícuota de muestras de semen de pacientes infértiles que realizaron un procedimiento de fecundación asistida con oocitos donados o propios, se le practicó el ensayo de fragmentación del DNA (TUNEL), el ensayo de descondensación *in vitro* (en presencia de Heparina y Glutación) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI).

Ensayo de TUNEL.

El ensayo de TUNEL (Figura 39) es un método de cuantificación directa de la fragmentación en el DNA que consiste en la incorporación de dUTP fluorescente en las rupturas simple y doble cadena de este, mediante una reacción catalizada por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Estas rupturas a las que se les incorpora el dUTP marcado son, luego, cuantificadas con la ayuda de un microscopio de fluorescencia o un citómetro de flujo. Los espermatozoides se clasifican como positivos (espermatozoides con marca intensa fluorescente) o negativos (ausencia de marca fluorescente) y el resultado se expresa como porcentaje de espermatozoides positivos en la población total (Schulte et al., 2010).

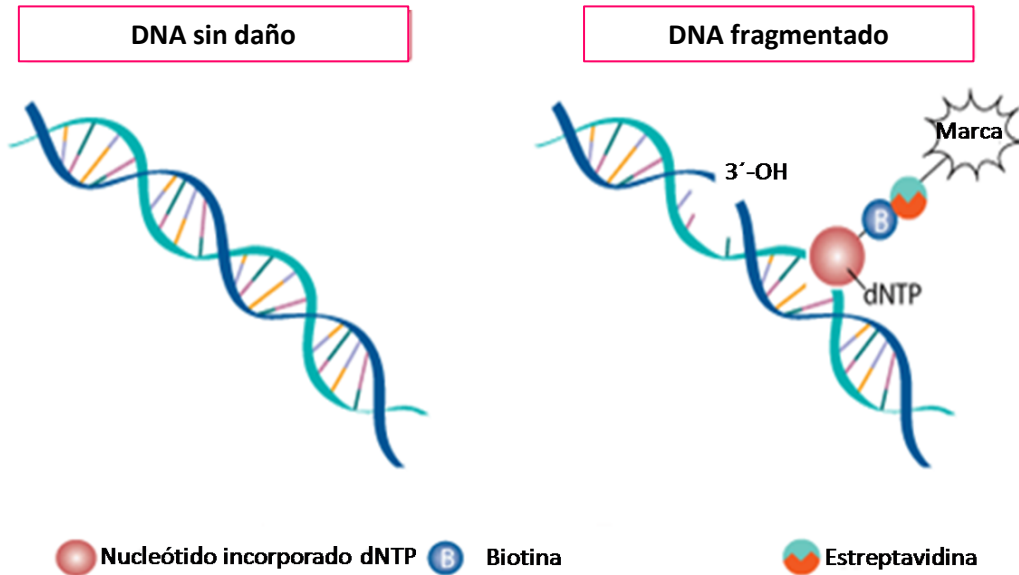


Figura 39. Ensayo de TUNEL. Esquema en el que se explica el fundamento de la técnica. El DNA fragmentado en simple o doble cadena se marca con un nucleótido acoplado a biotina-estreptavidina mediante la acción de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT).

Al día siguiente a la inseminación artificial, una alícuota de 10 μL de espermatozoides de la misma muestra utilizada para ICSI fue sembrada en un portaobjetos, recubierto con poli-L-lisina, para el análisis de fragmentación del DNA por TdT (“terminal deoxynucleotidyl transferase”) mediante “dUDP nick end labeling” (TUNEL). Todas las evaluaciones de TUNEL fueron realizadas en el Laboratorio de Andrología del Hospital Italiano de Buenos Aires (HIBA), utilizando el kit de detección de muerte celular *in situ* con fluoresceína (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras se fijaron con PFA al 1 % (Cicarelli, Laboratorios San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) durante 10 min a TA. Luego se las lavó con PBS y se permeabilizó a los espermatozoides con solución de Tritón X-100 0,1 % en 0,1 % de citrato de sodio (Calbiochem) durante 10 min a TA. Después, los portaobjetos fueron incubados durante 1 h a 37 °C en la mezcla de reacción de TUNEL y solución TdT y, luego, se lavaron dos veces con PBS por 5 min. El daño al DNA fue cuantificado bajo microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400). Se evaluaron 5000 células por muestra. El valor de corte para TUNEL positivo fue de > 20 %, como es utilizado y está estandarizado de rutina para el Laboratorio de Andrología de HIBA.

Procesamiento de muestras de semen para ICSI

Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación luego de 36-48 h de abstinencia y se esperó a la licuefacción, aproximadamente 1 h después de la obtención. Los espermatozoides móviles fueron separados utilizando un gradiente de densidad dual (ISolate® Irvine Scientific, Cat N°: 99264). El pellet resultante fue lavado por centrifugación con 3 mL de HTF con gentamicina-HEPES (Irvine Scientific, Cat N° 90126), que contenía 5 % de albúmina sérica humana (Irvine Scientific, Cat N° 9988).

Donación oocitaria

Los oocitos en metafase II fueron obtenidos bajo consentimiento informado de mujeres donantes sanas de menos de 30 años, inscriptas en el programa de donación de oocitos de PROCREARTE. Al igual que a los pacientes que realizan técnicas de reproducción asistida (TRA), las donantes fueron controladas para sífilis, hepatitis B y C, HIV tipo 1 y 2 y HTLV tipo 1 y 2.

Procedimiento de ICSI.

Las mujeres bajo TRA fueron estimuladas hormonalmente con 22 IU/día de hormona folículo estimulante (FSH) recombinante (rFSH) durante 3 días. Al día 4, se les administró 2 a 4 ampollas de HMG (Gonadotropina Menopáusica Humana) conteniendo 75 IU de FSH y 75 IU de hormona luteinizante (LH). El desarrollo folicular fue monitoreado por ecografía vaginal utilizando una sonda transvaginal 5- MHz. Cuando al menos dos folículos medían más o igual a 14 mm de diámetro medio, las pacientes recibieron una ampolla de antagonista de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Cetrorelix) por día. Cuando al menos dos folículos midieron más o igual a 18 mm de diámetro medio, se les administraron 250 µg de gonadotropina coriónica humana recombinante (hCGr) (Ovidrel, Serono, inyección subcutánea) o 10000 IU hCG (Gonacor, Ferring, inyección intramuscular). La aspiración transvaginal de los folículos se realizó entre 34-36 h después de la inyección de hCG y los oocitos fueron recuperados en el laboratorio de embriología. Poco después de la recuperación de oocitos (entre 3 a 5 h), las células del *cumulus* y la corona radiata fueron removidas por transferencia de los oocitos a un medio HTF-HEPES conteniendo de 1 mg de hialuronidasa/mL por al menos 1 minuto; luego, se pipetearon los oocitos con pipetas de diámetros decrecientes. Los oocitos que hubieron eliminado el primer corpúsculo polar (estadio MII) y los estadios MI fueron microinyectados con un único espermatozoide introducido a través de la zona pelúcida dentro del ooplasma.

La fecundación, como presencia de pronúcleos, fue observada entre 16-18 h luego de la microinyección y el estado del embrión clivado, 24 h después.

“Score” (puntaje) de calidad embrionaria.

Para poder comparar la calidad embrionaria al día 3 (C.E) de cada paciente luego de realizar ICSI, se define un parámetro de calidad embrionaria llamado SCORE EMBRIONARIO (ES). En la clínica se coloca un puntaje a cada embrión obtenido según su calidad, que va de 1 (peor calidad) a 4 (mejor calidad). El SCORE se calcula como el promedio pesado del número de embriones obtenidos, pertenecientes a cada una de estas categorías de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{4 \times N^{\circ} \text{embriones C.E. 4} + 3 \times N^{\circ} \text{embriones C.E. 3} + 2 \times N^{\circ} \text{embriones C.E. 2} + 1 \times N^{\circ} \text{embriones C.E. 1}}{\text{Total embriones generados}}$$

Análisis estadístico.

Las inmunocitoquímicas (tanto de espermatozoides humanos como de ratón) fueron analizadas utilizando ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis según correspondiera. Se realizaron los post-test correspondientes en cada uno de los experimentos para comparaciones múltiples (Bonferroni o Dunn's test). Las tablas de contingencia se analizaron utilizando el test de Friedman, y Dunn's como post-test.

Los resultados de los cocultivos, tanto con células ECC-1 o células provenientes del istmo de las trompas de Falopio con espermatozoides humanos, fueron analizados con Kruskal-Wallis y Dunn's test para comparaciones múltiples.

El micrométodo se analizó mediante ANOVA de una vía y test de Tukey.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en la clínica se realizó para la población total de pacientes y para los pacientes divididos en dos grupos, según hubiesen utilizado oocitos propios o donados para realizar el procedimiento de fecundación asistida. Las poblaciones se caracterizaron por la media \pm EEM (error estándar de la media) (distribución Gaussiana) o por la mediana y el rango intercuartilo (distribución no Gaussiana), según se requiriera. Las comparaciones entre ambos grupos fueron realizadas por análisis de Student no pareado o el test de Mann-Whitney, según fuera necesario. Las comparaciones múltiples fueron realizadas por ANOVA seguido de test de Tukey para comparaciones múltiples. Las correlaciones entre los parámetros espermáticos (fragmentación de DNA y parámetros de descondensación) y los resultados de la TRA (% fecundación, % clivaje, y score de calidad embrionaria) fueron comparados mediante la correlación de Pearson o Spearman, según correspondiese. Las tablas de contingencia fueron analizadas por el test exacto de Fisher.

En todos los casos, las diferencias fueron consideradas significativas con un valor de $p < 0.05$.

Resultados

El **objetivo general 1** propone estudiar la presencia de HS en espermatozoides humanos, en distintas etapas por las que atraviesa desde su formación hasta el encuentro con el oocito para finalizar con la fecundación.

Como trabajos anteriores del laboratorio posicionaban al heparán sulfato como la molécula responsable del proceso de descondensación, en cuanto a competencia por carga con el DNA y las protaminas y, teniendo en cuenta resultados preliminares que indicaban la presencia de HS sobre el espermatozoide, se profundizó en el estudio de la localización de este GAG en el espermatozoide.

Debido a que el espermatozoide sufre cambios importantes en sus diferentes membranas (plasmática y acrosomal), fue necesario conseguir las condiciones adecuadas como para poder dilucidar variaciones en su ubicación en situación de capacitación y exocitosis acrosomal.

Para esto se contó con un anticuerpo dirigido contra la porción glicosídica de HS que, en principio, permitiría su detección tanto en forma libre como integrando un proteoglicano.

Inmunocitoquímica de espermatozoides humanos.

Después de muchos intentos, se consiguió estandarizar las condiciones para la inmunocitoquímica de espermatozoides SU, ICC y RAI (Figura 32), poniendo a punto la doble marcación de HS y *Pisum sativum* y, de este modo, poder evaluar, simultáneamente, el estado de reacción acrosomal de los espermatozoides y la ubicación celular del HS (Figura 40).

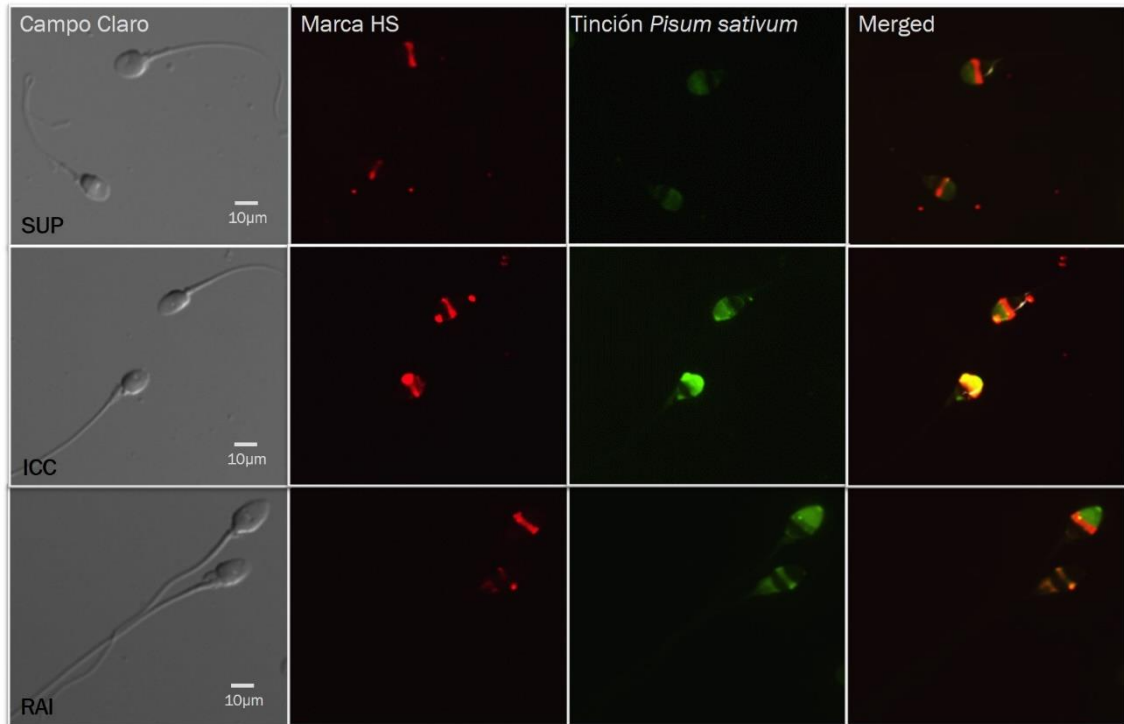


Figura 40. *Inmunocitoquímica de HS en espermatozoides humanos luego del “Swim-up” (SU), incubados en condiciones capacitantes (ICC) e inducidos para provocar la reacción acrosomal (IAR).* Los diferentes paneles muestran: campo claro (panel izquierdo), inmunofluorescencia HS (rojo), marcación *Pisum sativum* (verde), marcas superpuestas (panel derecho).

La observación de las imágenes demostró que la localización del HS en el espermatozoide no era tan simple como presencia o desaparición, sino que además existía una distribución diferencial en diversas regiones del espermatozoide. Se evaluó y contabilizó la marcación de HS en las diferentes regiones, encontrando variados patrones de distribución que se representan en la siguiente figura 41:

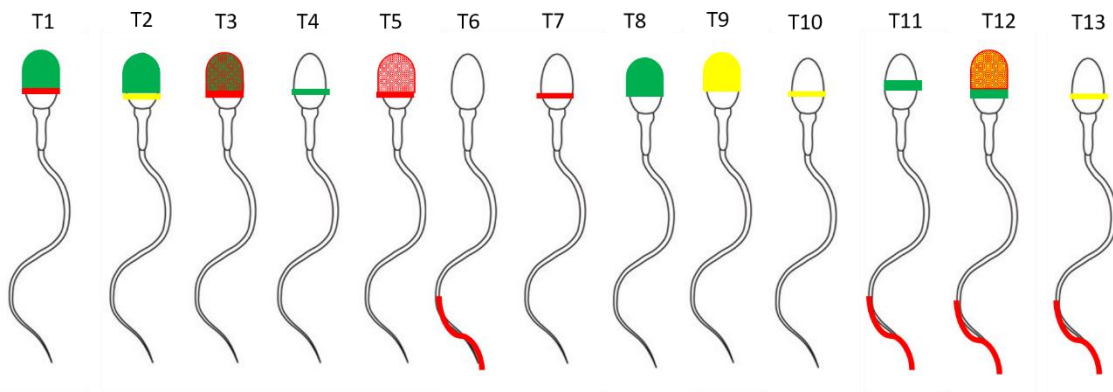


Figura 41. *Distribución de la marca de HS.* Se puede observar en rojo dónde se encontró la marca para HS en espermatozoides humanos, en verde la tinción de *Pisum sativum*, en amarillo la superposición entre ambas marcas.

No todos estos patrones estuvieron igualmente representados en cada imagen de inmunocitoquímica evaluada. En general, los patrones predominantes para HS fueron T1, T2, T3,

T5, T7 y T10, es decir, espermatozoides con marca de HS en la cabeza. Por otra parte, se puede ver claramente en la figura que los patrones T4 y T8 no presentaron marca de HS. Sí se observó un pequeño porcentaje de marcación en la porción final de la cola (40/2578 espermatozoides evaluados =1,55%), pero debido a su insignificancia se desestimó en el conteo total (Figura 42).

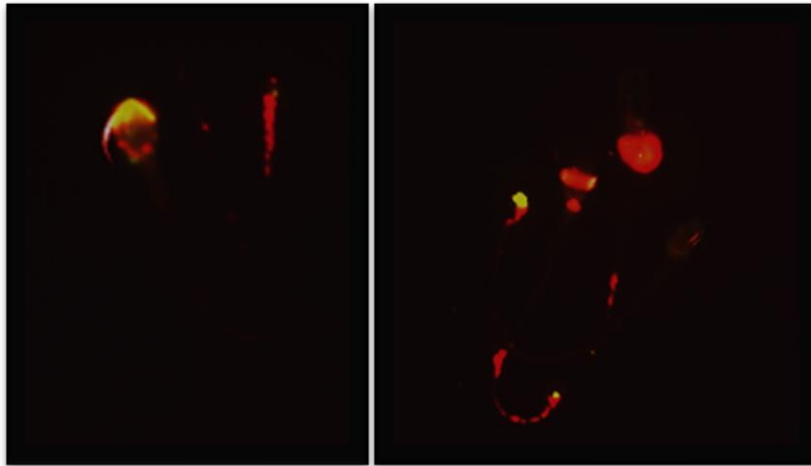


Figura 42. Marca de HS en la cola de espermatozoides RAI. Se puede observar en rojo la marca de HS en espermatozoides humanos y en amarillo la superposición con la tinción de *Pisum sativum*.

Debido a la variabilidad observada y al reducido número de espermatozoides que resultaría en cada grupo de una consideración tan detallada, para simplificar el análisis de los resultados los patrones anteriores se reagruparon de la siguiente manera: marcación en el acrosoma (T3+T5+T9+T12), marcación en el segmento ecuatorial (T1+T2+T7+T10+T13) y espermatozoides sin marca de HS (T4+T8). El esquema también muestra los diferentes patrones de marcación con *Pisum sativum*, que pone de manifiesto el estado de exocitosis acrosomal del espermatozoide.

Heparán sulfato en diferentes estadios de la vida post- eyaculatoria del espermatozoide humano.

El análisis de los resultados indicó que el porcentaje total de espermatozoides con marca de HS (en todas las ubicaciones) mostró una tendencia a disminuir progresivamente entre espermatozoides de SUP, ICC y RAI, siendo esta diferencia significativa en los RAI (Figura 43).

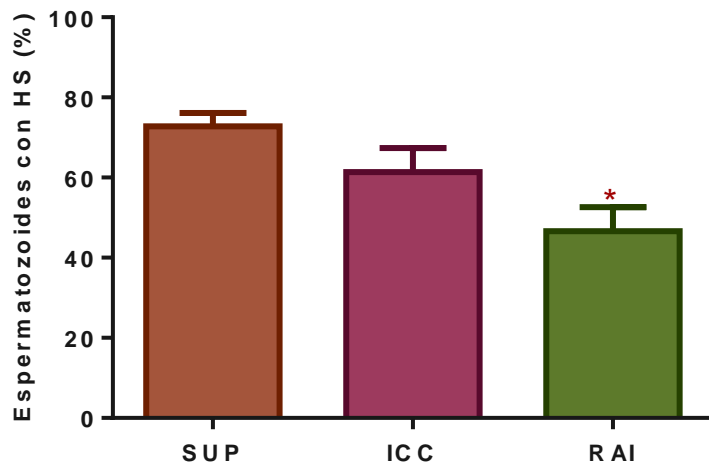


Figura 43. HS en espermatozoides humanos. Cuantificación de la cantidad de espermatozoides con HS para cada una de las condiciones analizadas: espermatozoides SU, ICC y RAI. * $p = 0,041$ SUP vs RAI, ANOVA, Bonferroni (n=5).

Quando se analizaron en forma más detallada los patrones de marcación para cada una de las situaciones fisiológicas mencionadas, se obtuvo el resultado que muestra la Figura 44, donde se observa un patrón de marcación cuya distribución es diferente en cada condición (Chi cuadrado, **** $p > 0,0001$, $n = 6921$). Se utilizó Chi cuadrado para analizar la distribución de la marca en la población total de espermatozoides y nos dio diferencias significativas.

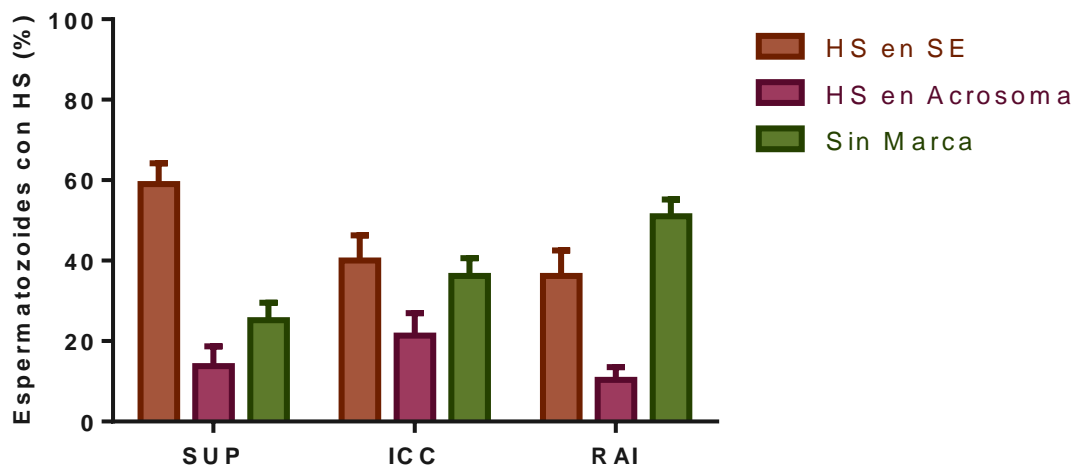


Figura 44. Distribución de HS en espermatozoides humanos. Cuantificación de la cantidad de espermatozoides con HS para cada una de las condiciones analizadas: espermatozoides SU, ICC y RAI, según la ubicación donde se encontraba SE (segmento ecuatorial) o acrosoma. La barra verde corresponde a los espermatozoides que no presentaron marca de HS. (n=5).

Dado que la interacción entre el espermatozoide y el oocito que lleva a la fusión de membranas y posterior penetración se establece a nivel del segmento ecuatorial, resultó de especial interés el análisis de la marca en esta porción del espermatozoide.

Al tomar únicamente en consideración los espermatozoides con marca de HS, pudo observarse una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides con HS en el segmento ecuatorial de SUP a ICC y RAI. También, se observó un leve aumento en el porcentaje de HS en el acrosoma de los espermatozoides ICC respecto a SUP y RAI, aunque el mismo no resultó estadísticamente significativo. Podría concluirse que en los ICC se produce un aumento relativo de marca en el acrosoma que luego desaparece en RAI (Figura 45).

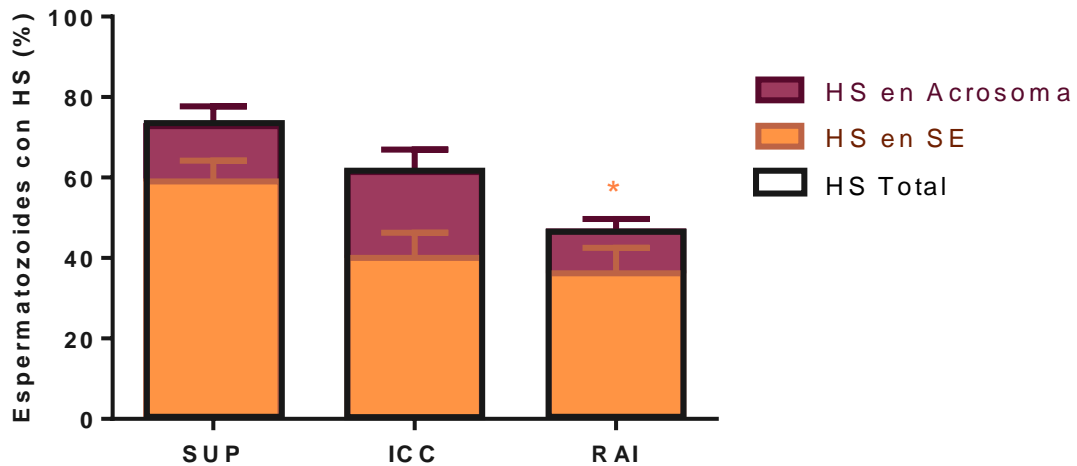


Figura 45. Cuantificación de la inmunocitoquímica de HS en espermatozoides humanos. Porcentaje de marca de HS en el acrosoma (borgoña) o el segmento ecuatorial (SE, naranja) en espermatozoides (SUP), (ICC) o (IAR). Contorno negro en la barra: porcentaje total de espermatozoides con marca de HS. HS en SE: *p= 0,0474 versus SUP; n=5. ANOVA de 1 vía, test de Tukey para comparaciones múltiples.

En los análisis precedentes, se consideró la totalidad de los espermatozoides sin tener en cuenta el estado de su acrosoma. Al distinguir entre espermatozoides que sufrieron o no la excitosis acrosomal, se obtuvo el patrón de distribución de marca que se muestra en las Figuras 46 y 47 (el estado del acrosoma se determinó según tinción con *Pisum sativum*), en los tres estados fisiológicos.

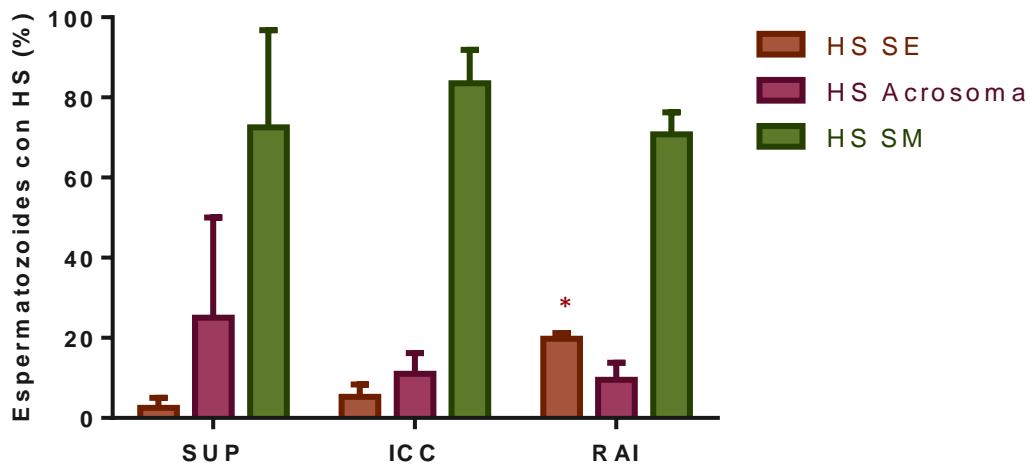


Figura 46. Distribución de HS en espermatozoides humanos reaccionados. Cuantificación de la cantidad de espermatozoides con HS para cada una de las condiciones analizadas, según su ubicación (SE, segmento ecuatorial; SM, sin marca): espermatozoides reaccionados de las fracciones de SUP, ICC y RAI. Las barras verdes corresponden a los espermatozoides que no presentaron marca de HS. SUP vs RAI en SE * $p=0,0401$ (Friedman, Dunn's test).

Se utilizó Chi cuadrado para analizar la distribución de la marca de HS en la población de espermatozoides y nos dio diferencias significativas (Chi cuadrado, **** $p<0,0001$), tanto para espermatozoides reaccionados como no reaccionados.

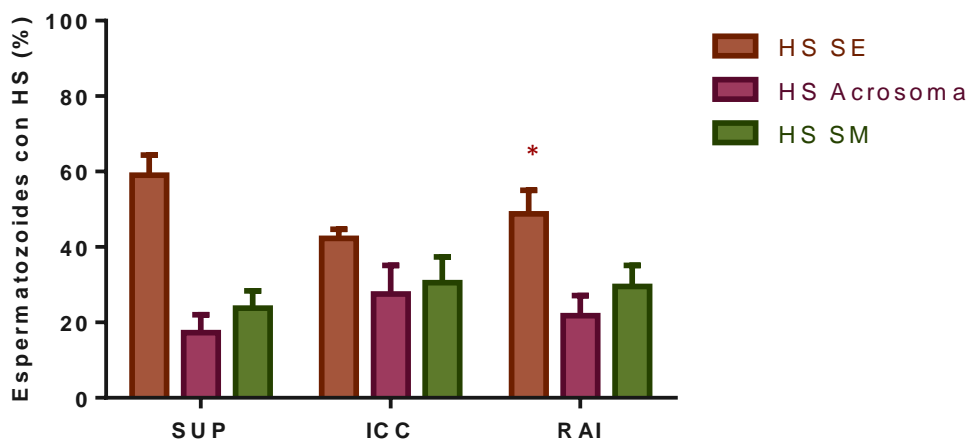


Figura 47. Distribución de HS en espermatozoides humanos no reaccionados. Cuantificación de la cantidad de espermatozoides con HS, según su ubicación (SE, segmento ecuatorial; SM, sin marca), para cada una de las condiciones analizadas: espermatozoides no reaccionados de las fracciones de SUP, ICC y RAI. Las barras verdes corresponden a los espermatozoides que no presentaron marca de HS. (SUP vs RAI en SE * $p=0,0141$ Friedman, Dunn's test).

Si bien, tal como se señalara previamente, los espermatozoides con marca en la cola no se incluyeron en el análisis debido a su pequeño número (40/2578 espermatozoides evaluados =1,55%), fueron obviamente cuantificados al analizar las imágenes. La marca en el flagelo estuvo presente en 3/1124 espermatozoides reaccionados (por tinción de *Pisum sativum*) provenientes de SU; 6/676 espermatozoides ICC reaccionados y 3/150 espermatozoides ICC no reaccionados.

En la fracción de espermatozoides RAI se encontró HS en la cola en 21/313 espermatozoides reaccionados y en 7/315 espermatozoides no reaccionados. Esto, traducido a porcentaje, resultó en 0,27 % de espermatozoides SU reaccionados; 0,88 % de espermatozoides ICC reaccionados y 2% ICC no reaccionados; 6,7 % de espermatozoides RAI reaccionados y 2 % RAI no reaccionados.

Teniendo en cuenta que, a pesar de encontrarse en condiciones de excitosis acrosomal no todos los espermatozoides reaccionan o lo hacen al mismo tiempo y que, también en las otras condiciones puede haber excitosis acrosomal espontánea, resultó interesante analizar por separado la marcación según las células se encontraran en una u otra situación.

En las Figuras 48, 49 y 50 se puede ver el análisis individualizando para cada una de las poblaciones: SUP, ICC y RAI, cuál era la distribución de la marca de HS (SE, Acr o Sin Marca).

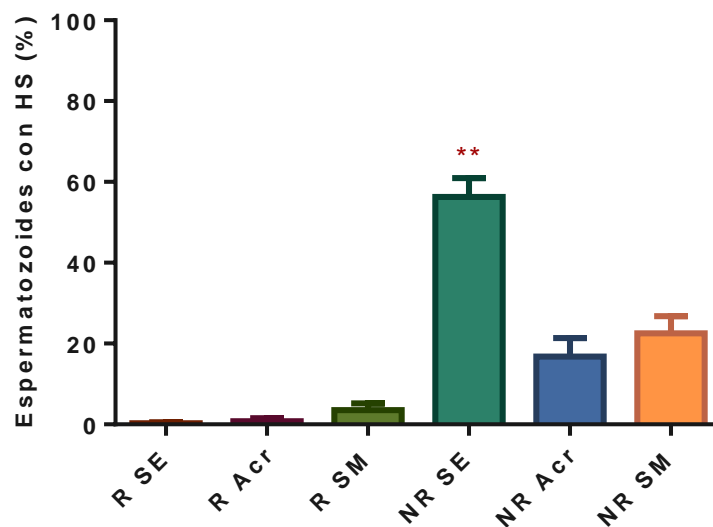


Figura 48. Distribución de la marca de HS en espermatozoides provenientes de SUP. Se puede observar el porcentaje de espermatozoides con marca para HS, en la población de espermatozoides SUP. R= reaccionado. NR= no reaccionado. SE= segmento ecuatorial. Acr= acrosoma. SM= sin marca. Kruskal- Wallis test ** p=0,0013; Dunn's test: ** entre R SE vs NR SE (p=0,0059); ** entre R Acr vs NR SE (p=0,0095).

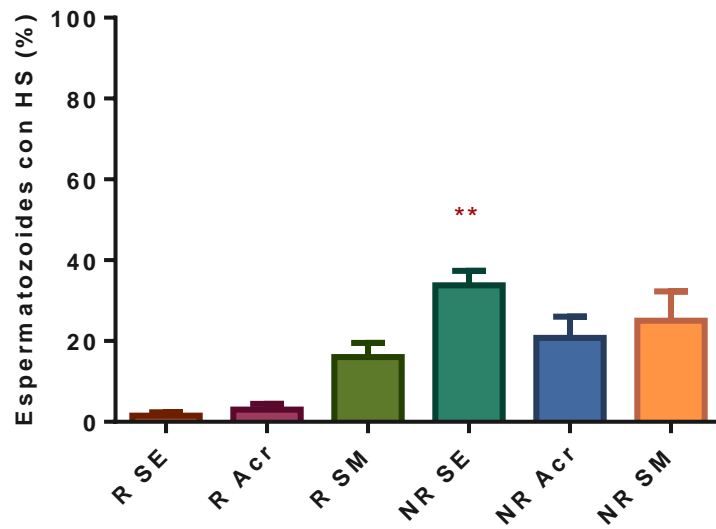


Figura 49. Distribución de la marca de HS en espermatozoides provenientes de ICC. Se puede observar el porcentaje de espermatozoides con marca para HS, en la población de espermatozoides ICC. R= reaccionado. NR= no reaccionado. SE= segmento ecuatorial. Acr= acrosoma. SM= sin marca. Kruskal- Wallis test ** $p=0,0028$; Dunn's test: ** entre R SE vs NR SE ($p=0,0082$); * entre R Acr vs NR SE ($p=0,0261$).

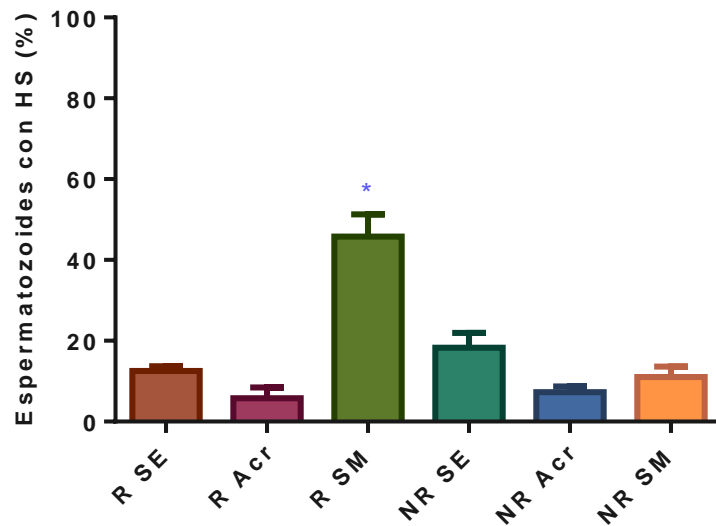


Figura 50. Distribución de la marca de HS en espermatozoides provenientes de RAI. Se puede observar el porcentaje de espermatozoides con marca para HS, en la población de espermatozoides RAI. R= reaccionado. NR= no reaccionado. SE= segmento ecuatorial. Acr= acrosoma. SM= sin marca. Kruskal- Wallis test ** $p=0,0062$; Dunn's test: * entre R Acr vs R SM ($p=0,0110$); * entre R SM vs NR Acr ($p=0,0222$).

El análisis de la distribución de la marca de HS en los distintos segmentos y en las variadas condiciones, reveló que, tanto en espermatozoides SUP como ICC, la distribución de la marca favorece una localización de HS en el segmento ecuatorial de espermatozoides no reaccionados y, que al reaccionar, esta marca quedaría distribuida entre el segmento ecuatorial y restos de la membrana acrosomal interna, sin que exista una diferencia significativa entre regiones del espermatozoide o entre estados acrosomales.

Intensidad de fluorescencia de HS de espermatozoides humanos SUP, ICC y RAI.

Debido a la dificultad que se presenta al momento de cuantificar la intensidad de la fluorescencia en una imagen de inmunocitoquímica, se utilizó también la técnica de citometría de flujo para cuantificarla como una herramienta más directa e independiente del observador, teniendo en cuenta que se trata de dos metodologías muy diferentes y que podrían por lo tanto arrojar resultados disímiles.

Se cuantificó la intensidad de fluorescencia en cada célula utilizando el programa Image J-FIJI en las inmunocitoquímicas, expresando la misma en unidades arbitrarias y utilizando el programa FlowJo en las citometrías de flujo, determinando la intensidad de fluorescencia relativa, luego de seleccionar la población de espermatozoides estudiada. Ninguna de las dos metodologías arrojó diferencia en la intensidad de la marca en espermatozoides SUP, ICC o RAI. En todas las condiciones, independientemente del lugar donde se encontró la marca para HS, la intensidad de fluorescencia fue la misma (Figura 51 y Figura 52).

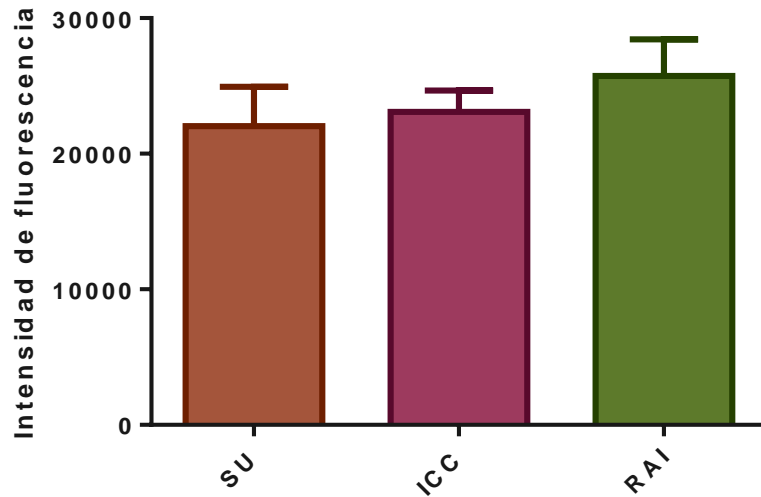


Figura 51. Intensidad de fluorescencia de inmunocitoquímica de HS en espermatozoides humanos. La intensidad fue cuantificada en unidades arbitrarias, a partir de fotografías tomadas con un microscopio Olympus DSU (600x), utilizando el programa ImageJ-FIJI (n=5, NS).

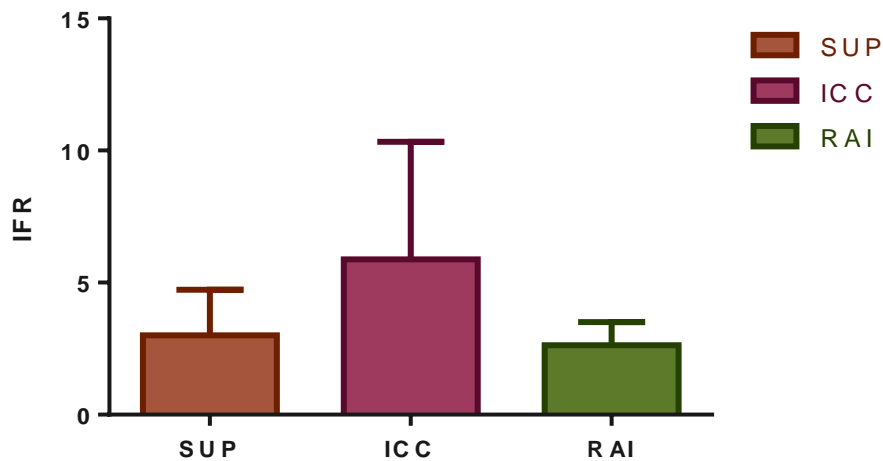


Figura 52. Intensidad de fluorescencia relativa de HS en espermatozoides humanos por citometría de flujo. Se midió la intensidad de fluorescencia relativa (IFR) de citometrías de flujo de espermatozoides humanos provenientes de SUP, ICC y RAI (n=8; NS).

Hasta aquí, los resultados parecen indicar que el HS está presente en la superficie del espermatozoide, fundamentalmente en el segmento ecuatorial y que, dependiendo del estado en que se encuentre el mismo: lavado, capacitado o reaccionado, parecería modificarse el número de espermatozoides que presentan HS en su superficie (especialmente en los que sufrieron RAI), pero no la cantidad de HS presente en cada célula.

Habiendo demostrado la presencia del glicosaminoglicano sulfatado heparán sulfato en el espermatozoide y evaluado su localización celular, en el **objetivo 2**, se estudió la posible participación de este en dos momentos fundamentales para su llegada al oocito: la interacción con el endometrio y con la trompa de Falopio.

Cocultivo de espermatozoides y células ECC-1.

En el recorrido de los espermatozoides hacia su encuentro con el oocito a nivel de la *ampulla* en la trompa de Falopio, interaccionan con el endometrio, pudiendo quedar asociados al mismo en las llamadas criptas uterinas; de este modo pueden ser reservados para futuras ondas de movilización o se puede reducir la cantidad que puede avanzar. Dado que todavía no se conocen las moléculas que intervienen en esta interacción célula-célula en el humano, resultó de interés analizar esta unión.

Ante la dificultad que presenta un cultivo primario de células endometriales humanas, para mantenerlas y obtener un número suficiente que permita detectar la interacción con los espermatozoides, se utilizó una línea celular establecida y con características similares a las uterinas. Estas células endometriales ECC-1, presentan características de epitelio luminal endometrial, responden hormonalmente y se ha descrito la presencia de HS y su receptor en la superficie de éstas (Mo et al., 2006).

Para poder discernir el papel del HS y/o de su receptor, tanto en el espermatozoide como en la célula endometrial, se diseñó un tratamiento para ambos tipos celulares que permitiese dilucidar la importancia de cada molécula en esta interacción, que fue descrito brevemente en Materiales y Métodos.

Se utilizó heparina soluble como análogo estructural y funcional del heparán sulfato para bloquear selectivamente los receptores en una u otra célula (espermatozoide o célula endometrial) y heparinasa III de *Flavobacterium heparinum*, que cliva el HS asociado a la superficie de las membranas celulares.

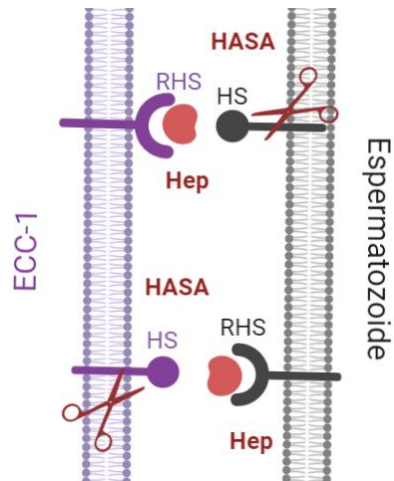


Figura 53. Modelo propuesto para la interacción entre espermatozoides y células endometriales. En el diagrama experimental se puede observar la interacción propuesta y a estudiar, mediada por heparán sulfato (HS) y/o receptores de HS (RHS) de las células endometriales y del espermatozoide. La interacción fue analizada mediante un bloqueo con heparina (Hep) (46 μ M) o cortando el HS con heparinasa III (HASA) (0,04 mUI/mL).

Para este estudio, se dejó que los cultivos de las ECC-1 llegaran a confluencia, como una manera de independizarse, relativamente, del número de células utilizado previo a realizar la coincubación de los mismos con los espermatozoides. Después de sucesivos lavados, se contabilizó la cantidad de espermatozoides que permanecieron unidos a las células ECC-1 para cada uno de los tratamientos realizados. Se tomaron fotos en 20 campos elegidos al azar en cada pocillo a 400x y se contó tal y como se observa en la Figura 54.

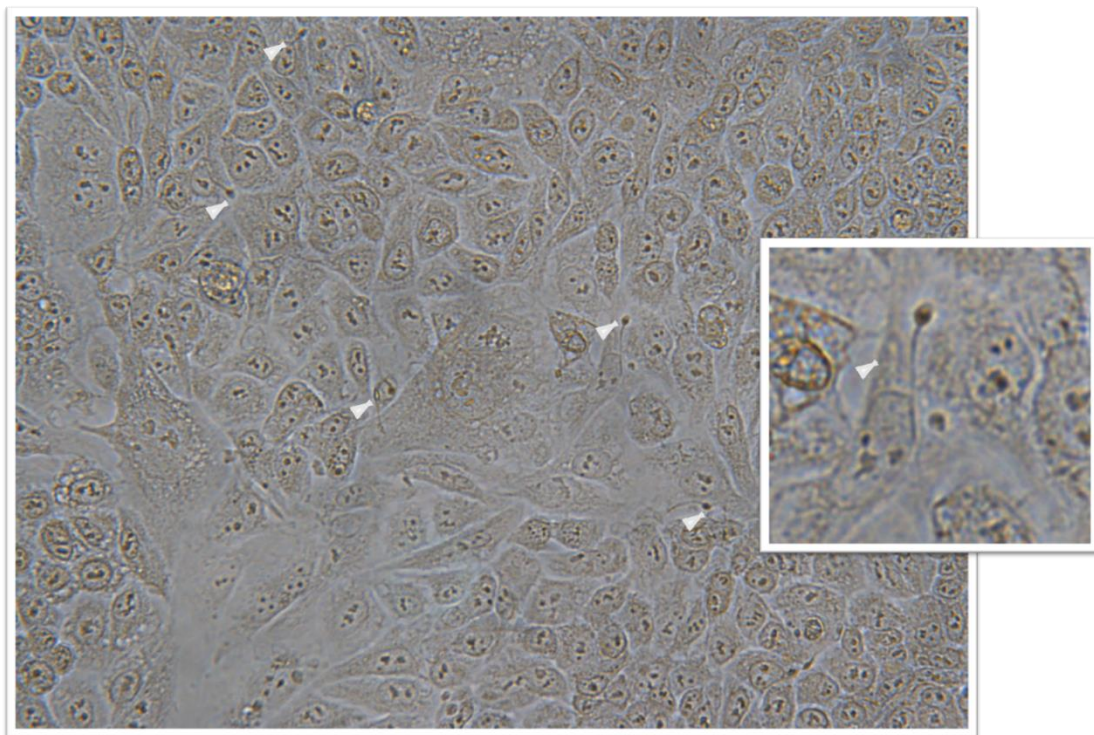


Figura 54. Interacción células ECC-1 y espermatozoides. En la imagen se puede observar a los espermatozoides pegados a las células (flechas blancas) en microscopio óptico (400x).

Se analizó, específicamente, la interacción entre el receptor de HS (RHS) de la célula ECC-1 y el HS del espermatozoide, según el esquema que se muestra en la Figura 55.

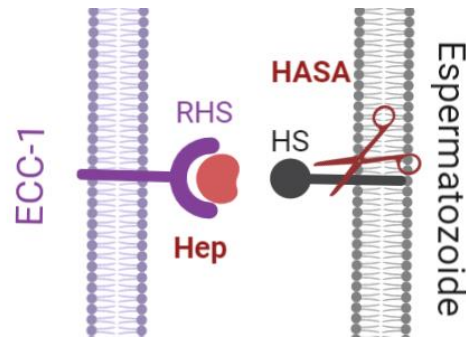


Figura 55. Interacción del HS del espermatozoide y RHS de las células ECC-1. Utilizamos Hep (46 μ M) para bloquear el receptor y HASA (0,04 mUI/mL) para cortar HS.

Los resultados obtenidos permitieron observar una disminución significativa del número de espermatozoides unidos a las células respecto al control, al clivar el HS del espermatozoide y bloquear el RHS de las células ECC-1 (Figura 56), no así al cortar solo el HS del espermatozoide o solo bloquear el RHS de las células.

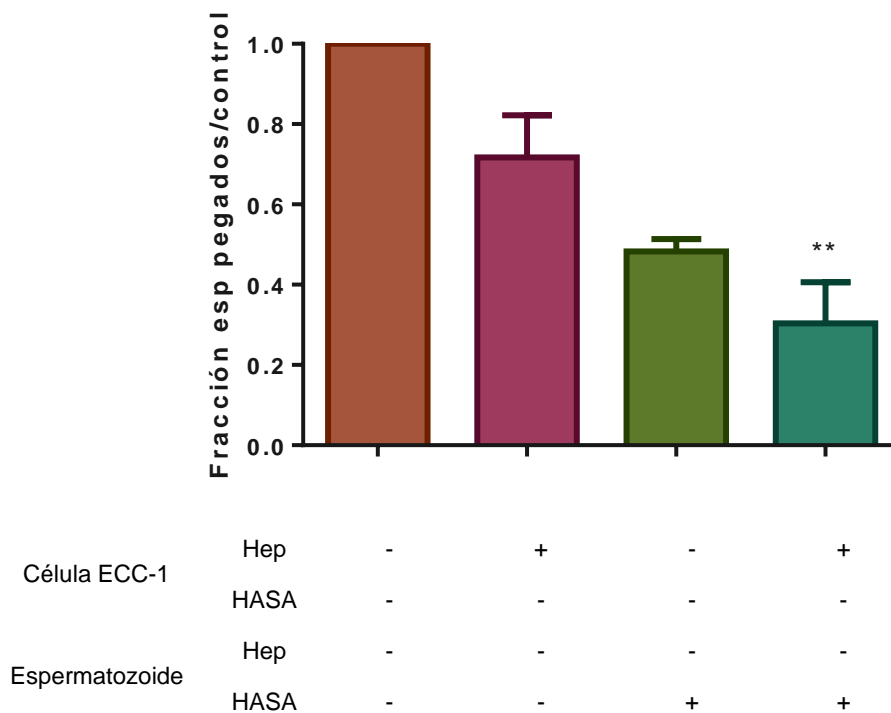


Figura 56. Interacción entre RHS de células endometriales y HS de espermatozoides. Cuantificación de la interacción de las células ECC-1 y espermatozoides humanos para los diferentes tratamientos realizados. Se observa la fracción de espermatozoides pegados a las células respecto al control sin pretratar (n=3; Dunn's test, **p= 0,0040).

Seguidamente, se analizó la interacción mediada por el HS de las células ECC-1 y el RHS de los espermatozoides, siguiendo el esquema que muestra la Figura 57.

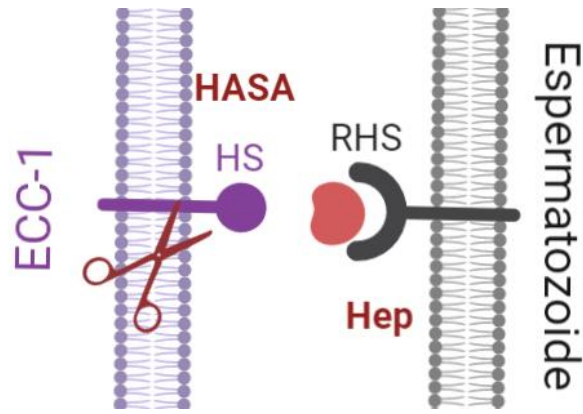
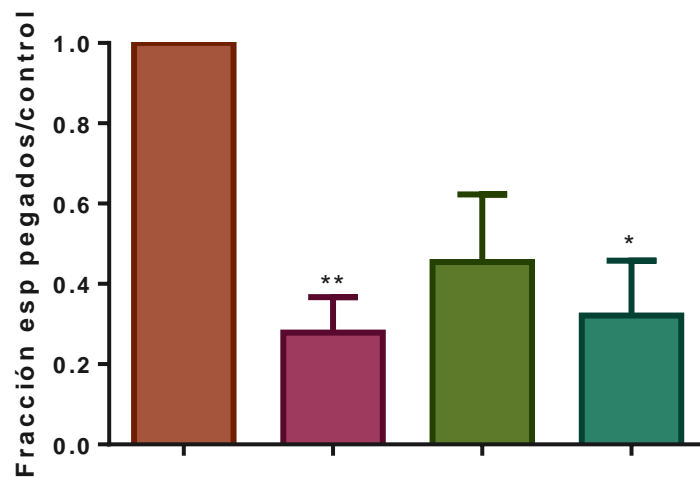


Figura 57. Interacción del RHS del espermatozoide y HS de las células ECC-1. Utilizamos Hep (46 μ M) para bloquear el receptor y HASA (0,04 mUI/mL) para cortar HS.

En este caso, bloqueando el RHS del espermatozoide y/o simultáneamente clivando el HS de las células endometriales se observó nuevamente una disminución significativa en la unión de los espermatozoides a las células, y una tendencia (aunque no significativa) a una menor unión al clivar el HS de las ECC-1 solamente (Figura 58).



Célula ECC-1	Hep	-	-	-	-
	HASA	-	-	+	+
Espermatozoide	Hep	-	+	-	+
	HASA	-	-	-	-

Figura 58. Interacción entre HS de células endometriales y RHS de espermatozoides. Cuantificación de la interacción de las células ECC-1 y espermatozoides humanos para los diferentes tratamientos realizados, se observa la fracción de espermatozoides pegados a las células respecto al control sin pretratar (n=3; Kruskal-Wallis, **p=0,023 *p=0,0343).

Para confirmar los resultados previos se procedió a bloquear ahora el receptor de HS exclusivamente o a clivar el HS exclusivamente en ambos tipos celulares, observándose una disminución de la fracción de espermatozoides pegados respecto al control (Figura 59). Si bien esta disminución no resultó significativa al cortar el HS en ambos tipos celulares, la tendencia fue igualmente marcada tal como se observara en el caso anterior.

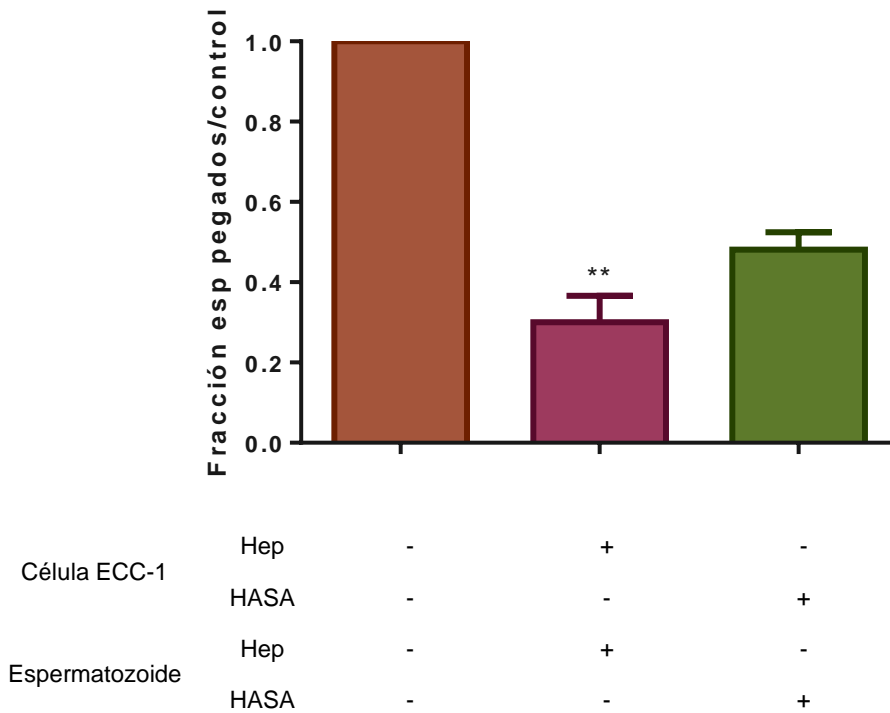


Figura 59. Interacción entre células ECC-1 y espermatozoides humanos realizando un doble bloqueo del RHS con Hep o cortando en ambos tipos el HS con HASA. Cuantificación de la interacción de las células ECC-1 y espermatozoides humanos para los diferentes tratamientos realizados, se observa la fracción de espermatozoides pegados a las células respecto al control sin pretratar (n=3; Dunn's test, **p= 0,003).

En forma semejante, el bloqueo de ambos tipos celulares o cada uno de forma independiente con Hep y HASA simultáneamente, se observó que en los tres casos disminuye la fracción de espermatozoides pegados a las células respecto al control (Figura 60), pero que, solamente al bloquear el RHS de ambos tipos celulares y clivar el HS de estos, esa disminución resultó significativa. Es de notar que, en este caso, a pesar de haber bloqueado las dos interacciones en ambos tipos celulares, el número de espermatozoides asociado a las células no llegó a cero.

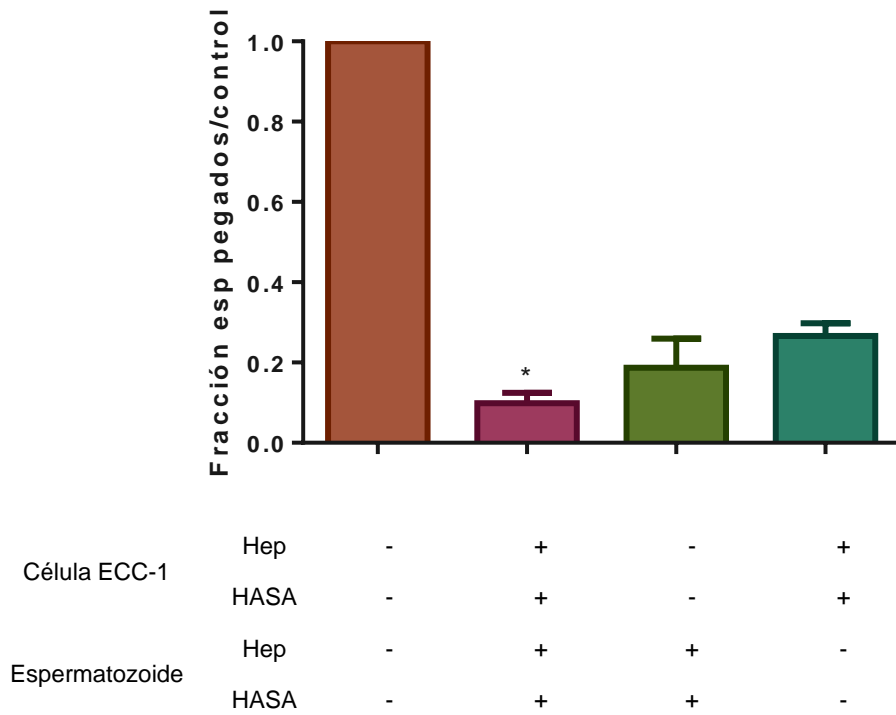


Figura 60: Interacción entre células endometriales y espermatozoides humanos bloqueando ambos tipos celulares tanto con Hep como con HASA. Cuantificación de la interacción de las células ECC-1 y espermatozoides humanos para los diferentes tratamientos realizados, se observa la fracción de espermatozoides pegados a las células respecto al control sin pretratar (n=3; Kruskal-Wallis, *p=0,025).

Cocultivo de células epiteliales provenientes del istmo de la trompa de Falopio y espermatozoides humanos.

Continuando con el camino recorrido por los espermatozoides hacia el encuentro con el oocito, una interacción fundamental ocurre al acercarse al punto final de la posible reunión, en la trompa de Falopio. Así como ocurrió previamente a nivel uterino, en este punto los espermatozoides también son captados y retenidos en ciertas zonas de las trompas, especialmente, en la zona del istmo, a fin de finalizar el proceso de capacitación, formar el reservorio espermático y reducir la cantidad de espermatozoides que llegan al encuentro con el oocito.

Repitiendo el uso combinado de heparina o de heparinasa III, se pudo estudiar el papel que cumplirían tanto la molécula del glicosaminoglicano HS como su receptor en esta interacción.

Dado que una parte fundamental de este objetivo consistió en la puesta a punto del cultivo celular a partir de las muestras de trompas de Falopio humanas obtenidas por cirugía, en primer lugar, se evaluaron las características celulares de estos cultivos.

Se confirmó la presencia de células epiteliales oviductales en los cultivos primarios mediante inmunofluorescencia, tal como se observa en las figuras 61 y 62.

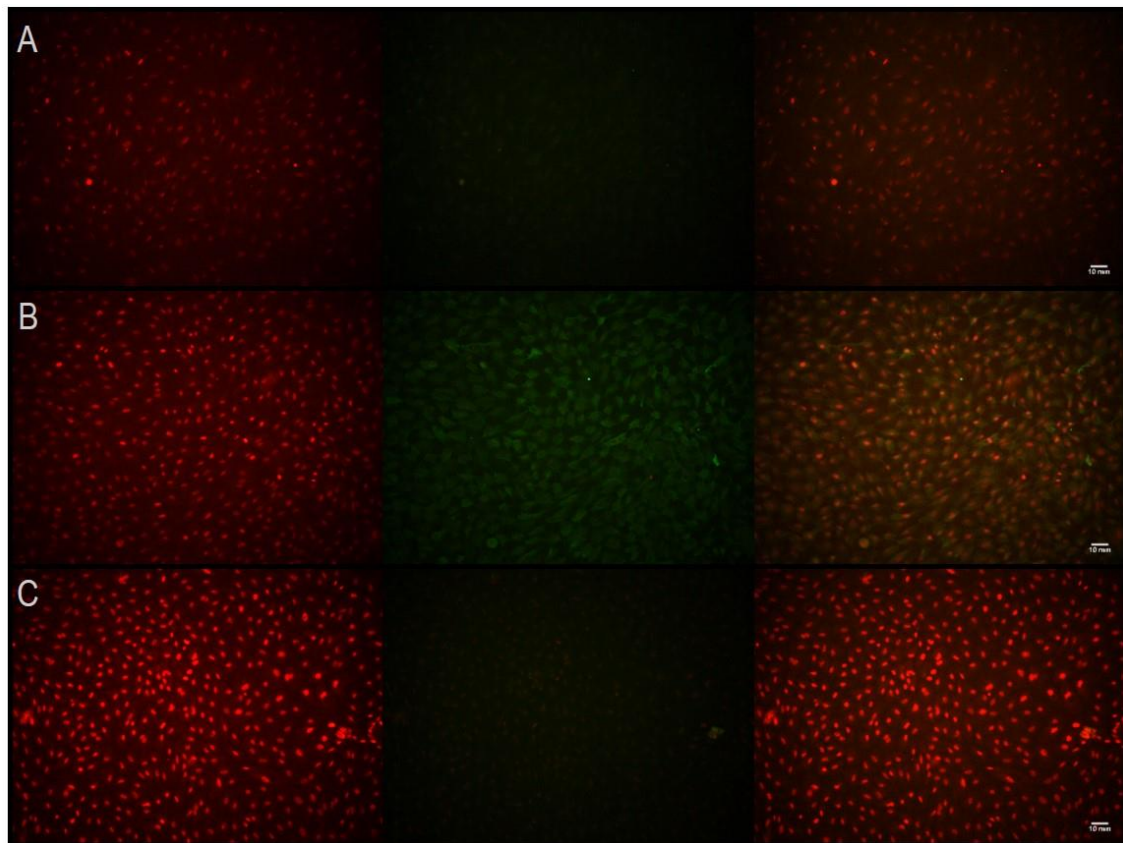


Figura 61. Inmunofluorescencia de cultivo de células oviductales. (A) Anti-vimentina (verde), revelando la ausencia de fibroblastos (200x). (B) Anti-citoqueratina (verde) confirmando la presencia de células epiteliales (200x). (C) Control negativo (200x). Los núcleos marcados con yoduro de propidio (rojo). El merge se encuentra en la última columna. Barra = 10 nm.

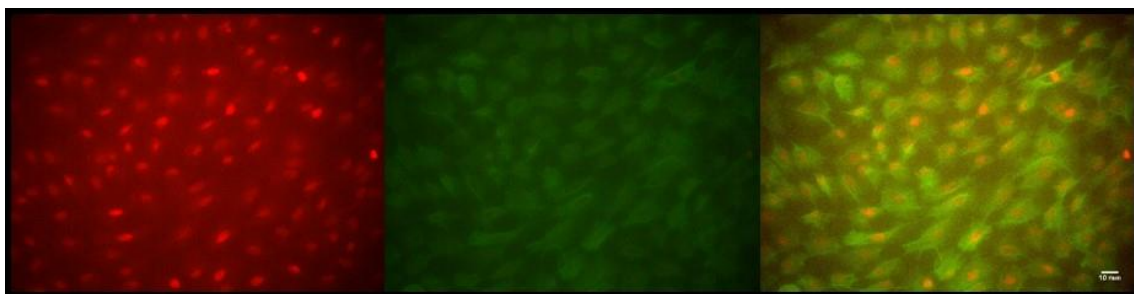


Figura 62. Inmunofluorescencia de células epiteliales oviductales. Los núcleos fueron marcados con yoduro de propidio (rojo). Anti-citoqueratina confirma la presencia de células epiteliales (verde) (400x). El merge se encuentra en la última columna. Barra = 10 nm.

En esta parte del objetivo, se estudió la interacción entre las células provenientes del istmo de las trompas de Falopio (o células epiteliales oviductales, CEO, como se nombrarán de ahora en adelante) y los espermatozoides humanos, utilizando heparinasa III de *Flavobacterium heparinum* para cortar el HS y heparina para bloquear el receptor de HS (RHS). Esto permitiría dilucidar si el mecanismo de unión entre ambos tipos celulares es a través de un modelo de doble cerradura entre los RHS y el HS de ambos, tal como se diagrama en la figura 63.

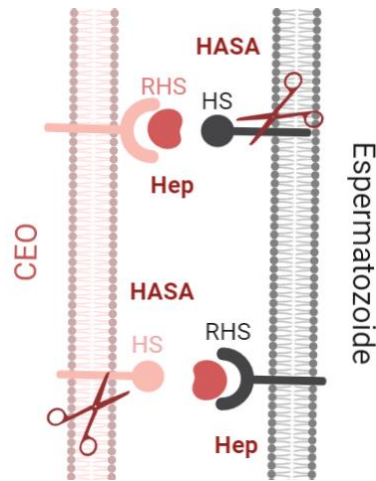


Figura 63. Modelo propuesto para la interacción entre espermatozoides y células epiteliales del oviducto humano. Esquema en el que se puede observar la interacción mediada por heparán sulfato (HS) y receptores de HS (RHS) de las células y del espermatozoide. La interacción fue bloqueada con heparina (Hep, 46 μ M) o se clivó previamente el HS con la enzima heparinasa III (HASA, 0,04 mUI/mL).

De la misma manera que se realizó para las células ECC-1, se tomaron fotos de 20 campos al azar a 400x. Solamente se contaron espermatozoides unidos a las células que estaban en confluencia tras sucesivos lavados (Figura 64).

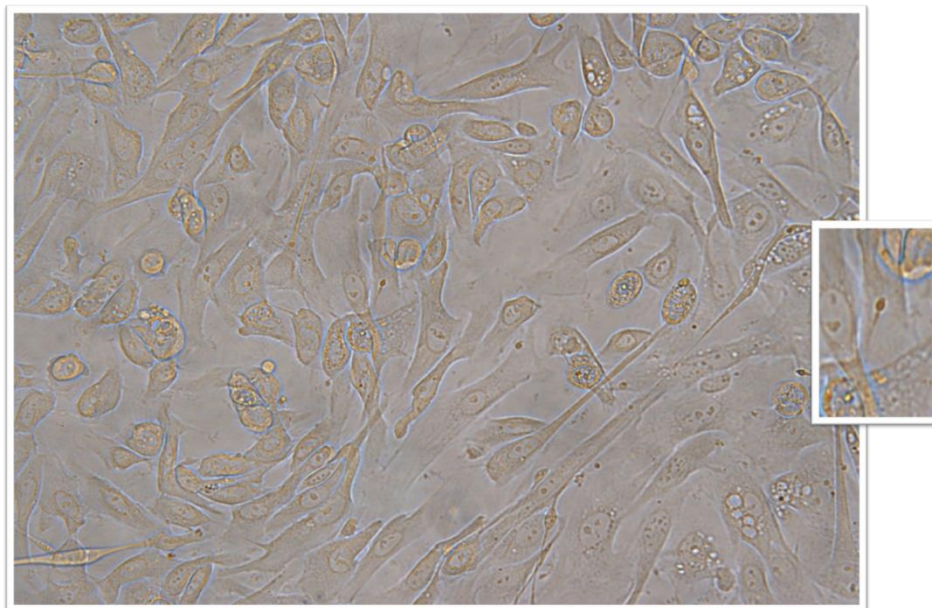


Figura 64. Interacción entre células oviductales y espermatozoides. En la imagen se puede observar espermatozoides unidos a las células oviductales provenientes del cultivo primario en confluencia a microscopio óptico (400x).

Los primeros experimentos se llevaron a cabo incubando las CEO o los espermatozoides con Heparinasa III durante 1 hora y, sorprendentemente, no se encontró disminución en el número de espermatozoides pegados a las CEO al clivar el glicosaminoglicano de cualquiera de los dos tipos celulares (Figura 65).

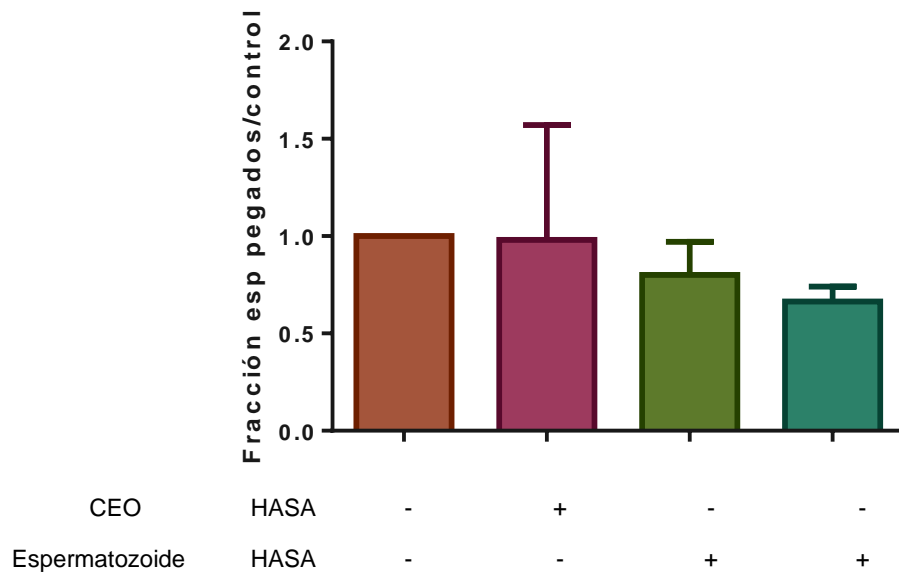


Figura 65. Interacción entre espermatozoides humanos y células oviductales mediada por HS. Al pretratar a las células o espermatozoides con HASA III durante 1 hora, de modo tal de clivar el HS presente en los mismos, no observamos diferencias entre los tratamientos. (n=2; p=0,6286, Kruskal-Wallis, Dunn's test NS).

Este resultado desconcertante llevó a incrementar el tiempo de incubación con la enzima para descartar que se tratase de un simple problema de actividad y, en consecuencia, el experimento se repitió tratando las células tubarias con HASA por 3 horas, en lugar de 1 h.

Nuevamente, al igual que en el caso de la interacción con las células endometriales, se analizó cada una de las interacciones (HS espermatozoide / RHS CEO y RHS espermatozoide / HS CEO) por separado. En primer lugar, se observó la interacción entre el RHS de las células epiteliales oviductales y el HS del espermatozoide tal como se esquematiza en la Figura 66.

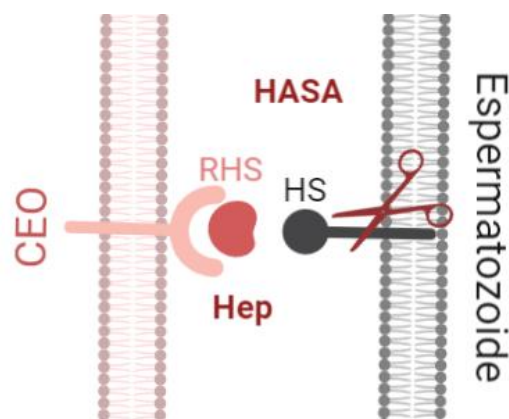


Figura 66. Interacción del HS del espermatozoide y RHS de las células ECC-1. Utilizamos Hep (46 μ M) para bloquear el receptor y HASA (0,04 mUI/mL) para cortar HS.

Se encontró que la cantidad de espermatozoides pegados a las ECO fue significativamente diferente respecto al control al pretratar los espermatozoides con HASA o al pretratar ambos tipos celulares (CEO con Hep y espermatozoides con HASA), pero no así al pretratar únicamente a las CEO con Hep, bloqueando el RHS (Figura 67). Si bien, en este último caso, la disminución observada no llegó a ser significativamente diferente al control, la tendencia resultó muy marcada.

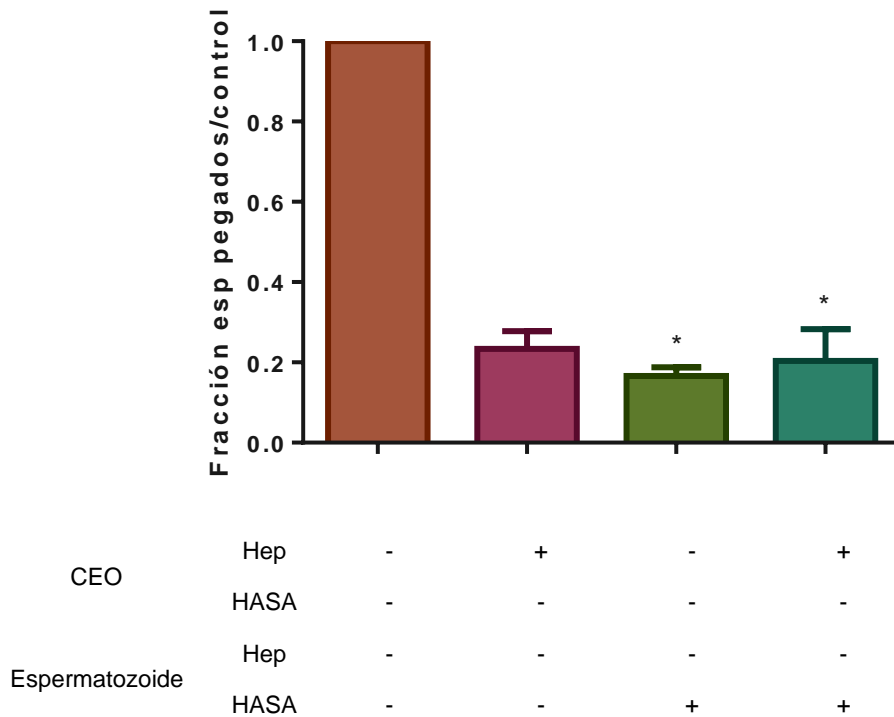


Figura 67. Interacción entre RHS de células epiteliales oviductales y HS de espermatozoides. Cuantificación de la interacción de las células epiteliales oviductales y espermatozoides humanos para los diferentes tratamientos realizados, se observa la fracción de espermatozoides pegados a las células respecto al control sin pretratar (n=4; Kruskal-Wallis, *p=0,0148).

En segundo lugar, se focalizó el estudio de la interacción entre ambos tipos celulares en la otra interacción, entre el HS de las CEO y el RHS del espermatozoide, según el esquema que se observa en la figura 68.

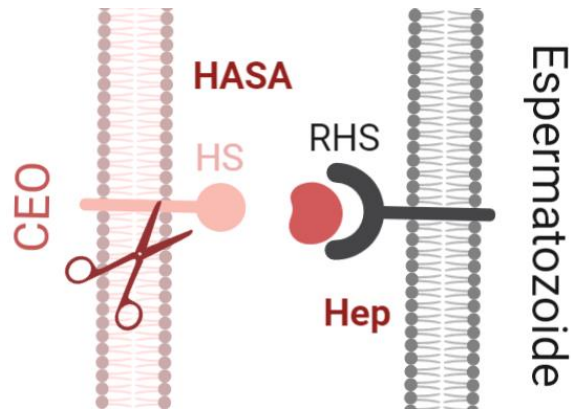


Figura 68. Interacción del RHS del espermatozoide y HS de las células epiteliales oviductales. Utilizamos Hep (46 μ M) para bloquear el receptor y HASA (0,04 mUI/mL) para cortar HS.

Los resultados obtenidos indicaron que la cantidad de espermatozoides pegados a las células epiteliales oviductales disminuyó al realizar los tres tipos de pretratamientos (Figura 69). Si bien la disminución fue significativa solamente tras pretratar tanto a las CEO como a los espermatozoides con HASA y Hep, respectivamente, los otros tratamientos mostraron una tendencia muy marcada a la disminución.

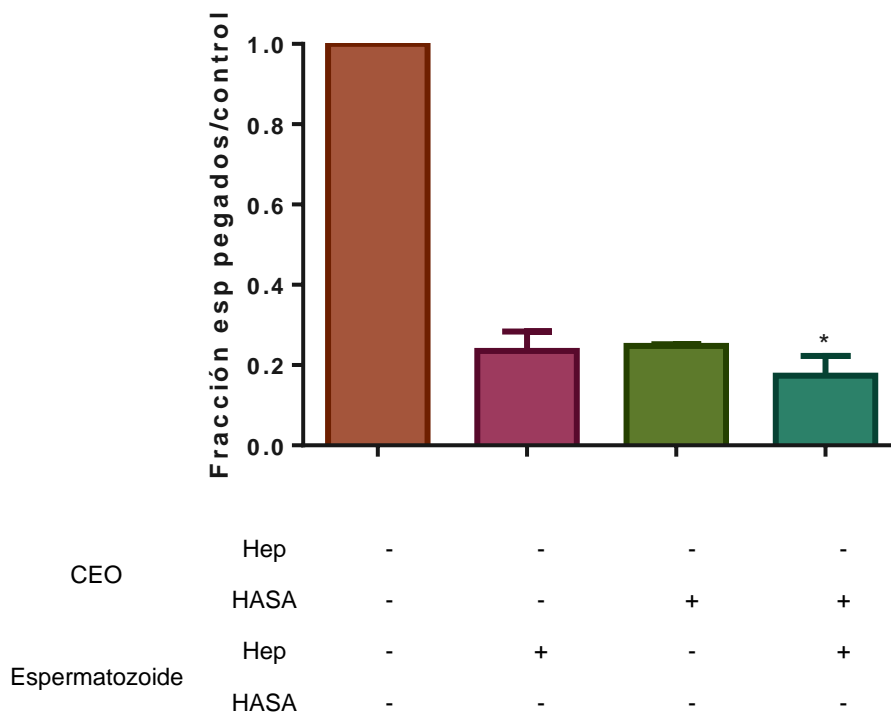


Figura 69. Interacción entre HS de células epiteliales oviductales y RHS de espermatozoides. Cuantificación de la interacción de las células epiteliales oviductales y espermatozoides humanos para los diferentes tratamientos realizados, se observa la fracción de espermatozoides pegados a las células respecto al control sin pretratar (n=4; Kruskal-Wallis, *p=0,0080).

Al analizar la interacción CEO - espermatozoide clivando el HS o bloqueando el receptor de HS de ambos tipos celulares simultáneamente, se observó una disminución significativa de la cantidad de espermatozoides pegados tanto al utilizar Hep como al pretratar con heparinasa (Figura 70).

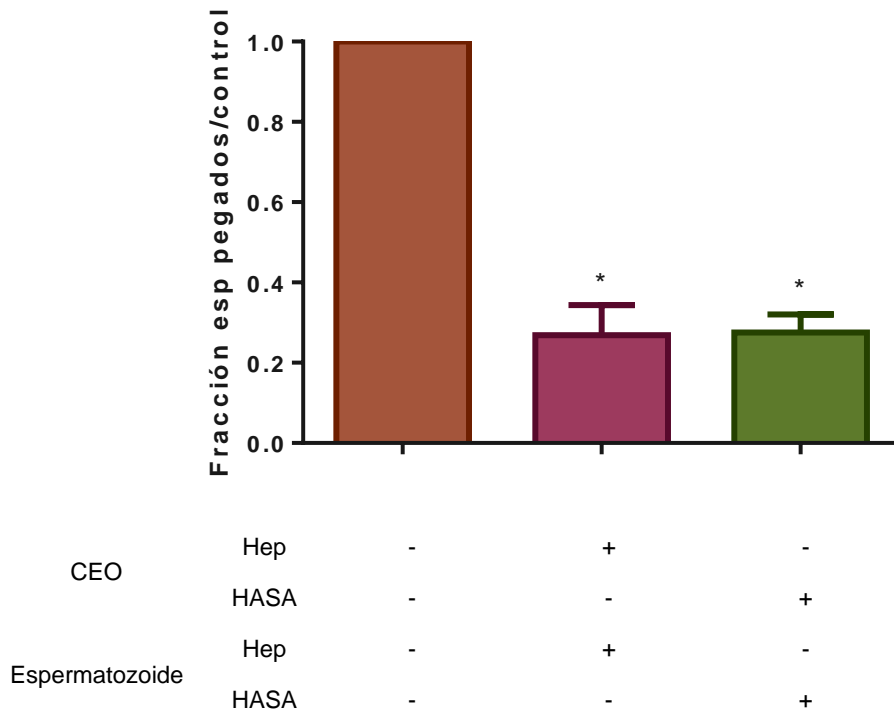


Figura 70. Interacción entre células epiteliales oviductales y espermatozoides humanos mediada por HS/RHS. Cuantificación de la interacción de las células epiteliales oviductales y espermatozoides humanos para los diferentes tratamientos realizados, se observa la fracción de espermatozoides pegados a las células respecto al control sin pretratar (n=4; Kruskal-Wallis, *p=0,0116).

Por último, cuando se bloqueó cada uno de los tipos celulares en forma independiente con Hep y HASA simultáneamente, se encontró una disminución significativa en el número de espermatozoides pegados al pretratar tanto las CEO como los espermatozoides (Figura 71).

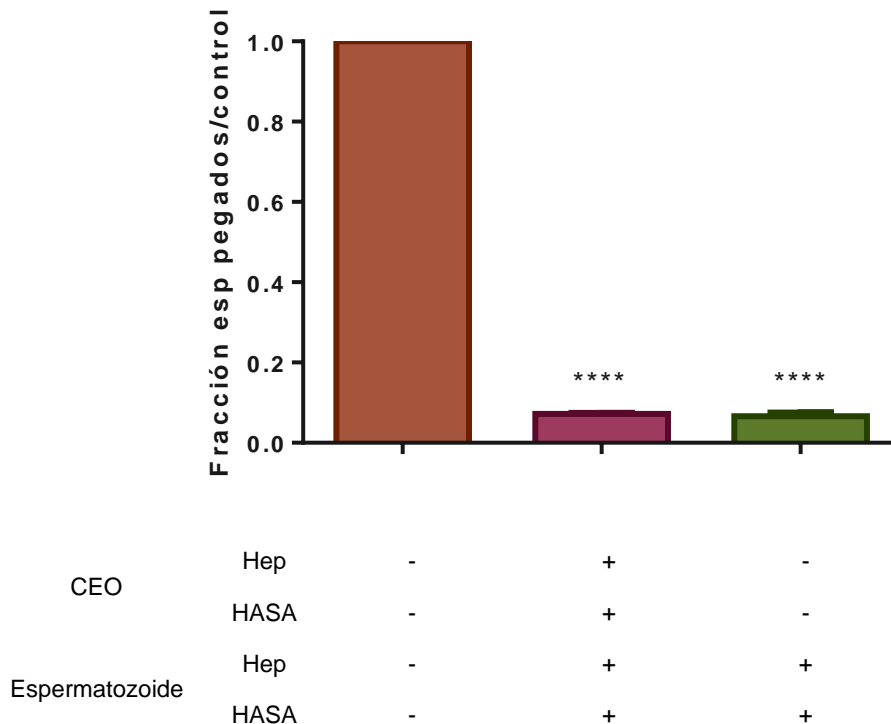


Figura 71. Interacción entre células epiteliales oviductales y espermatozoides humanos mediada por HS/RHS. Cuantificación de la interacción de las células epiteliales oviductales y espermatozoides humanos para los diferentes tratamientos realizados, se observa la fracción de espermatozoides pegados a las células respecto al control sin pretratar (n=2; ANOVA, Sidak, ****p<0,0001).

Nos parece importante aclarar que la cantidad de muestra obtenida de la TF no nos permitió realizar la condición células de la TF + HASA + Hep como tratamiento, por lo tanto, no aparece en el gráfico esa condición que sí aparece en la página 114.

Inmunocitoquímica de HS en espermatozoides de ratón.

En virtud de las dificultades que se encuentran al utilizar el modelo de espermatozoide humano, en relación con la posibilidad de continuar explorando la interacción entre gametas en el tracto reproductor femenino hasta la fecundación, incluyendo la asociación con las diferentes estructuras oocitarias, se decidió incorporar un modelo murino en ratón a este trabajo de tesis.

En primer lugar, se estudió la presencia del glicosaminoglicano HS en el espermatozoide de ratón en distintos estadios, SO, ICC y RAI, tal como se hiciera con el humano.

A diferencia de lo observado en espermatozoides humanos, todos los espermatozoides marcados presentaron la marca de HS en el segmento ecuatorial en los tres estadios analizados (en el 100% de los casos) (Figura 72). Por lo tanto, se analizó directamente la posible diferencia entre la marca presente en espermatozoides reaccionados y no reaccionados (Figura 73).

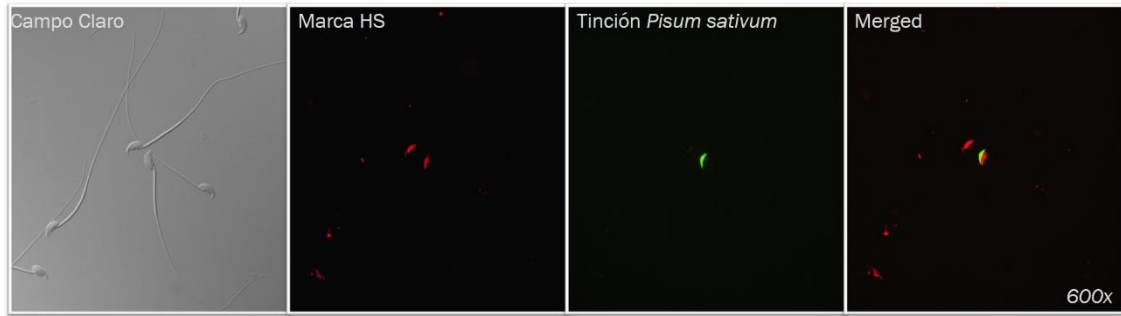


Figura 72. HS en espermatozoides murinos (ratón). A) Campo claro. B) Inmunofluorescencia de HS en espermatozoides murinos (rojo). C) Marca GFP en acrosoma (verde). D) Superposición de imágenes B y C. Aumento 600x.

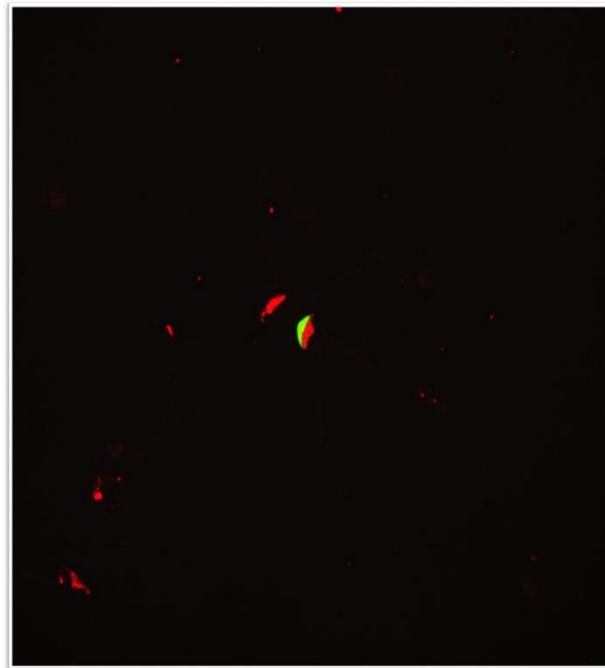


Figura 73. Inmunocitoquímica de HS en espermatozoides de ratón. Detalle aumentado donde se puede observar un espermatozoide reaccionado con HS en el segmento ecuatorial y un espermatozoide intacto que también posee HS en el segmento ecuatorial.

Se observó que el número total de espermatozoides (reaccionados o no) marcados para HS disminuyó de SO a ICC, pero no entre ICC y RAI (Figura 74). La proporción de espermatozoides con marca de HS que se encontraban además reaccionados fue semejante en los 3 estadios.

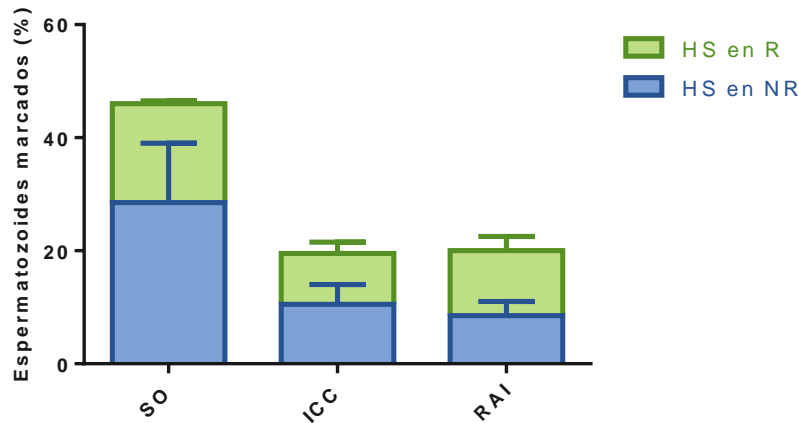


Figura 74. HS en espermatozoides murinos (ratón). Se puede observar el porcentaje de espermatozoides marcados para HS en espermatozoides reaccionados (R, verde) y no reaccionados (NR, azul) para los diferentes estadios espermáticos analizados: SO, ICC y RAI (n=2).

Desafortunadamente y por razones ajenas al laboratorio, la disponibilidad de estos ratones transgénicos fue limitada, lo cual impidió continuar con estos experimentos. Aún así, no hay duda de que el HS está presente en espermatozoides murinos, específicamente en el segmento ecuatorial de los mismos, y que el mismo se mantiene aún después de que haya tenido lugar la reacción acrosomal, aunque el porcentaje de espermatozoides marcados es menor en este último caso.

Descondensación de espermatozoides humanos in vitro en presencia de oocitos frescos de ratón (micrométodo).

La técnica del micrométodo para evaluar la descondensación *in vitro* previamente desarrollada en nuestro laboratorio tiene una importante ventaja respecto de la descondensación realizada en tubo de ensayos: se puede utilizar el heparán sulfato presente en el citoplasma del oocito, sin agregado de heparina exógena. Esto provee un resultado más cercano a lo que debería ocurrir *in vivo* una vez penetrada la membrana plasmática del oocito por el espermatozoide.

Con el objeto de determinar si el HS presente en el espermatozoide humano está involucrado en la descondensación de la cromatina espermática, se evaluó la cinética de descondensación de espermatozoides humanos con la técnica del micrométodo, previa incubación de los espermatozoides con heparinasa III. Se observó una disminución del porcentaje de descondensación total (%(M+G)) alcanzado para todos los tiempos analizados, al incubar simultáneamente a los espermatozoides con los oocitos murinos y HASA, que no tuvo lugar al preincubar a los espermatozoides humanos con la enzima. (Figura 75).

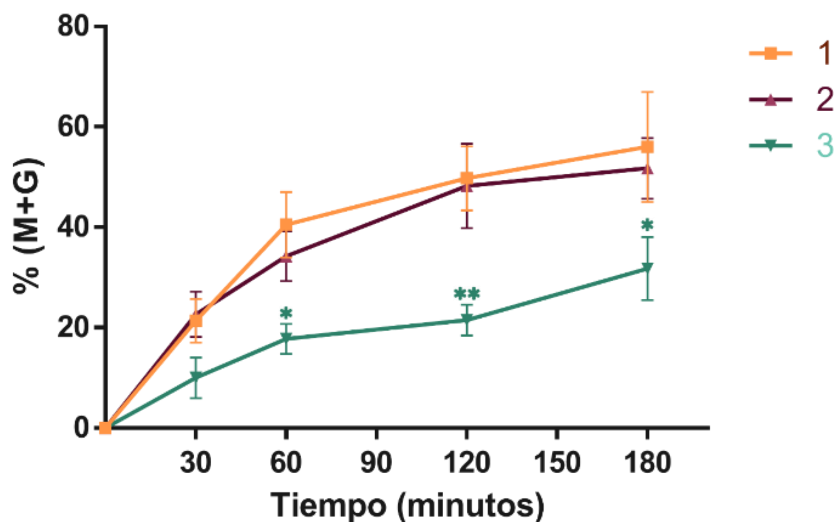


Figura 75. Cinética de descondensación de espermatozoides humanos en presencia de oocitos murinos (ratón). Porcentaje de descondensación máxima alcanzada % (M+G), luego de la incubación en presencia de oocitos murinos medida a los 30, 60, 120 y 180 minutos. 1) Espermatozoides + oocitos. 2) Espermatozoides preincubados con HASA III + oocitos. 3) Espermatozoides + oocitos + HASA III agregada simultáneamente. (n=4; *p<0,05; ** p<0,005. ANOVA una vía y test de Tukey).

No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de descondensación total alcanzada a los distintos tiempos ensayados al realizar la descondensación por la técnica del micrométodo, pero utilizando Hep en lugar de oocitos murinos y espermatozoides tratados o no previamente con Heparinasa (Figura 76).

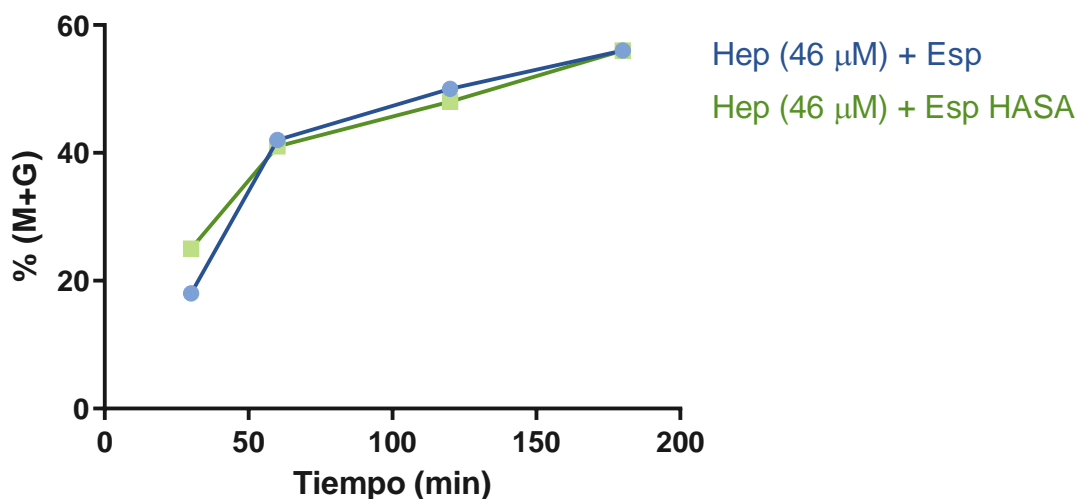


Figura 76. Cinética de descondensación de espermatozoides humanos en presencia de Hep (46 μM). Porcentaje de descondensación máxima alcanzada % (M+G), luego de la incubación en presencia de Hep entre porta y cubre, medida a los 30, 60, 120 y 180 minutos. Línea azul: Espermatozoides sin pretratamiento + Hep (46 μM) + GSH (90 mg/mL). Línea verde: Espermatozoides pretratados con HASA III (0,04 mUI/mL) + Hep (46 μM) + GSH (90 mg/mL). (n=4; NS, ANOVA una vía y test de Tukey).

Por las razones que se explican en el Anexo correspondiente, una vez confirmado que el HS del oocito es el que participa en el proceso de descondensación espermática y que el que se encuentra asociado al espermatozoide no cumpliría un rol en este proceso, no se pudo continuar con el estudio de la participación de dicho GAG en la interacción con las células del *cumulus*, la zona pelúcida y el oolema, previo a la penetración del espermatozoide hacia el interior del oocito tal como se había pensado originariamente al incluir el modelo murino en este trabajo de tesis.

Habiendo estudiado la ubicación del HS sobre la superficie del espermatozoide, evaluado su participación en el proceso de descondensación espermática en el oocito y en la interacción del espermatozoide con el epitelio del endometrio y la trompa de Falopio, dos eventos clave de su recorrido hacia el oocito, se procedió hacia el **objetivo 3**. Este objetivo intentó analizar la posible utilidad del ensayo de descondensación espermática *in vitro* en presencia de Hep y GSH como método diagnóstico de funcionalidad espermática en pacientes infértiles que realizan tratamientos de reproducción asistida.

Descondensación del espermatozoide humano in vitro y su posible aplicación a procedimientos de fertilización asistida.

NOTA: en esta parte de los resultados se utilizará el término “pacientes infértiles”, entendiéndose que son pacientes que consultan por problemas de infertilidad pero que, eventualmente, mediante tratamientos de reproducción asistida podrían llegar a generar embriones viables.

Éxito en los tratamientos de ICSI

La mediana de la tasa de fecundación para la población de pacientes estudiada fue del 80 % (rango intercuartilo 67-100, n= 129 ciclos); 94 ciclos resultaron en una transferencia embrionaria, con un promedio de 2 embriones por transferencia. El porcentaje de embarazos bioquímicos y clínicos por transferencia fue del 32 % (30/94) y 28 % (26/94), respectivamente, y el de nacidos vivos fue del 17 % (16/94) por transferencia (Figura 77A).

Se utilizaron oocitos de donantes en 45 de los 129 ciclos realizados; 34/45 de donantes y 60/84 ciclos de no donantes resultaron en una transferencia embrionaria. La mayoría de los ciclos con donantes que no resultaron en transferencia (8/11, 73 %) fue debido a una decisión de preservar los embriones congelados, mientras que en 15/24 (60 %) de los ciclos sin donantes, no hubo embriones viables para transferir. Las tasas de fecundación y clivaje fueron similares en ambos grupos: mediana de fecundación 83 % (intercuartilo= 75-100) y 80 % (intercuartilo= 62-93) en donantes y no donantes, respectivamente; la mediana de clivaje fue del 100 % (intercuartilo=

100-100) en ambos grupos (test exacto de Fisher, NS). Los porcentajes de embarazos bioquímicos y clínicos y de nacidos vivos por transferencia fueron ligeramente superiores para los ciclos con donantes, aunque las diferencias no resultaron significativas (test exacto de Fisher, NS) (Figura 77B).

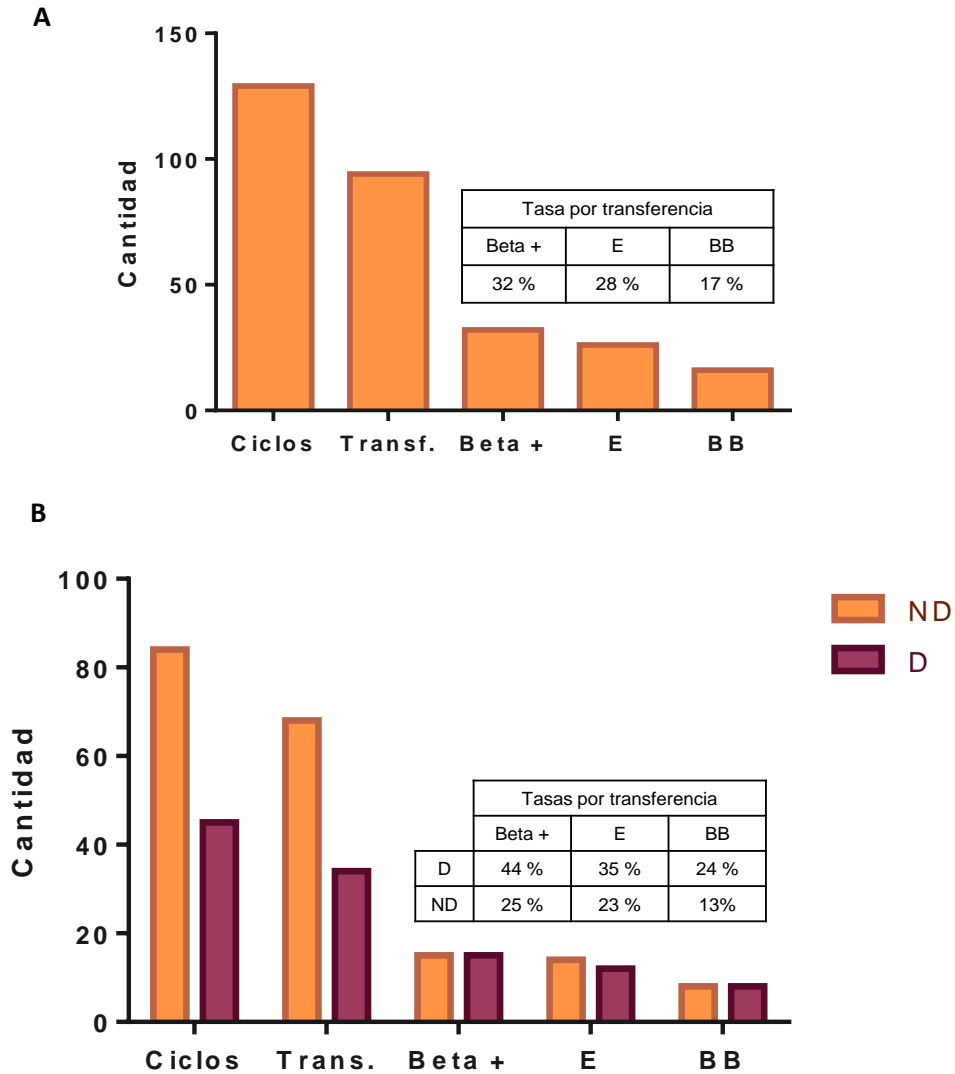


Figura 77. Resultados de ICSI para la población total de pacientes (panel A, n=129); y para la población separada en aquellos que utilizaron oocitos propios (panel B; ND; n=84; barras naranjas) o donados (panel B; D; n=45; barras bordó). Se expresan los resultados de Beta +, Embarazo y BB (nacido vivo) por transferencia. No hubo diferencias significativas en las medidas de éxito de ICSI (Test exacto de Fisher) entre los pacientes que utilizaron oocitos de donantes o no.

La edad promedio de las pacientes fue de $42,9 \pm 0,6$ y $37,3 \pm 0,5$ para las que utilizaron oocitos de donantes o propios, respectivamente (test no pareado de Student, $p < 0,0001$). Las donantes

de oocitos fueron siempre de menores de 30 años, situación poco común entre pacientes que utilizaron oocitos propios (3/84).

Los embriones fueron clasificados mediante un "Score" de calidad embrionaria tal como se describió en Materiales y Métodos. El "Score" promedio fue de $2,5 \pm 0,1$; $2,6 \pm 0,1$ y $2,4 \pm 0,1$ para la totalidad de los ciclos, los ciclos con oocitos propios y los ciclos con oocitos de donantes, respectivamente. Estos valores no fueron significativamente diferentes entre sí (ANOVA + test de Tukey, NS).

Fragmentación del DNA espermático

Se realizó el ensayo de TUNEL sobre espermatozoides obtenidos de 100 pacientes y resultó en un promedio de 9 % (rango intercuartilo= 4-18). Considerando un valor de corte de 20 %, como se estableció en Materiales y Métodos, 16 pacientes fueron clasificados como positivos y 84 como negativos. Los ciclos que involucraron a pacientes TUNEL+ resultaron en una tasa de fecundación del 73 % (mediana; rango intercuartilo= 54-96), una tasa de clivaje del 100 % (mediana; intercuartilo= 97-100), 10 transferencias, 3 embarazos bioquímicos (30 % por transferencia), 2 embarazos clínicos (20 % por transferencia) y 2 nacidos vivos (20 % por transferencia). Estos valores no resultaron significativamente diferentes (test exacto de Fisher, $p = 1$) de los valores correspondientes obtenidos para los ciclos que involucraron pacientes TUNEL-: 83 % (mediana, intercuartilo = 69-100) para la tasa de fecundación, 100 % para la tasa de clivaje (mediana, intercuartilo = 100-100), 64 transferencias, 20 embarazos bioquímicos (31% por transferencia), 17 embarazos clínicos (27 % por transferencia) y 2 nacidos vivos (17 % por transferencia). El "Score" embrionario también fue similar entre los dos grupos: $2,6 \pm 0,1$ y $2,6 \pm 0,3$ para TUNEL- y TUNEL+, respectivamente (Figura 78).

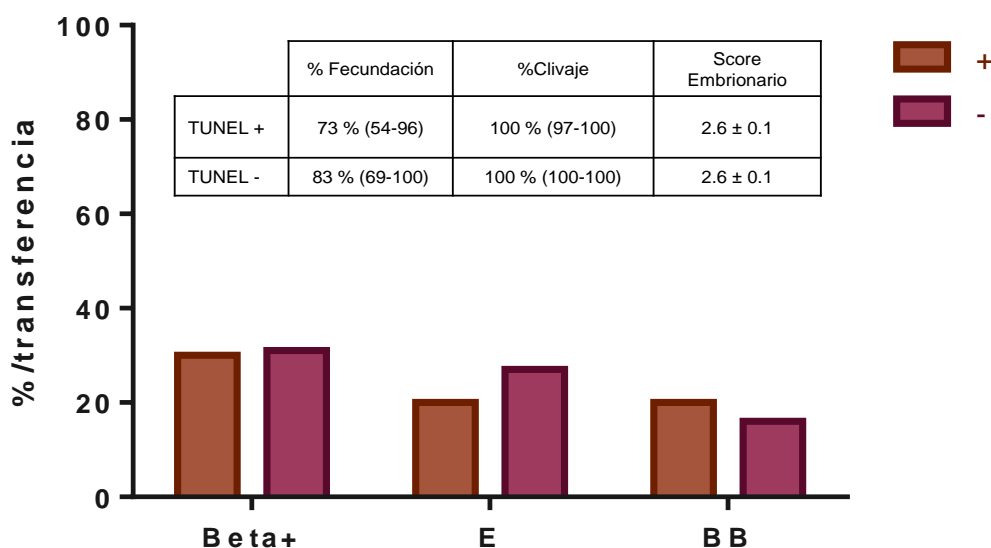


Figura 78. Resultados de ICSI y fragmentación del DNA espermático. Los pacientes fueron clasificados en TUNEL positivos (+, n= 16, barras rojo oscuro) o TUNEL negativos (-; n= 88; barras violeta oscuro) según el punto de corte de 20%, como fue establecido en materiales y métodos. Las tasas de fecundación y clivaje están expresadas como la mediana y el rango intercuartil; ES está expresado como la media y EEM. Beta+, embarazo (E) y nacido vivo (BB) están expresados por transferencia. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos en ninguno de los parámetros analizados (Test de Mann-Whitney, Student’s no pareado o Test exacto de Fisher, según fuera necesario).

Se encontró una correlación baja de los valores de TUNEL con la tasa de fecundación (Spearman, $r = -0,2049$, $p = 0,0317$) pero no hubo con la tasa de clivaje (Spearman $r = -0,1910$, $p = 0,065$) o la calidad embrionaria determinada por el valor del “Score” (Spearman, $r = 0,1875$, $p = 0,8647$).

Descondensación de la cromatina espermática *in vitro*

Analizando la cinética de descondensación *in vitro* de espermatozoides provenientes de muestras de donantes normozoospermicos, se estableció un valor de corte para la velocidad de descondensación que resultó ser de 1,5. El mismo se obtuvo realizando un promedio de la velocidad de descondensación (D60/D30) de los donantes normozoospermicos al que se le sumaron 2 desvíos estándar. Este valor, permitió diferenciar entre descondensadores rápidos (D60/D30 < 1,5) y descondensadores lentos (D60/D30 > 1,5). Todos los donantes analizados se comportaron como descondensadores rápidos, permitiendo establecer este punto de corte como valor contra el cual analizar el comportamiento de las muestras de pacientes (Figura 79A).

Al evaluar la cinética de descondensación de espermatozoides de los pacientes infértiles provenientes de la clínica de fecundación asistida PROCREARTE (n=129), fue posible diferenciar dos grupos descondensadores rápidos, semejantes a los donantes y descondensadores lentos (Figura 79B).

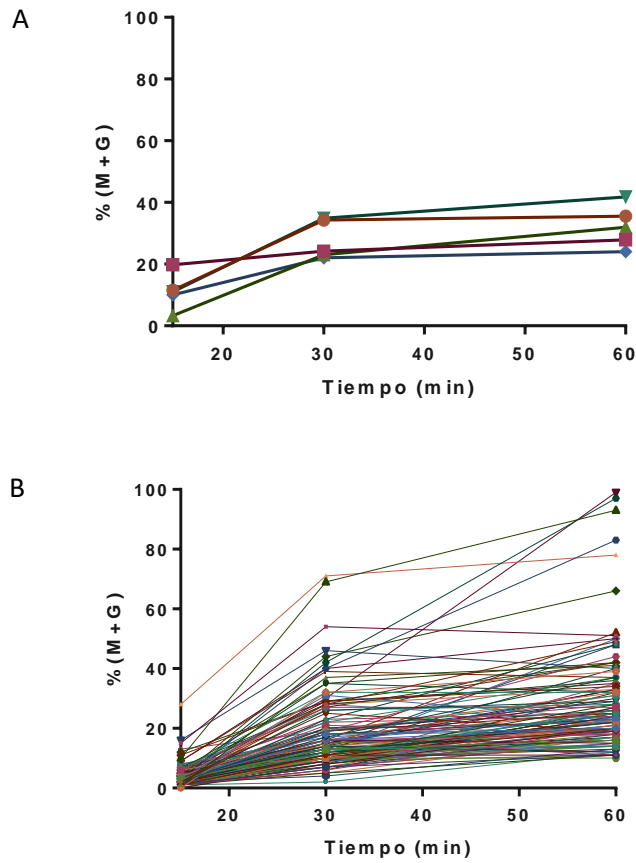


Figura 79. Cinética de descondensación de A) Donantes normozoospermicos y B) Pacientes infértiles. Se puede observar para cada caso el porcentaje máximo de descondensación alcanzado (%(M+G)) en función del tiempo.

La siguiente figura 80 desglosa los resultados obtenidos para los pacientes, a fin de una mejor visualización del comportamiento individual de los mismos.

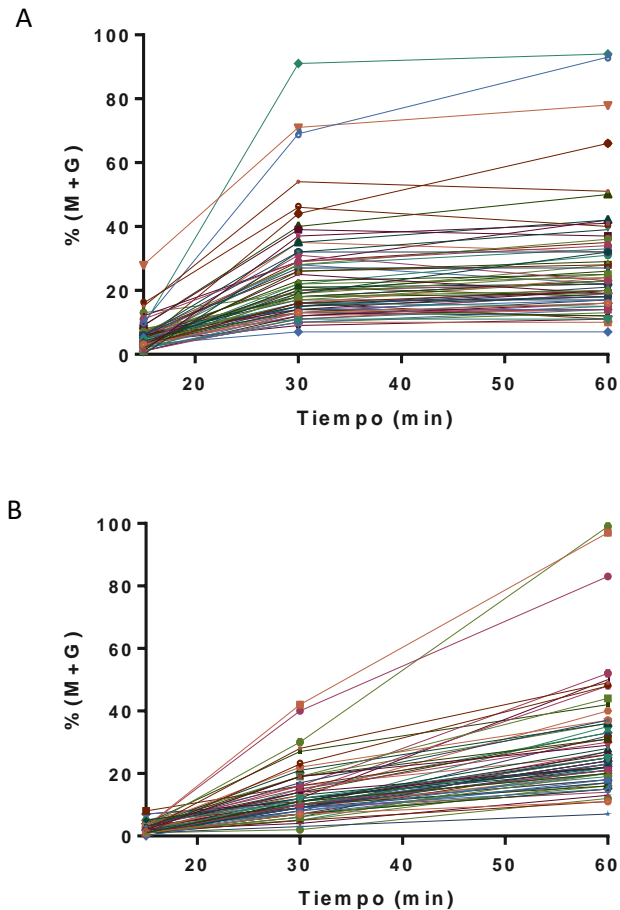


Figura 80. Cinética de descondensación de A) Pacientes infértiles que fueron descondensadores rápidos y B) Pacientes infértiles que fueron descondensadores lentos. Se puede observar para cada caso el porcentaje máximo de descondensación alcanzado (%(M+G)) a lo largo del tiempo.

Resultados de TUNEL e ICSI en descondensadores rápidos y lentos.

El porcentaje de pacientes TUNEL+ fue similar entre los descondensadores rápidos y lentos: 18% vs. 14 %, respectivamente (test exacto de Fisher, $p= 0,5925$). También fueron similares los valores de TUNEL (test de Mann-Whitney, $p= 0,0739$) en ambos grupos: mediana 10 % y 7 % para descondensadores rápidos y lentos, respectivamente.

La tasa de fecundación fue similar (test de Mann-Whitney, $p= 0,0739$) para los descondensadores rápidos y lentos (mediana 80 %), lo mismo que la tasa de clivaje, siendo de 100 % para ambos grupos. Sin embargo, en general el "Score" embrionario fue mejor en los descondensadores rápidos, evidenciado por un número menor ($2,3 \pm 0,1$ versus $2,6 \pm 0,1$ para los descondensadores lentos; Test t no pareado, $p= 0,0459$) (Figura 81). Esta misma figura muestra que las tasas de embarazo bioquímico y clínico por transferencia y la tasa de nacidos vivos también fueron similares entre los dos grupos: 27 % vs. 36% (test exacto de Fisher, $p=$

0,3854), 20 % vs. 34 % (test exacto de Fisher, $p= 0,17$) y 14 % vs. 20 % (test exacto de Fisher, $p= 0,58$), respectivamente.

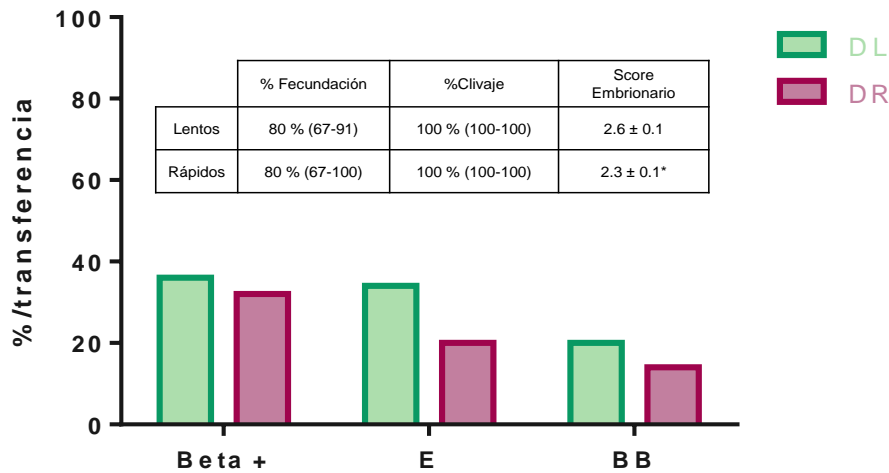


Figura 81. Resultados de ICSI y velocidad de descondensación del espermatozoide. Los pacientes fueron clasificados como descondensadores rápidos (DR; $n=61$; barras rosas) o lentos (DL, $n=68$; barras verde agua) según el valor de D60/D30, tal como fuera descrito previamente. DR= $D60/D30 < 1,5$; DL= $D60/D30 > 1,5$. Las tasas de fecundación y clivaje están expresadas como la mediana y el rango intercuartilo; ES está expresado como la media y EEM. Beta +, embarazo (E) y nacido vivo (BB) están expresados por transferencia. * $p < 0,05$, Test de Student no pareado. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para los parámetros analizados (Test Mann Whitney, Student no pareado o Test exacto de Fisher, según correspondiera).

Los pacientes fueron divididos en grupos de acuerdo con que utilizaran oocitos donados o propios. La Figura 82 muestra la tasa de éxito con ICSI en ciclos con oocitos propios u ovodonación para descondensadores rápidos (Panel A) o lentos (Panel B). Las tasas de embarazos bioquímicos y clínicos y nacidos vivos por transferencia fueron similares entre oocitos propios ($n= 29$ transferencias) o donados ($n= 15$ transferencias), para descondensadores rápidos (Panel A). La concentración espermática, el % de motilidad y el % de morfología fueron similares para los descondensadores rápidos en cualquiera de los dos grupos (oocitos propios o donados) (test de t no pareado, $p= 0,845$, $p= 0,060$ y $p= 0,752$, respectivamente). Tal como se esperaba, la edad de la paciente fue significativamente mayor en las parejas que utilizaron oocitos de donante (test de t no pareado, $p < 0,0001$).

Por el contrario, cuando se analizaron los pacientes descondensadores lentos, las tasas de embarazos bioquímicos y clínicos fueron significativamente mayores en ciclos con donante de oocitos ($n= 19$ transferencias) (test exacto de Fisher, $p= 0,0164$ y $0,0371$, respectivamente). La tasa de nacidos vivos, aunque casi 3 veces superior en los que utilizaron oocitos de donante (32%) versus propios ($n= 31$ transferencias, 13 %), no resultó significativamente diferente (test exacto de Fisher, $p=0,1505$). La concentración espermática, el % de motilidad y el % de

morfología fueron similares para los descondensadores lentos, independientemente del tipo de ciclo (propio u ovodonación) (test de t no pareado, $p= 0,410, 0,227$ y $0,248$, respectivamente). Tal como era esperable, la edad de la paciente fue significativamente mayor en las parejas que utilizaron oocitos de donante (test de t no pareado, $p< 0,0001$).

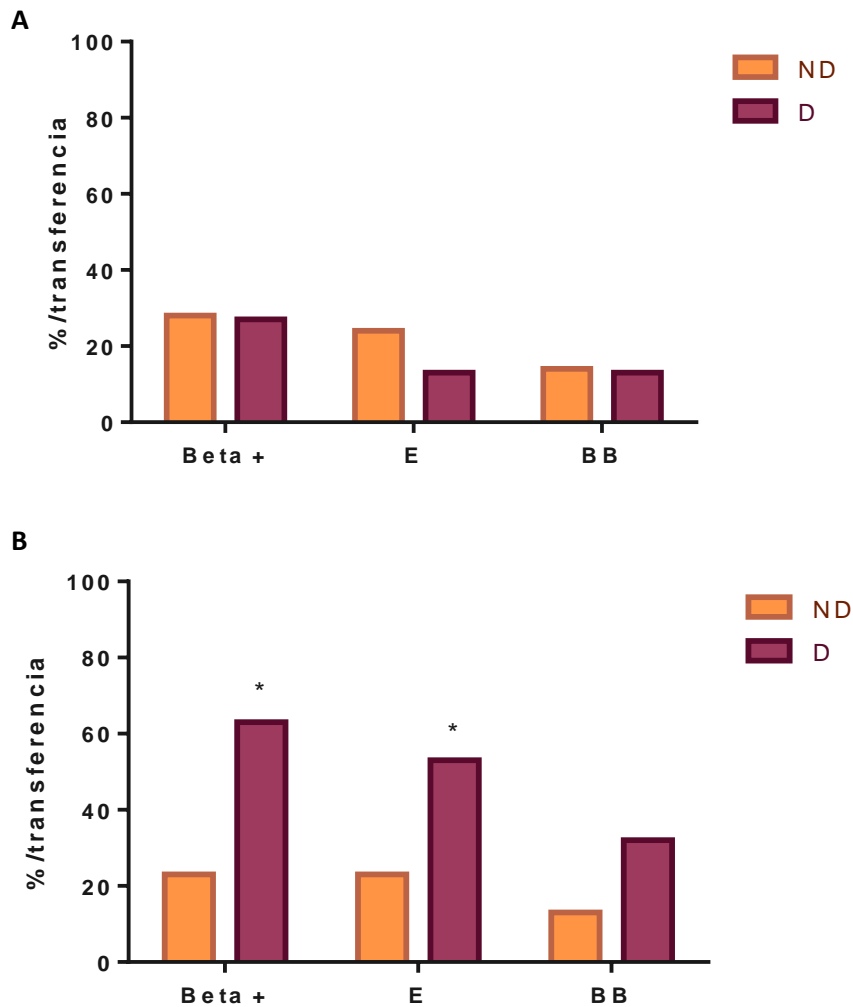


Figura 82. Resultados de ICSI en ciclos que utilizaron oocitos donados (D) o no donados (ND) para descondensadores rápidos (DR; Panel A) y lentos (DL; Panel B). DR y DL fueron subdivididos según si fueron a ciclos con oocitos donados (D; barras violetas) o no donados (ND, barras naranjas). Beta+, embarazo (E) y nacidos vivos (BB) están expresados por transferencia. $p< 0,05$, test exacto de Fisher.

Luego, cada paciente fue analizado individualmente teniendo en cuenta tanto la velocidad de descondensación como el valor de TUNEL. La Figura 83A muestra los valores individuales de TUNEL y D60/D30, graficados uno en función del otro en un sistema de ejes cartesianos. Se pudieron identificar cuatro grupos de pacientes, basándose en los valores de corte para cada parámetro: (●) TUNEL+ y descondensadores rápidos ($n= 9$), (●) TUNEL+ y descondensadores lentos ($n= 7$), (●) TUNEL- y descondensadores rápidos ($n= 40$) y (●) TUNEL- y descondensadores

lentos (n= 44). Las tasas de embarazo bioquímico y clínico y de nacidos vivos por transferencia para cada grupo se muestran en la Figura 83B.

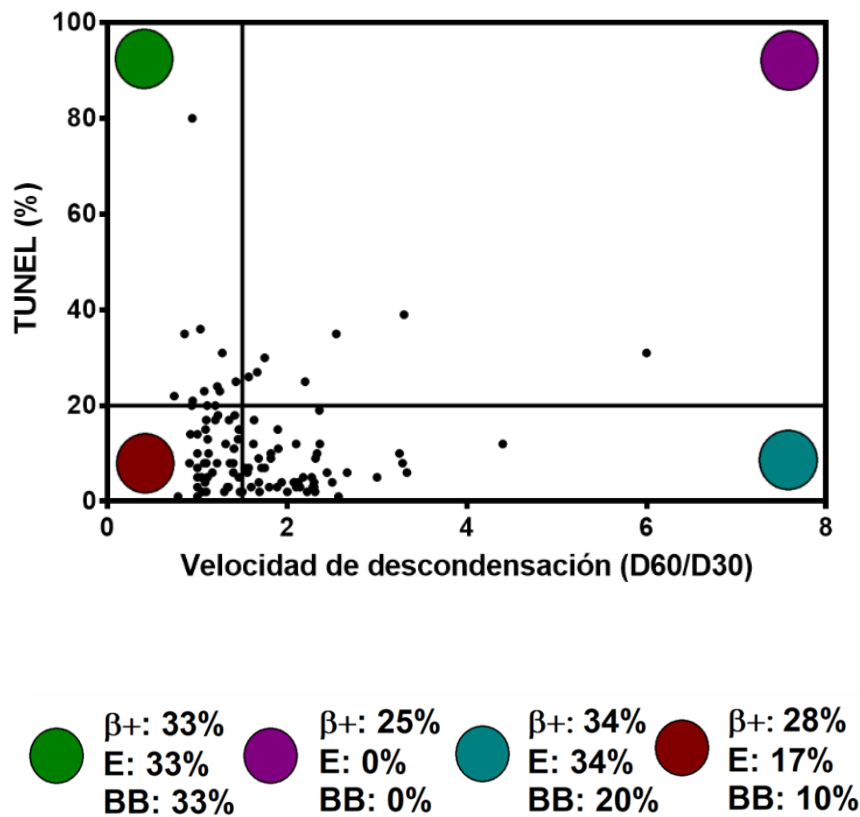


Figura 83. Velocidad de descondensación (D60/D30) vs TUNEL (%) para cada paciente. En el gráfico se observan los valores de TUNEL y D60/D30 para cada paciente. Se pueden identificar 4 grupos de pacientes según los valores de corte para cada parámetro (20% y 1,5 respectivamente). (●) TUNEL+ y DR (n=9, verde, cuadrante arriba a la izquierda). (●) TUNEL+ y DL (n=7, violeta, cuadrante arriba a la derecha). (●) TUNEL- y DR (n=40, rojo, cuadrante abajo a la izquierda). (●) TUNEL- y DL (n=44, azul, cuadrante abajo a la derecha). Para cada uno de los grupos se midió el éxito en FA como embarazo bioquímico (β+), embarazo clínico (E) y bebé nacido (BB) y fueron expresados por transferencia (Panel de abajo). No hubo diferencias significativas entre el éxito de FA y los grupos de pacientes (Test de Fisher).

Aunque no hubo diferencias significativas en la tasa de éxito con ICSI entre los cuatro grupos de pacientes (test exacto de Fisher, $p > 0,05$), aquellos pacientes que tuvieron valores anormales en ambos parámetros (es decir el grupo (●) TUNEL+ y descondensadores lentos) mostraron una tasa de éxito menor, comparados con los otros grupos; este fue el único grupo de pacientes en el que no se registraron embarazos clínicos o nacidos vivos.

Discusión

El espermatozoide humano transita por diferentes estadios desde que es formado en el testículo: madura en el epidídimo, es eyaculado e ingresa dentro del tracto reproductor femenino donde ocurrirá el proceso de capacitación. Este proceso es definido como la serie de eventos requeridos para que un espermatozoide eyaculado pueda fecundar a un oocito, y tiene lugar a lo largo del tracto reproductor femenino (Yeste et al., 2013).

El proceso de capacitación permite que, ante el estímulo adecuado, se dispare en el espermatozoide la reacción o exocitosis acrosomal, proceso durante el cual se fusionan la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática y se produce la liberación del contenido acrosomal (Hirohashi & Yanagimachi, 2018; Simons & Fauci, 2018; Visconti, 2009).

Con los antecedentes del laboratorio en el estudio de glicosaminoglicanos sulfatados y, en particular del papel del heparán sulfato en el proceso de descondensación de la cromatina espermática, se decidió investigar el papel que este GAG podría tener en los distintos eventos que tienen lugar durante el trayecto del espermatozoide post-eyaculación. Considerando que la literatura ya había demostrado que el HS media la interacción entre moléculas, como por ejemplo la incorporación del virus de HIV-1 (Ceballos et al., 2009) y que la entrada del virus HPV-16 al espermatozoide se produce por medio del Sindecin-1 (Foresta et al., 2011), fue de particular interés observar cómo se distribuye esta molécula en la membrana del espermatozoide humano y cuál podría ser su función en este tipo celular tan particular.

Localización del HS en el espermatozoide humano.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que los espermatozoides humanos poseen heparán sulfato en su superficie y que el porcentaje de espermatozoides con HS en la superficie disminuye a medida que estos transitan por los diferentes estadios post-eyaculación. Se observó que la localización de esta molécula en la membrana del espermatozoide está, en su mayoría, en el segmento ecuatorial, aunque se produce un ligero aumento en la cantidad de espermatozoides con HS en el acrosoma en los espermatozoides capacitados. Teniendo en cuenta la biogénesis del acrosoma, a partir del aparato de Golgi y que la síntesis de este glicosaminoglicano requiere de la coparticipación del tránsito vesicular intracelular (Golgi y retículo endoplásmico), resulta lógico imaginar una permanencia de esta molécula en la vesícula acrosomal, en particular en la membrana acrosomal interna.

Se encontró que la presencia de HS en la superficie del espermatozoide humano está relacionada con el estado de reacción (o exocitosis) acrosomal inducida con ionóforo de calcio, y que su distribución es diferente en espermatozoides reaccionados y no reaccionados. Esta presencia del HS en el segmento ecuatorial de espermatozoides humanos permitiría especular que el GAG podría estar involucrado en la interacción del espermatozoide con el oocito, dado que esta interacción se realiza precisamente a través del segmento ecuatorial.

Adicionalmente, se encontró en los espermatozoides incubados en condiciones capacitantes, un leve aumento de la marca de HS en el acrosoma, que luego desaparece en los espermatozoides con reacción acrosomal inducida. De esto puede suponerse que, de alguna manera al pasar de SUP a ICC, el HS en la membrana sufre una redistribución hacia el acrosoma y que, al perderse este tras la reacción acrosomal, en los espermatozoides RAI esa disminución resulta más evidente. Esto parece indicar que el HS expuesto después de la RA no se debería a la exposición de la membrana acrosomal interna.

La reacción acrosomal es un evento único en la vida del espermatozoide, caracterizado por la exocitosis del contenido acrosomal y la liberación de vesículas híbridas formadas por parches de membrana acrosomal externa y membrana plasmática. La misma puede observarse luego de la incubación durante varios minutos con inductores, como el ionóforo de calcio y la progesterona (Sosa et al., 2015). Independientemente del tipo de inductor presente, la RA es mediada por un aumento de calcio en el citoplasma que se da, entre otras cosas, por la apertura de los canales de calcio dependientes de inositol 1,4,5-trisfosfato (Li et al., 2019).

Con el fin de obtener un porcentaje mayor de espermatozoides reaccionados, se indujo la RA con ionóforo de calcio y, de este modo, se intentó evidenciar mejor las diferencias con los espermatozoides incubados en condiciones capacitantes. Si bien se conoce que la RA inducida con progesterona se asemeja más a lo que sucedería *in vivo* luego de la capacitación, también se sabe que tras la inducción con ionóforo de calcio, los cambios que se producen en la membrana tienen que ver con la RA y no con la apoptosis celular (Martin et al., 2005), lo que nos resultó de más utilidad para observar en una mayor cantidad de espermatozoides los cambios que se produjeron en la localización del HS.

Luego de la RA el espermatozoide cambia a un estado que lo hace competente para la fecundación. La RA remueve la membrana plasmática del capuchón acrosomal y expone una nueva membrana incluyendo el *performatorium* (Austin & Bishop, 1958). Algunos contenidos del acrosoma permanecen en el espermatozoide incluso después de la “exocitosis” (Kim et al.,

2001; Nakanishi et al., 2001). Los mecanismos involucrados en este proceso parecen recaer mayormente en la habilidad de algunas proteínas de modificar moléculas del citoesqueleto o de la membrana, así como el reordenamiento espacial de las proteínas acrosomales y de membrana. Considerando el gran número de proteínas que se han propuesto como partícipes en la adquisición de la fusogenicidad del SE, es probable que haya redundancia en sus funciones. La delección en simultáneo de más de una de estas moléculas podrá contribuir a comprender mejor los mecanismos a través de los cuales la RA prepara al espermatozoide para la fusión (Beltrán et al., 2016).

Los espermatozoides sufren la RA en la *ampulla* del oviducto, según se encontró en espermatozoides de cobayo (Yanagimachi & Mahi, 1976), de conejo (Overstreet & Cooper, 1979) y de bovino (Herz et al., 1985). En el ratón, se observó que los espermatozoides con el acrosoma intacto son capaces de alcanzar la región de la *ampulla* del oviducto después de la cópula (Chang & Suarez, 2012). Hay observaciones previas que indican que la mayoría de los espermatozoides reaccionados que ingresan en el oviducto, continúan con su vigoroso batido flagelar y, en un caso, un espermatozoide se abrió camino a través del *cumulus* en un complejo espiral hacia el oocito ovulado (Beltrán et al., 2016).

Los resultados obtenidos pusieron en evidencia un leve aumento en el número de espermatozoides que poseen HS en la membrana tras haber sido incubados en condiciones capacitantes, respecto a aquellos provenientes de SUP o los RAI. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la intensidad de fluorescencia por célula. Podría imaginarse que el HS pudo haberse perdido tras la RA y, en este caso, los espermatozoides inducidos (RAI) presentaron al HS en el segmento ecuatorial con igual intensidad que aquellos espermatozoides provenientes del SUP y los ICC.

Si bien se desestimó el número de espermatozoides que presentaron marca de HS en la porción terminal del flagelo, por encontrarse en una proporción muy pequeña, sin embargo se consideró un hallazgo interesante ya que es conocido que el HS puede asociarse a FGF/ RFGF que, como demostraron Saucedo y col. (2015), se encuentran presentes en la cola del espermatozoide y están involucrados en la motilidad del mismo. La formación del complejo FGF-FGFR-HS es necesaria para activar la señalización de FGF-2 e inducir la fosforilación de ERK 1 y 2 (Extracelular signal-Regulated Kinase). Se ha demostrado que una reducción en la sulfatación 6-O de HS, es crítica para la transducción de señales de FGF-2 (Yamada et al., 2017). Queda así abierta la

puerta para la investigación de un rol adicional del HS espermático durante el proceso reproductivo.

En los espermatozoides, la localización de proteínas y moléculas en la región acrosomal de la cabeza sugiere que las mismas están cumpliendo un rol como reguladores de los procesos de capacitación y reacción acrosomal (Leclerc & Goupil, 2000). Por lo tanto, nos parece interesante continuar estudiando la relación que tiene el HS con estos procesos.

El HS y la interacción del espermatozoide con los epitelios del tracto reproductor femenino.

Al analizar la interacción entre el espermatozoide humano y diferentes tipos celulares provenientes del tracto femenino humano *in vitro*, pudo concluirse que el HS y/o su receptor en el espermatozoide estarían involucrados tanto en la interacción con las células epiteliales del endometrio humano, como también en la interacción con las células epiteliales del istmo de la trompa de Falopio humana.

Los resultados obtenidos sugieren que en la interacción entre el espermatozoide y las células endometriales intervienen tanto el HS/RHS de la célula como el HS/RHS del espermatozoide. Si esto fuera así, se debería haber observado una disminución en la unión al eliminar el HS de las células ECC-1. Si bien, posiblemente por el número insuficiente de repeticiones, no se observó una diferencia significativa, los resultados obtenidos mostraron una fuerte tendencia en esta dirección, apoyando la idea de la necesidad de ambas moléculas (HS/RHS) entre ambos tipos celulares para asegurar una unión más estable.

Por lo que vimos hasta el momento en la bibliografía, no hay evidencia de la interacción doble entre HS/RHS de las células ECC-1 y los espermatozoides humanos.

En este punto, vale la pena aclarar que hubiera sido sin duda deseable realizar una curva de concentración de enzima y heparina a utilizar en los experimentos, para descartar la posibilidad de que los resultados obtenidos fueran consecuencia, en parte, del uso de concentraciones subóptimas de los reactivos. Sin embargo, las dificultades encontradas a la hora de poder establecer el cultivo primario de las células y el hecho que la cantidad de muestra de los pacientes solía ser pequeño como para permitir incluir en un mismo experimento un número ilimitado de condiciones, no hizo posible determinar en forma sistemática la concentración

óptima de cada uno de los reactivos, Hep y HASA. A pesar de ello, se observó una disminución significativa de la asociación de los espermatozoides a las células epiteliales, indicando que, pese a que no se pudo lograr un bloqueo total de la interacción, la concentración de Hep y HASA fue suficiente para provocar una disminución parcial de la misma.

En la bibliografía existe evidencia, en numerosas especies, de que la unión de espermatozoides al epitelio oviductal es mediada por reconocimiento de carbohidratos. Hay un gran número de polisacáridos, monosacáridos y glicoproteínas que se han encontrado como inhibidores competitivos de la unión de espermatozoides a células del epitelio oviductal o explantos de oviducto (Suarez, 2002). En porcinos, se demostró que la heparina está presente en el oviducto y que modula la actividad de las proteínas secretadas, que regulan los parámetros espermáticos (Batista et al., 2016).

Las secreciones presentes en el fluido oviductal afectan las funciones oocitarias y espermáticas (Killian, 2011; Mondéjar et al., 2013) y proteínas como glicodelinas y lactoferrina están involucradas en la interacción de gametos (Ghersevich et al., 2015; Zumoffen et al., 2015), y que las proteínas oviductina, osteopontina, C3 (importante para el desarrollo embrionario temprano) (Tse et al., 2008)); y la glicoproteína 1 (OVGP1), son importantes para la unión del espermatozoide a la ZP (Coy et al., 2012). Está descrito que la interacción entre los espermatozoides y las células epiteliales oviductales mantiene/mejora la motilidad (Murray & Smith, 1997; Yeung et al., 1994), preserva la viabilidad y la capacidad fecundante (Yeung et al., 1994; Zhu et al., 1994), mejora las tasas de fecundación de hombres infértiles (Kervancioglu et al., 1997), reduce el daño a la cromatina espermática (Ellington et al., 1998) y regula la capacitación del espermatozoide humano *in vivo* e *in vitro* (Murray & Smith, 1997; Zumoffen et al., 2010), también protege al mismo de las especies reactivas de oxígeno al activar enzimas antioxidantes como SOD y GPx (Huang et al., 2013).

La fucosiltransferasa-5, proteína que se encuentra en la región acrosomal del espermatozoide humano y es receptor de glicodelina y de glicoproteínas de ZP, está involucrada en la interacción espermatozoide-epitelio oviductal y tiene efectos beneficiosos para la capacidad fertilizante del espermatozoide humano que podrían ser útiles para el mejoramiento de la capacidad fecundante del espermatozoide en los tratamientos de fecundación asistida (Huang et al., 2015).

Todos los antecedentes hasta aquí mencionados invitan a postular que algo similar podría ocurrir con el HS presente tanto en la región acrosomal como en el segmento ecuatorial del espermatozoide humano y con el RHS presente en el espermatozoide, otorgando a este GAG un

rol significativo en la interacción del espermatozoide con las células epiteliales de la TF. Los resultados obtenidos en este trabajo llevarían a concluir que efectivamente esta interacción tendría lugar mediante un mecanismo de doble llave/cerradura, tal como se propuso en la hipótesis, tanto en la interacción del espermatozoide con las células endometriales como con las provenientes de la trompa de Falopio (Figura 84).

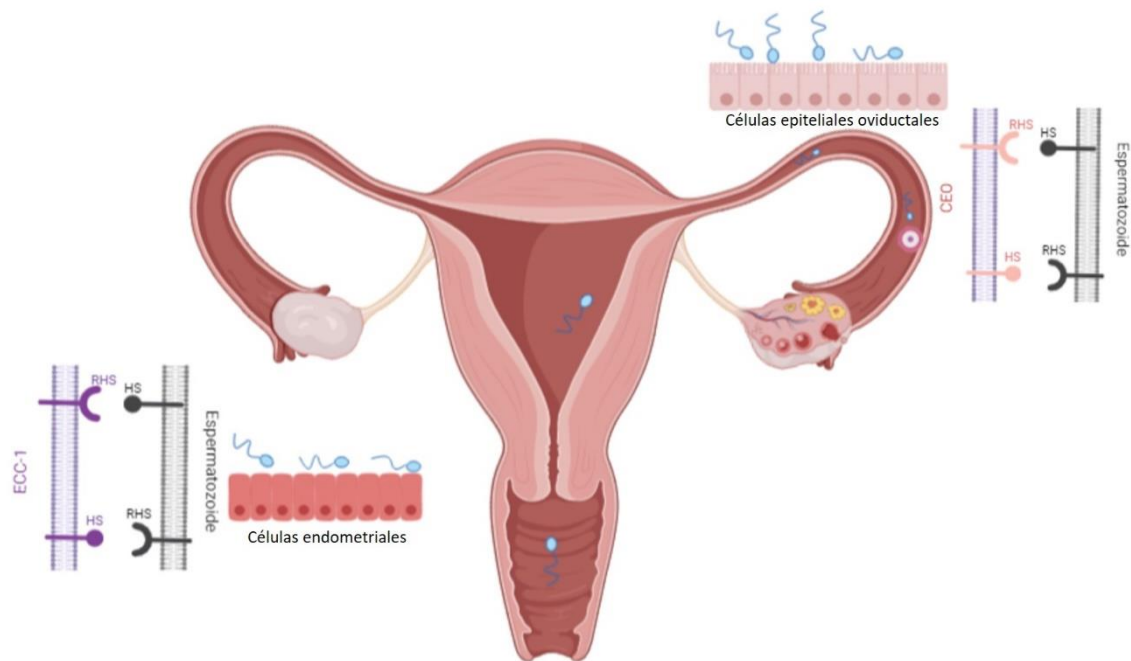


Figura 84. Esquema del modelo de doble cerradura propuesto en esta Tesis como posible interacción entre los espermatozoides y las células endometriales y de la trompa de Falopio humanas. Se puede observar en el esquema la doble interacción mediada por HS y el RHS.

Cabe enfatizar aquí que muy probablemente la falta de significancia en aquellos experimentos en los que se observó una marcada tendencia en la cantidad de espermatozoides unidos a las células luego de los pretratamientos correspondientes, haya sido consecuencia de un número mayor de repeticiones que no se pudieron realizar, debido tanto a la complejidad del sistema de cultivo como a las características intrínsecas del tejido tubario que, pese a todos los recaudos tomados para impedirlo, no siempre llegaba al laboratorio en las condiciones adecuadas para establecer el cultivo primario.

Si bien la utilización de muestras provenientes de pacientes, la posibilidad de establecer un cultivo primario y la disponibilidad de espermatozoides de donantes nos resultó sumamente útil para estudiar la interacción espermatozoide/epitelio, indudablemente resultaría mucho más enriquecedor contar con la posibilidad de establecer cultivos 3D o explantos. De esa manera, las células mantendrían la polarización natural y las observaciones se asemejarían más a lo que sucede *in vivo*. De todos modos y pese a las limitaciones mencionadas, los resultados obtenidos permitieron demostrar de que tanto el HS como el RHS están involucrados en la interacción

espermatozoide/epitelio, participando así en la formación del reservorio espermático en el istmo de la trompa de Falopio. Evidentemente, y tal como lo pone de manifiesto la cantidad de moléculas que se acaban demencionar, el sistema HS/RHS sería uno más de los tantos mecanismos redundantes que regulan esta interacción, tan importante para que el espermatozoide pueda lograr su cometido.

Otro sistema de interacción intercelular de doble llave-cerradura es el de las cadherinas, que casualmente han sido involucradas también en la interacción con el epitelio oviductal. La cadherina epitelial (E-cadherina) participa en la adhesión de células somáticas dependiente de calcio, la proteína de adaptación β -catenina se une al dominio citoplasmático de E-cadherina y vincula la adhesión de la proteína al citoesqueleto. Así como ocurre con el HS, se encontró E-cadherina en espermatozoides, oocitos, células del *cumulus* y células epiteliales oviductales. En los espermatozoides no capacitados con el acrosoma intacto, se encontró E-cadherina mayormente localizada en la región de la cresta apical y el capuchón acrosomal. Hay que tener en cuenta que los espermatozoides que se encuentran en el reservorio oviductal tienen acrosomas intactos y fueron clasificados en su mayoría como no capacitados. Luego del tratamiento con Hep para promover la capacitación, el porcentaje de espermatozoides que tenía esa distribución de E-cadherinas disminuyó significativamente. Al mismo tiempo que aumentaba el porcentaje de espermatozoides que poseían un patrón de marcación, pero ya habían perdido el acrosoma. Tras la inducción de la reacción acrosomal con L- α -lisofosfatidilcolina, se encontró E-cadherina en la membrana interna acrosomal. En los oocitos, se encontró E-cadherina en la membrana plasmática de las células del *cumulus* y de los propios oocitos. La distribución de β -catenina fue similar a la de E-cadherina en todos los tipos celulares analizados. Además, se demostró que al bloquear con anticuerpo a las E-cadherinas se veía afectada la unión de los espermatozoides a células oviductales, la penetración del COC y la tasa de fecundación *in vitro* (Caballero et al., 2014).

La motilidad vigorosa del espermatozoide es clave para la penetración de la interfase mucosa y la colonización del cérvix en aquellos animales que poseen inseminación vaginal (perros, conejos, rumiantes y primates) y es también necesaria para atravesar la región de la unión útero tubaria (UTJ, por sus siglas en inglés), la cual es una barrera en aquellos animales con inseminación uterina (cerdos, camélidos, equinos y muchos roedores), pudiendo ser el lugar donde se seleccionan los espermatozoides. Es importante aclarar que, la barrera de la unión útero tubaria es también para aquellas especies que eyaculan por vía vaginal.

La motilidad también tiene su papel al mantener los espermatozoides en suspensión en los fluidos del tracto reproductor femenino, reduciendo el alcance de adhesión al endometrio

(Hunter, 2012). Por esta razón, en el presente trabajo de Tesis, no se utilizaron espermatozoides incubados en condiciones capacitantes para este fin, evitando así la adquisición de la motilidad hiperactivada.

Tal como se mencionara en la Introducción, después de un apareo, hay una población de espermatozoides viables que se establece en la porción caudal del istmo denominada reservorio espermático funcional (Hunter, 1995; Hunter et al., 1980). Este lugar de almacenamiento contiene secreciones viscosas de glicoproteínas, donde los espermatozoides se mantienen durante el intervalo preovulatorio suprimiendo su motilidad, estabilizando la membrana plasmática y protegiéndose de las influencias de los fluidos uterinos y oviductales de la *ampulla*. Se ha observado que la incubación de células oviductales con espermatozoides, aumenta la supervivencia espermática, estabiliza el acrosoma y modifica la frecuencia del batido ciliar (Morales et al., 1996). Ya se ha dicho también que una liberación controlada de los espermatozoides unidos a las células epiteliales del istmo de la trompa de Falopio alrededor del tiempo de la ovulación, resulta en una relación espermatozoide:ocito en el sitio de fecundación aproximadamente de 1:1, minimizando así el riesgo de polispermia (Hunter, 2012).

En esta región restringida del oviducto, el contacto entre las células epiteliales y los espermatozoides, se ve facilitado a través de interacciones de la cabeza del espermatozoide con organelas del endosalpinx, primariamente las cilias pero, probablemente, también el *microvilli* (Kopecný & Fléchon, 1987). En una serie de experimentos *in vitro*, se sugirió que la fase de unión de los espermatozoides en el istmo caudal es esencial para la capacitación y la fecundación (Gervasi et al., 2009), no pareciendo ser el caso demostrado con experimentos *in vivo* (Hunter, 2011).

La proporción de células ciliadas en la *ampulla* es más alta alrededor del momento de la ovulación, aunque en el istmo no cambia a lo largo del ciclo estral en el oviducto bovino (Ito et al., 2016) y, en llamas se observó que hay más de un tipo de carbohidrato que participa en la formación del reservorio espermático (Apichela et al., 2010). Razón por la cual en los experimentos se utilizaron células provenientes del istmo de la TF.

En los experimentos realizados en este trabajo, las células ciliadas pudieron observarse y mantenerse en cultivos primarios, desapareciendo luego de la primera semana. La desventaja del cultivo primario es el alto riesgo de contaminación por fibroblastos. Las células epiteliales oviductales pueden permanecer en cultivo durante 6 a 8 semanas, sin embargo, se observó que su número no aumentaba después del día 10 (Kervancioglu et al., 1994), tiempo utilizado en los

experimentos de esta tesis doctoral para realizar los cocultivos. Se ha propuesto que el cultivo primario de células epiteliales puede resultar de valor potencial para estudiar el ambiente en el cual se produce el encuentro entre el oocito y el espermatozoide y, a su vez, ser una herramienta terapéutica útil a futuro, dado que se demostró que las células de la trompa de Falopio tienen la capacidad de promover la hiperactivación de los espermatozoides humanos (Kervancioglu et al., 1994).

Modelo murino (en ratón).

Las dificultades éticas que presentan los experimentos de interacción de gametas en el humano, despertaron interés en el laboratorio por profundizar nuestro conocimiento del modelo murino de ratón, en el cual ya se había descrito la presencia de HS en oocitos de ratón, pero no se había demostrado su presencia en el espermatozoide. Los resultados de los experimentos realizados en ratón en esta tesis permiten concluir que el HS se encuentra presente en el segmento ecuatorial del espermatozoide murino y que el mismo permanece, aunque en menor porcentaje, incluso después de la reacción acrosomal, tanto espontánea como inducida. Es la primera vez que se describe la presencia de HS en la región ecuatorial del espermatozoide de ratón y esta localización permite especular acerca de su posible participación en algunos de los procesos previos a la fecundación, tales como la interacción con el tracto oviductal, la interacción con las células del COC o con la ZP del oocito e, incluso, en la fusión con el oolema, a través del sistema HS/RHS.

Rol del HS espermático en el proceso de descondensación de la cromatina.

Tal como se explicara en la Introducción, la cromatina del espermatozoide humano se encuentra altamente condensada en forma de toroides. En el laboratorio se profundizó el estudio del proceso de descondensación de la cromatina espermática y se demostró que para que se produzca la descondensación de la cromatina y el concomitante intercambio de protaminas por histonas oocitarias eficientemente, es necesaria la acción del HS y GSH oocitarios de manera simultánea (Julianelli et al., 2012).

Si bien se demostró que el HS del oocito es responsable, junto con el GSH endógeno, de la descondensación espermática *in vivo*, el hecho de encontrar HS en la superficie del espermatozoide llevó a investigar si pudiera existir algún rol adicional para el mismo en el proceso de descondensación. Con este fin, se puso a punto el ensayo del micrométodo, que permite utilizar bajas concentraciones de reactivos para, de esta manera, observar la cinética de descondensación de los espermatozoides humanos utilizando extractos oocitarios murinos (por

la dificultad de obtener oocitos humanos y las consideraciones éticas asociadas a los experimentos que involucran ambos gametos), simulando lo que ocurriría *in vivo* una vez que el espermatozoide ingresa al oocito.

A partir de los resultados obtenidos se pudo concluir que el HS del espermatozoide humano no está involucrado en el proceso de descondensación nuclear y confirmar así que es el HS oocitario el único GAG responsable de la descondensación. Dichos resultados, se encuentran en concordancia con lo descrito recientemente por Kim y col. (2018), quienes hallaron que el HS sintetizado por el oocito es el responsable de la descondensación de la cromatina espermática inhibiendo la enzima Gas6, responsable de la primera modificación en la síntesis de HS (Kim et al., 2018).

La no participación del HS espermático en el proceso de descondensación por supuesto no invalida y, más aún, refuerza la idea de la participación del HS espermático en otros procesos previos a la descondensación. Dada la localización del HS sobre el segmento ecuatorial encontrada en este trabajo, tanto en espermatozoides humanos como murinos, resulta tentador especular que este GAG pueda actuar como una molécula de fusión (Brukman et al., 2019), sentando las bases para experimentos futuros de interacción espermatozoide oocito.

Una ventana hacia la clínica: descondensación en presencia de HS e infertilidad.

Hoy en día, a pesar de los numerosos intentos para optimizar el estudio de la funcionalidad de los gametos, la toma de decisiones en los laboratorios de reproducción asistida sigue siendo un proceso arduo tanto para médicos y pacientes. Indudablemente, dada la naturaleza tan compleja del proceso reproductivo, no existe un único análisis de la función de gametos que sea capaz de predecir el éxito de una TRA (Brown et al., 2016; Kavitha & Malini, 2014). Desde el punto de vista de un andrólogo y, en un intento de mejorar la comprensión de las causas que subyacen a la infertilidad masculina (Barratt et al., 2018), surge la necesidad de evaluar en la forma más integral posible la función espermática, focalizando los diferentes aspectos de la fisiología espermática.

El procedimiento más utilizado en las TRA es el ICSI, desarrollado por Palermo en el año 1992 y que, desde entonces, ha ido reemplazando a la fecundación *in vitro*, por su capacidad de sobrepasar todas las barreras que rodean al oocito. La inyección intracitoplasmática del espermatozoide en el oocito hace que cobren más relevancia los eventos que tienen lugar después de su entrada al mismo. Concomitantemente, cobran mayor importancia las técnicas que evalúan la funcionalidad del núcleo espermático. Se ha demostrado que anomalías

nucleares y de la cromatina del espermatozoide afectan negativamente la fertilidad, el desarrollo embrionario, la implantación y el embarazo (D'occhio et al., 2007; Palermo et al., 2014; Steger et al., 2008; Tarozzi et al., 2009; Tavalae et al., 2009). Se ha desarrollado un número importante de ensayos diagnósticos para evaluar anomalías cromosómicas y fragmentación del DNA en muestras de semen de pacientes bajo TRA, tales como unión de Cromomicina A3, traducción de cortes *in situ* (“*in situ* nick translation”), TUNEL, ensayo de cometa, análisis de estructura de la cromatina espermática, análisis de la relación de protaminas, evaluación de aneuploidías cromosómicas y ensayo de dispersión de cromatina (Palermo et al., 2014; Erenpreiss et al., 2006; Evgeni et al., 2014).

Nuestro laboratorio se ha dedicado al estudio de la descondensación *in vitro* de la cromatina espermática en humano y ratón, en presencia de Hep y GSH desde hace varios años. La descondensación espermática *in vitro*, en presencia de Hep y GSH, representa una manera fisiológica de inducir este proceso, dado que ambos reactivos han sido postulados como agentes descondensantes *in vivo* y las concentraciones utilizadas en el ensayo *in vitro* se encuentran dentro del rango fisiológico (Romanato et al., 2005; Romanato et al., 2003). Como ya se mencionara en la Introducción, datos preliminares, evaluando la cinética de descondensación *in vitro* de un pequeño grupo de pacientes infértiles (Gaubeca-Klix et al., 1998), revelaron que mediante el ensayo de descondensación en presencia de Hep/GSH es posible distinguir dos subgrupos de pacientes: descondensadores rápidos y lentos y que la pertenencia a uno u otro grupo no puede predecirse por un análisis de semen convencional.

El objetivo principal del estudio llevado a cabo en colaboración con la clínica PROCREARTE y que forma parte de esta tesis fue analizar si la capacidad para descondensar *in vitro* de los espermatozoides de hombres de parejas infértiles que realizan TRAs, se relaciona con el éxito en el tratamiento. Muchos estudios en la literatura han abordado el tema de la condensación y descondensación de la cromatina espermática; sin embargo, resta saber si existe alguna asociación entre estos parámetros y el éxito en un embarazo (Menezo et al., 2017; Tavalae et al., 2009). Asimismo, como en la clínica se utiliza de forma rutinaria el análisis de TUNEL para evaluar la fragmentación del DNA, resultó de interés determinar si los resultados de este análisis estaban relacionados con la capacidad descondensante del espermatozoide y con el éxito de TRA.

Los parámetros que analizan la descondensación *in vitro* del espermatozoide, tales como el porcentaje máximo de descondensación y la velocidad de descondensación, no correlacionaron entre sí o con el porcentaje de fecundación/clivaje, pero sí correlacionaron positivamente con

el “score” de calidad embrionaria (SE). Estos resultados sugieren que, si bien una descondensación anormal no impediría la fecundación o el clivaje, no puede descartarse un efecto negativo sobre el embrión que podría evidenciarse, posteriormente, durante el desarrollo embrionario (Cebesoy et al., 2006).

La evaluación de la cinética de descondensación permitió diferenciar, nuevamente, dos poblaciones de pacientes: descondensadores rápidos (DR), que adquieren la descondensación máxima luego de 30 minutos, al igual que lo hacen los donantes normozoospermicos, de los lentos (DL), que necesitan una incubación de, por lo menos, 60 minutos para alcanzar el máximo de descondensación. En principio, resultaría una característica positiva el pertenecer al grupo de descondensadores rápidos.

Las tasas de fecundación y de clivaje fueron similares en ambos grupos, pero la calidad embrionaria fue mejor en los descondensadores rápidos sugiriendo, una vez más, la posible existencia de un efecto negativo que se podría evidenciar más adelante en el desarrollo embrionario. La subfertilidad masculina ha sido asociada a fallas en la condensación de la cromatina espermática. Las tasas de embarazo aumentan en las muestras de espermatozoides que tienen una condensación normal de la cromatina y, una gran proporción de espermatozoides con una compactación normal de la cromatina, se ha asociado a un aumento en la tasa de clivaje embrionario temprano (Depa-Martynow et al., 2007; Irez et al., 2015b; Kazerooni et al., 2009).

Sorpresivamente, las tasas de embarazo bioquímico y clínico y las tasas de nacidos vivos fueron similares en descondensadores rápidos y lentos. Sin embargo, cuando se consideró la utilización de oocitos propios o donados, las tasas de embarazo bioquímico y clínico fueron similares entre ciclos con ovodonación o sin ella cuando los descondensadores eran rápidos, pero, en el caso de descondensadores lentos, ambos parámetros fueron significativamente mejores en los ciclos con ovodonación. Indudablemente, la mejor calidad de los oocitos donados, obtenidos de donantes jóvenes, podría dar cuenta de esta diferencia. A este respecto, es bien conocido que la capacidad que tiene el oocito para reparar el daño al DNA espermático (Bellver et al., 2010; Jin et al., 2015) disminuye con la edad. La tasa de nacidos vivos, aunque fueron tres veces más altas en los ciclos que utilizaron oocitos donados, no fue significativamente diferente, probablemente por el bajo número de pacientes en cada subgrupo. Estos resultados sugieren que ser descondensador lento, lo que es una característica negativa desde el punto de vista de este ensayo porque difiere de lo que sucede con los donantes voluntarios sanos, podría

convertirse en un inconveniente para el resultado de TRA si la calidad del oocito no es la adecuada para compensar exitosamente al espermatozoide deficiente.

Todavía existe controversia en la literatura acerca de la importancia del proceso de descondensación en el éxito en TRA. Mientras algunos autores mantienen que el resultado de ICSI no se encuentra influenciado por la condensación de la cromatina (Karydis et al., 2005), otros sugieren que no solamente ICSI sino, también la inseminación intrauterina resulta afectada por la capacidad descondensante del espermatozoide (Irez et al., 2015). La idea de que ser un descondensador lento podría tener un efecto negativo en el resultado de la TRA se hizo evidente también en nuestro estudio, cuando se toman en consideración los resultados de la fragmentación del DNA.

Los resultados de TUNEL no correlacionaron con los parámetros de descondensación, lo que sugiere que ambos ensayos están midiendo diferentes aspectos de la función nuclear espermática. Además, la mediana de los valores de TUNEL fue similar en descondensadores rápidos y lentos, como también lo fue el porcentaje de pacientes con TUNEL positivo en ambos grupos, sugiriendo también que no existe relación entre ambos parámetros. Sin embargo, al considerar en simultáneo los valores de la velocidad de descondensación (lento/rápido) y el resultado de TUNEL (+/-) para cada paciente en forma individual, no se observó embarazo clínico y, por consiguiente, no hubo nacidos vivos en aquellos sujetos que fueron a la vez descondensadores lentos y TUNEL+. Estos resultados sugieren que la combinación de dos parámetros negativos vinculados con la funcionalidad nuclear, en este caso la fragmentación del DNA (TUNEL+) y la cinética de descondensación (descondensación lenta), pueden perjudicar el éxito en TRA. Debido al bajo número de pacientes en este grupo, resultante de la distribución de esta cohorte de pacientes según sus valores individuales de TUNEL y velocidad de descondensación, no fue posible comparar los resultados entre aquellos que utilizaron oocitos de donantes (n=5) y los que no (n=2); indudablemente, es tentador especular que incluso los oocitos de buena calidad no serían capaces de compensar los defectos espermáticos muy severos.

Es notable que los resultados de TUNEL no correlacionaron ni con la tasa de clivaje ni con la calidad embrionaria y que, los grupos TUNEL+ y TUNEL- tuvieron tasas de embarazo y de nacidos vivos similares, lo que se suma a la ya existente controversia sobre la utilidad del TUNEL como una medida de la fertilidad en TRA (Henkel et al., 2003; Pacey, 2018b; Simon et al., 2017). Sin embargo, los resultados obtenidos con esta cohorte de pacientes sugieren que la combinación del TUNEL con la descondensación nuclear *in vitro*, podría proveer una evaluación más

comprensiva de la funcionalidad del núcleo del espermatozoide y, entonces, ser de utilidad en la estimación del éxito de un TRA. Es así como los pacientes que, además de tener una fragmentación del DNA espermático anormalmente alta, mostraran una cinética de descondensación de la cromatina espermática anormalmente lenta, parecerían tener bajas probabilidades de éxito en las TRA.

No debe olvidarse que, para que tenga lugar una fecundación exitosa, debe encontrarse no solo un espermatozoide funcional sino, además, un oocito que también lo sea (“se necesitan dos para el tango”). Así, no se puede esperar predecir el resultado de una TRA utilizando únicamente parámetros que midan, exclusivamente la funcionalidad del espermatozoide. Aún así, el desarrollo de estudios funcionales novedosos que apunten directamente a la función espermática colabora para determinar con mayor precisión los defectos de la función espermática y, en consecuencia, entender mejor su contribución a las fallas en el embarazo.

El ensayo de descondensación *in vitro* utilizado en este trabajo de Tesis es fácil de realizar, reproducible, con muy buena relación costo-beneficio y diseñado sobre bases fisiológicas firmes; atributos todos que lo convierten en una excelente opción de estudio complementario al momento de estudiar al paciente que concurre a un consultorio de medicina reproductiva.

En resumen, aunque este estudio deba considerarse todavía como piloto, siendo necesario realizar la validación de estos resultados con una cohorte diferente y más numerosa de pacientes, es la primera vez que se presenta evidencia de que evaluar la capacidad de descondensación del espermatozoide *in vitro* con Hep y GSH podría ser una herramienta diagnóstica útil en el laboratorio de Andrología y contribuir al proceso de toma de decisiones, al momento de elegir la técnica de reproducción asistida a utilizar.

Conclusión.

En conclusión, este trabajo de tesis doctoral estudió la molécula de heparán sulfato como posible ligando en la interacción entre el espermatozoide y células del tracto reproductor femenino, en particular una línea celular de endometrio y células epiteliales de trompa de Falopio humana. Para ello, primero se analizó la presencia de este glicosaminoglicano sobre la superficie del espermatozoide, encontrándose una distribución bastante específica en el segmento ecuatorial, tanto en espermatozoides humanos como murinos. En instancias de capacitación y/o reacción (exocitosis) acrosomal, esta molécula permanecía en una buena proporción de espermatozoides, indicativo de una posible función en su interacción con el oocito. Se pudo demostrar que para la interacción entre las células endometriales y de la trompa de Falopio, son necesarios tanto el HS como su receptor específico en los tipos celulares interactuantes (endometrio-espermatozoide y trompa de Falopio-espermatozoide), en un posible modelo de doble cerradura que aseguraría una buena unión. Esto podría contribuir al reservorio espermático encontrado a lo largo del camino del espermatozoide hacia el oocito. Habiendo demostrado la presencia de HS sobre la superficie del espermatozoide, se estudió su posible papel en la descondensación de la cromatina, utilizando oocitos de ratón y espermatozoides humanos, demostrándose que no participa en la misma, sino que es el HS presente en el interior oocitario la molécula actuante.

Finalmente, en lo que puede considerarse como el mayor logro de este trabajo de tesis doctoral, se pudo establecer a la metodología de descondensación del núcleo espermático *in vitro*, en condiciones fisiológicas, como una posible herramienta diagnóstica para ser utilizada en centros de reproducción asistida, dado que permitió distinguir dos grupos de pacientes, según la velocidad de descondensación de sus muestras de semen y, de este modo, sugerir que pacientes con descondensación lenta podrían beneficiarse con programas de ovodonación. Además, si en forma conjunta se analiza la fragmentación del DNA espermático (TUNEL), se puede predecir una posibilidad de éxito muy pobre ante la combinación de una velocidad de descondensación lenta y un TUNEL+.

En síntesis, este trabajo de tesis doctoral otorga más relevancia al papel del heparán sulfato como molécula importante en reproducción y resulta en la primera indicación de la posible utilización de una herramienta *in vitro*, fácilmente aplicable en un centro de fertilidad, con posible utilidad en el diagnóstico andrológico a la hora de toma de decisiones para el paciente y el profesional.

Bibliografía consultada

- Agarwal, A., Nallella, K. P., Allamaneni, S. S. R., & Said, T. M. (2004). Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive Biomedicine Online*, 8(6), 616–627. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61641-0](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61641-0)
- Alikani, M. (1993). Micromanipulation of human gametes for assisted fertilization. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 5(5), 594–599. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8241434>
- Apichela, S. A., Valz-Gianinet, J. N., Schuster, S., Jiménez-Díaz, M. A., Roldán-Olarte, E. M., & Miceli, D. C. (2010). Lectin binding patterns and carbohydrate mediation of sperm binding to llama oviductal cells in vitro. *Animal Reproduction Science*, 118(2–4), 344–353. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.07.008>
- Ardon, F., Markello, R. D., Hu, L., Deutsch, Z. I., Tung, C.-K., Wu, M., & Suarez, S. S. (2016). Dynamics of Bovine Sperm Interaction with Epithelium Differ Between Oviductal Isthmus and Ampulla. *Biology of Reproduction*, 95(4), 90–90. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.140632>
- Arpanahi, A., Brinkworth, M., Iles, D., Krawetz, S. A., Paradowska, A., Platts, A. E., ... Miller, D. (2009). Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Research*, 19(8), 1338–1349. <https://doi.org/10.1101/gr.094953.109>
- Auger, J., Schoevaert, D., Negulesco, I., & Dadoune, J. P. (1993). The nuclear status of human sperm cells by TEM image cytometry: nuclear shape and chromatin texture in semen samples from fertile and infertile men. *Journal of Andrology*, 14(6), 456–463. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8294230>
- Austin, C. R., & Bishop, M. W. (1958). Some features of the acrosome and perforatorium in mammalian spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 149(935), 234–240. <https://doi.org/10.1098/rspb.1958.0065>
- Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A., & Coy, P. (2010). Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Molecular Human Reproduction*, 16(12), 896–906. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq056>
- Baccetti, B., & Afzelius, B. A. (1976). The biology of the sperm cell. *Monographs in Developmental Biology*, (10), 1–254. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1107820>
- Baillie, H. S., Pacey, A. A., Warren, M. A., Scudamore, I. W., & Barratt, C. L. R. (1997). Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla. *Human Reproduction*, 12(9), 1985–1992. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.9.1985>
- Balhorn, R., Corzett, M., Mazrimas, J., Stanker, L. H., & Wyrobek, A. (1987). High-performance liquid chromatographic separation and partial characterization of human protamines 1, 2, and 3. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 9(1), 82–88. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3566922>
- Balhorn, R., Reed, S., & Tanphaichitr, N. (1988). Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia*, 44(1), 52–55. <https://doi.org/10.1007/bf01960243>
- Balhorn, Rod. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology*, 8. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-227>
- Barbosa Mendes, A., do Nascimento, C. C., & D’Almeida, V. (2019). Sexual behaviour in a murine model of mucopolysaccharidosis type I (MPS I). *PLoS One*, 14(12), e0220429–e0220429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220429>
- Barney, G. H., Orgebin-Crist, M. C., & Macapinalac, M. P. (1968). Genesis of esophageal parakeratosis and histologic changes in the testes of the zinc-deficient rat and their reversal by zinc repletion. *The Journal of Nutrition*, 95(4), 526–534. <https://doi.org/10.1093/jn/95.4.526>

- Barratt, C. L. (1995). On the accuracy and clinical value of semen laboratory tests. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *10*(2), 250–252. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a135923>
- Batista, R. I. T. P., Moro, L. N., Corbin, E., Alminana, C., Souza-Fabjan, J. M. G., de Figueirêdo Freitas, V. J., & Mermillod, P. (2015). Combination of oviduct fluid and heparin to improve monospermic zygotes production during porcine in vitro fertilization. *Theriogenology*, *86*(2), 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.031>
- Batista, R. I. T. P., Moro, L. N., Corbin, E., Alminana, C., Souza-Fabjan, J. M. G., de Figueirêdo Freitas, V. J., & Mermillod, P. (2016). Combination of oviduct fluid and heparin to improve monospermic zygotes production during porcine in vitro fertilization. *Theriogenology*, *86*(2), 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.031>
- Bedford, J. M. (1998). Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biology of reproduction*, *59*(6), 1275–1287.
- Bedford, J. M., Bent, M. J., & Calvin, H. (1973). Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, *33*(1), 19–29. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0330019>
- Bedford, J. M., & Calvin, H. I. (1974). Changes in -S-S- linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observations in sub-mammalian species. *The Journal of Experimental Zoology*, *187*(2), 181–204. <https://doi.org/10.1002/jez.1401870202>
- Bedford, J. M., & Hoskins, D. D. (1990). *The mammalian spermatozoa: morphology, biochemistry and physiology*. 2.
- Bellin, M. E., Ax, R. L., Laufer, N., Tarlatzis, B. C., DeCherney, A. H., Feldberg, D., & Haseltine, F. P. (1986). Glycosaminoglycans in follicular fluid from women undergoing in vitro fertilization and their relationship to cumulus expansion, fertilization, and development. *Fertility and Sterility*, *45*(2), 244–248. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)49162-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)49162-4)
- Bellvé, A. R., McKay, D. J., Renaux, B. S., & Dixon, G. H. (1988). Purification and characterization of mouse protamines P1 and P2. Amino acid sequence of P2. *Biochemistry*, *27*(8), 2890–2897. <https://doi.org/10.1021/bi00408a034>
- Bellver, J., Ayllón, Y., Ferrando, M., Melo, M., Goyri, E., Pellicer, A., ... Meseguer, M. (2010). Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertility and Sterility*, *93*(2), 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.032>
- Belokopytova, I. A., Kostyleva, E. I., Tomilin, A. N., & Vorob'ev, V. I. (1993). Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. *Molecular Reproduction and Development*, *34*(1), 53–57. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080340109>
- Beltrán, C., Treviño, C. L., Mata-Martínez, E., Chávez, J. C., Sánchez-Cárdenas, C., Baker, M., & Darszon, A. (2016). Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization. *Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization*, *220*, 145–158. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-30567-7>
- Bench, G., Corzett, M. H., Kramer, C. E., Grant, P. G., & Balhorn, R. (2000). Zinc is sufficiently abundant within mammalian sperm nuclei to bind stoichiometrically with protamine 2. *Molecular Reproduction and Development*, *56*(4), 512–519. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200008\)56:4<512::AID-MRD9>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200008)56:4<512::AID-MRD9>3.0.CO;2-M)
- Benchbaib, M., Braun, V., Ressenkoff, D., Lornage, J., Durand, P., Niveleau, A., & Guérin, J. F. (2005). Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *20*(3), 768–773. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh684>
- Bergqvist, A. S., & Rodríguez-Martínez, H. (2006). Sulphated glycosaminoglycans (S-GAGs) and syndecans in the bovine oviduct. *Animal Reproduction Science*, *93*(1–2), 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.029>

- Bernal, A., Torres, J., Reyes, A., & Rosado, A. (1980). Presence and regional distribution of sialyl transferase in the epididymis of the rat. *Biology of Reproduction*, *23*(2), 290–293. <https://doi.org/10.1095/biolreprod23.2.290>
- Bernfield, M., Götte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., & Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annual Review of Biochemistry*, *68*, 729–777. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.729>
- Bertolesi, G. E., Lauría de Cidre, L., & Eiján, A. M. (1994). Growth inhibition in vitro of murine mammary adenocarcinoma cells by heparin and chemically modified heparins. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *15*(5), 275–283. <https://doi.org/10.1159/000217902>
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., & Wright, G. J. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*, *508*(7497), 483–487. <https://doi.org/10.1038/nature13203>
- Björndahl, L., Kjellberg, S., Roomans, G. M., & Kvist, U. (1986). The human sperm nucleus takes up zinc at ejaculation. *International Journal of Andrology*, *9*(1), 77–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1986.tb00869.x>
- Björndahl, Lars, & Kvist, U. (2010). Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Molecular Human Reproduction*, *16*(1), 23–29. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap099>
- Björndahl, Lars, & Kvist, U. (2011). A model for the importance of zinc in the dynamics of human sperm chromatin stabilization after ejaculation in relation to sperm DNA vulnerability. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *57*(1–2), 86–92. <https://doi.org/10.3109/19396368.2010.516306>
- Bobardt, M. D., Chatterji, U., Selvarajah, S., Van der Schueren, B., David, G., Kahn, B., & Gallay, P. A. (2007). Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells. *Journal of Virology*, *81*(1), 395–405. <https://doi.org/10.1128/JVI.01303-06>
- Bower, P. A., Yelick, P. C., & Hecht, N. B. (1987). Both P1 and P2 protamine genes are expressed in mouse, hamster, and rat. *Biology of Reproduction*, *37*(2), 479–488. <https://doi.org/10.1095/biolreprod37.2.479>
- Brackett, B. G., & Oliphant, G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction*, *12*(2), 260–274. <https://doi.org/10.1095/biolreprod12.2.260>
- Brewer, L., Corzett, M., & Balhorn, R. (2002). *Condensation of DNA by Spermatid Basic Nuclear Proteins**. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204755200>
- Brewis, I. A., Clayton, R., Barratt, C. L., Hornby, D. P., & Moore, H. D. (1996). Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, *2*(8), 583–589. <https://doi.org/10.1093/molehr/2.8.583>
- Brown, S. G., Publicover, S. J., Mansell, S. A., Lishko, P. V., Williams, H. L., Ramalingam, M., ... Da Silva, S. M. (2016). Depolarization of sperm membrane potential is a common feature of men with subfertility and is associated with low fertilization rate at IVF. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *31*(6), 1147–1157. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew056>
- Brukman, Nicolas G., Uygur, B., Podbilewicz, B., & Chernomordik, L. V. (2019). How cells fuse. *Journal of Cell Biology*, *218*(5), 1436–1451. <https://doi.org/10.1083/jcb.201901017>
- Brukman, Nicolás Gastón, Nuñez, S. Y., Puga Molina, L. D. C., Buffone, M. G., Darszon, A., Cuasnicu, P. S., & Da Ros, V. G. (2019). Tyrosine phosphorylation signaling regulates Ca²⁺ entry by affecting intracellular pH during human sperm capacitation. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(4), 5276–5288. <https://doi.org/10.1002/jcp.27337>
- Buffone, M. G., Hirohashi, N., & Gerton, G. L. (2014). Unresolved questions concerning Mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Biology of reproduction*, *90*(5), 112. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.117911>

- Bülow, H. E., & Hobert, O. (2006). The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22, 375–407. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010605.093433>
- Caballero-Campo, P., Chirinos, M., Fan, X. J., González-González, M. E., Galicia-Chavarría, M., Larrea, F., & Gerton, G. L. (2006). Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function. *Biology of Reproduction*, 74(4), 760–768. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.047522>
- Caballero, J. N., Gervasi, M. G., Veiga, M. F., Dalvit, G. C., Perez-Martínez, S., Cetica, P. D., & Vazquez-Levin, M. H. (2014). Epithelial cadherin is present in bovine oviduct epithelial cells and gametes, and is involved in fertilization-related events. *Theriogenology*, 81(9), 1189–1206. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.028>
- Cabrol, D., Dallot, E., Cedard, L., & Sureau, C. (1985). Pregnancy-related changes in the distribution of glycosaminoglycans in the cervix and corpus of the human uterus. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 20(5), 289–295. [https://doi.org/10.1016/0028-2243\(85\)90139-x](https://doi.org/10.1016/0028-2243(85)90139-x)
- Caglar, G. S., Hammadeh, M., Asimakopoulos, B., Nikolettos, N., Diedrich, K., & Al-Hassani, S. (2005). In vivo and in vitro decondensation of human sperm and assisted reproduction technologies. *In Vivo*, 19(3), 623–630.
- Calvin, H. I., & Bedford, J. M. (1971). Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 13, Suppl 13:65-75.
- Calvo, L., Vantman, D., Banks, S. M., Tezon, J., Koukoulis, G. N., Dennison, L., & Sherins, R. J. (1989). Follicular fluid-induced acrosome reaction distinguishes a subgroup of men with unexplained infertility not identified by semen analysis. *Fertility and Sterility*, 52(6), 1048–1054. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)53173-2](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)53173-2)
- Canel, N. G., Romanato, M., Suva, M., Calvo, L., Salamone, D., & Calvo, J. C. (2016). Heparan Sulfate is involved in nuclear sperm decondensation after fertilization in bovine. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(1) 181-181. Recuperado de <https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1071/RDv29n1Ab146>
- Canel, Natalia Gabriela, Bevacqua, R. J., Hiriart, M. I., Rabelo, N. C., de Almeida Camargo, L. S., Romanato, M., ... Salamone, D. F. (2017). Sperm pretreatment with heparin and l-glutathione, sex-sorting, and double cryopreservation to improve intracytoplasmic sperm injection in bovine. *Theriogenology*, 93, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.018>
- Cano-Gauci, D. F., Song, H. H., Yang, H., McKerlie, C., Choo, B., Shi, W., ... Filmus, J. (1999). Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *The Journal of Cell Biology*, 146(1), 255–264. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.1.255>
- Ceballos, A., Remes Lenicov, F., Sabatté, J., Rodríguez Rodríguez, C., Cabrini, M., Jancic, C., ... Geffner, J. (2009). Spermatozoa capture HIV-1 through heparan sulfate and efficiently transmit the virus to dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(12), 2717–2733. <https://doi.org/10.1084/jem.20091579>
- Cebesoy, F. B., Aydos, K., & Unlu, C. (2006). Effect of sperm chromatin damage on fertilization ratio and embryo quality post-ICSI. *Archives of Andrology*, 52(5), 397–402. <https://doi.org/10.1080/01485010600666953>
- Chang, H., & Suarez, S. S. (2012). Unexpected flagellar movement patterns and epithelial binding behavior of mouse sperm in the oviduct. *Biology of Reproduction*, 86(5), 140–148. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.096578>
- Chavarría, M. E., & Reyes, A. (1996). Secretions of ovine uterus and oviduct induce in vitro capacitation of ram spermatozoa. *Archives of Andrology*, 36(1), 17–23.

<https://doi.org/10.3109/01485019608987880>

- Cho, B. N., McMullen, M. L., Pei, L., Yates, C. J., & Mayo, K. E. (2001). Reproductive deficiencies in transgenic mice expressing the rat inhibin alpha-subunit gene. *Endocrinology*, *142*(11), 4994–5004. <https://doi.org/10.1210/endo.142.11.8481>
- Claw, K. G., George, R. D., & Swanson, W. J. (2014). Detecting coevolution in mammalian sperm-egg fusion proteins. *Molecular Reproduction and Development*, *81*(6), 531–538. <https://doi.org/10.1002/mrd.22321>
- Cohen, M., & Varki, A. (2010). The sialome--far more than the sum of its parts. *Omics : A Journal of Integrative Biology*, *14*(4), 455–464. <https://doi.org/10.1089/omi.2009.0148>
- Colombe, S., Houllier, L., Fleurot, E., Levallet, G., Benhaim, A., Bonnamy, P.-J., & Levallet, J. (2017). Syndecan 1 represses cell growth and FSH responsiveness in human granulosa cells. *Reproduction (Cambridge, England)*, *153*(6), 797–808. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0074>
- Corzett, M., Mazrimas, J., & Balhorn, R. (2002). Protamine 1: Protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Molecular Reproduction and Development*, *61*(February 2001), 519–527. <https://doi.org/10.1002/mrd.10105>
- Costello, S., Michelangeli, F., Nash, K., Lefievre, L., Morris, J., Machado-Oliveira, G., ... Publicover, S. (2009). Ca²⁺-stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction (Cambridge, England)*, *138*(3), 425–437. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0134>
- Coy, P., García-Vázquez, F. A., Visconti, P. E., & Avilés, M. (2012). Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction (Cambridge, England)*, *144*(6), 649–660. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0279>
- Cuasnicú, P. S., Ellerman, D. A., Cohen, D. J., Busso, D., Morgenfeld, M. M., & Da Ros, V. G. (2001). Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. *Archives of Medical Research*, *32*(6), 614–618. [https://doi.org/10.1016/s0188-4409\(01\)00321-6](https://doi.org/10.1016/s0188-4409(01)00321-6)
- D'occhio, M. J., Hengstberger, K. J., & Johnston, S. D. (2007). Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Animal Reproduction Science*, *101*(101), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.01.005>
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiological Reviews*, *91*(4), 1305–1355. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2010>
- De Agostini, A. I. (2006). An unexpected role for anticoagulant heparan sulfate proteoglycans in reproduction. *Swiss Medical Weekly*, *136*(37–38), 583–590. <https://doi.org/10.4414/smw.2006.11368>
- de Lamirande, E., Leclerc, P., & Gagnon, C. (1997). Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular human reproduction*, *3*(3), 175–194.
- De Vries, M., Ramos, L., Housein, Z., & De Boer, P. (2012). Chromatin remodelling initiation during human spermiogenesis. *Biology Open*, *1*(5), 446–457. <https://doi.org/10.1242/bio.2012844>
- de Yebra, L., Balleascà, J. L., Vanrell, J. A., Bassas, L., & Oliva, R. (1993). Complete selective absence of protamine P2 in humans. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(14), 10553–10557. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8486708>
- Delgado, N. M., Reyes, R., Huacuja, L., Merchant, H., & Rosado, A. (1982). Heparin binding sites in the human spermatozoa membrane. *Archives of Andrology*, *8*(2), 87–95. <https://doi.org/10.3109/01485018208987024>
- Demott, R. P., & Suarez, S. S. (1992). Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biology of reproduction*, *46*(5), 779–785. <https://doi.org/10.1095/biolreprod46.5.779>

- Depa-Martynow, M., Jedrzejczak, P., & Pawelczyk, L. (2007). Pronuclear scoring as a predictor of embryo quality in in vitro fertilization program. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 45 Suppl 1, S85–S89. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292842>
- Diekman, A. B. (2003). Glycoconjugates in sperm function and gamete interactions: how much sugar does it take to sweet-talk the egg? *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 60(2), 298–308. <https://doi.org/10.1007/s000180300025>
- Ellerman, D. A., Cohen, D. J., Da Ros, V. G., Morgenfeld, M. M., Busso, D., & Cuasnicú, P. S. (2006). Sperm protein “DE” mediates gamete fusion through an evolutionarily conserved site of the CRISP family. *Developmental Biology*, 297(1), 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.013>
- Ellington, J. E., Evenson, D. P., Fleming, J. E., Brisbois, R. S., Hiss, G. A., Broder, S. J., & Wright Jr, R. W. (1998). Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. *Fertility and Sterility*, 69(4), 643–649. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(98\)00023-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(98)00023-5)
- Erenpreiss, J., Spano, M., Erenpreisa, J., Bungum, M., & Giwercman, A. (2006). Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian Journal of Andrology*, 8(1), 11–29. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2006.00112.x>
- Eriksen, G. V., Malmström, A., & Ulbjerg, N. (1997). Human follicular fluid proteoglycans in relation to in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 68(5), 791–798. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)00326-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)00326-9)
- Escoffier, J., Yassine, S., Lee, H. C., Martinez, G., Delaroche, J., Coutton, C., ... Arnoult, C. (2015). Subcellular localization of phospholipase C ζ in human sperm and its absence in DPY19L2-deficient sperm are consistent with its role in oocyte activation. *Molecular Human Reproduction*, 21(2), 157–168. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau098>
- Evgeni, E., Charalabopoulos, K., & Asimakopoulos, B. (2014). Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *Journal of Reproduction & Infertility*, 15(1), 2–14. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24696791>
- Fazeli, A. (2008). Maternal communication with gametes and embryos. *Theriogenology*, 70(8), 1182–1187. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.010>
- Feyerabend, T. B., Li, J.-P., Lindahl, U., & Rodewald, H.-R. (2006). Heparan sulfate C5-epimerase is essential for heparin biosynthesis in mast cells. *Nature Chemical Biology*, 2(4), 195–196. <https://doi.org/10.1038/nchembio777>
- Filipponi, D., & Feil, R. (2009). Perturbation of genomic imprinting in oligozoospermia. *Epigenetics*, 4(1), 27–30. <https://doi.org/10.4161/epi.4.1.7311>
- Fléchon, J.-E. (2015). The acrosome of eutherian mammals. *Cell and Tissue Research*, (Bedford 2014). <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2238-0>
- Flesch, F. M., & Gadella, B. M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 1469(3), 197–235. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00018-6)
- Foresta, C., Patassini, C., Bertoldo, A., Menegazzo, M., Francavilla, F., Barzon, L., & Ferlin, A. (2011). Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS ONE*, 6(3), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015036>
- Gahlay, G., Gauthier, L., Baibakov, B., Epifano, O., & Dean, J. (2010). Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg’s zona pellucida protein. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5988), 216–219. <https://doi.org/10.1126/science.1188178>
- Galotto, C. (2015). *Descondensación cromatínica del espermatozoides humano: función del heparán sulfato y posibles implicancias clínicas*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

- Galotto, C., Cambiasso, M. Y., Julianelli, V. L., Valzacchi, G. J. R., Rolando, R. N., Rodriguez, M. L., ... Romanato, M. (2019). Human sperm decondensation in vitro is related to cleavage rate and embryo quality in IVF. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*.
<https://doi.org/10.1007/s10815-019-01590-y>
- Garénaux, E., Kanagawa, M., Tsuchiyama, T., Hori, K., Kanazawa, T., Goshima, A., ... Kitajima, K. (2015). Discovery, primary, and crystal structures and capacitation-related properties of a prostate-derived heparin-binding protein WGA16 from boar sperm. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(9), 5484–5501. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.635268>
- Gaubeca-Klix, E., Marin-Briggiler, C., Cameo, M., & Calvo, L. (1998). In vitro sperm nuclear decondensation in the presence of heparin/ glutathione distinguishes two subgroups of infertile patients not identified by conventional semen analysis. *Treatment of infertility: the new Frontiers (abstract book)*, Abstract PO-51.
- Gelbaya, T. A., Potdar, N., Jevé, Y. B., & Nardo, L. G. (2014). Definition and epidemiology of unexplained infertility. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 69(2), 109–115.
<https://doi.org/10.1097/OGX.0000000000000043>
- Georgiou, A. S., Sostaric, E., Wong, C. H., Snijders, A. P. L., Wright, P. C., Moore, H. D., & Fazeli, A. (2005). Gametes alter the oviductal secretory proteome. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 4(11), 1785–1796. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500119-MCP200>
- Germeyer, A., Klinkert, M. S., Huppertz, A.-G., Clausmeyer, S., Popovici, R. M., Strowitzki, T., & von Wolff, M. (2007). Expression of syndecans, cell-cell interaction regulating heparan sulfate proteoglycans, within the human endometrium and their regulation throughout the menstrual cycle. *Fertility and Sterility*, 87(3), 657–663. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.07.1526>
- Gervasi, M. G., Rapanelli, M., Ribeiro, M. L., Farina, M., Billi, S., Franchi, A. M., & Perez Martinez, S. (2009). The endocannabinoid system in bull sperm and bovine oviductal epithelium: role of anandamide in sperm-oviduct interaction. *Reproduction (Cambridge, England)*, 137(3), 403–414.
<https://doi.org/10.1530/REP-08-0204>
- Ghersevich, S., Massa, E., & Zumoffen, C. (2015). Oviductal secretion and gamete interaction. *Reproduction*, 149(1), R1–R14. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0145>
- Gilks, C. B., Reid, P. E., Clement, P. B., & Owen, D. A. (1989). Histochemical changes in cervical mucus-secreting epithelium during the normal menstrual cycle. *Fertility and Sterility*, 51(2), 286–291.
[https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)60492-2](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)60492-2)
- Grasa, P., Coward, K., Young, C., & Parrington, J. (2008). The pattern of localization of the putative oocyte activation factor, phospholipase C ζ , in uncapacitated, capacitated, and ionophore-treated human spermatozoa. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 23(11), 2513–2522.
<https://doi.org/10.1093/humrep/den280>
- Grunewald, S., Reinhardt, M., Blumenauer, V., Said, T. M., Agarwal, A., Abu Hmeidan, F., ... Paasch, U. (2009). Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertility and Sterility*, 92(2), 572–577.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.07.1705>
- Gualtieri, R., Mollo, V., Barbato, V., & Talevi, R. (2010a). Ability of sulfated glycoconjugates and disulfide-reductants to release bovine epididymal sperm bound to the oviductal epithelium in vitro. *Theriogenology*, 73(8), 1037–1043. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.030>
- Gualtieri, R., Mollo, V., Barbato, V., & Talevi, R. (2010b). Ability of sulfated glycoconjugates and disulfide-reductants to release bovine epididymal sperm bound to the oviductal epithelium in vitro. *Theriogenology*, 73(8), 1037–1043. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.030>
- Gupta, S. K. (2018). The Human Egg's Zona Pellucida. *Current Topics in Developmental Biology*, 130, 379–411. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.01.001>
- Gupta, S. K., Bhandari, B., Shrestha, A., Biswal, B. K., Palaniappan, C., Malhotra, S. S., & Gupta, N. (2012).

- Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell and Tissue Research*, 349(3), 665–678. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1319-y>
- Gusse, M., Sautière, P., Bélaiche, D., Martinage, A., Roux, C., Dadoune, J. P., & Chevallier, P. (1986). Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochimica et Biophysica Acta*, 884(1), 124–134. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(86\)90235-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(86)90235-7)
- Hagner-McWhirter, A., Lindahl, U., & Li, J. p. (2000). Biosynthesis of heparin/heparan sulphate: mechanism of epimerization of glucuronyl C-5. *The Biochemical Journal*, 347 Pt 1(Pt 1), 69–75. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10727403>
- HajMohammadi, S., Enjyoji, K., Princivalle, M., Christi, P., Lech, M., Beeler, D., ... Shworak, N. W. (2003). Normal levels of anticoagulant heparan sulfate are not essential for normal hemostasis. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(7), 989–999. <https://doi.org/10.1172/JCI15809>
- Hamilton, T. R. S., Simões, R., Mendes, C. M., Goissis, M. D., Nakajima, E., Martins, E. A. L., ... Assumpção, M. E. O. A. (2019). Detection of protamine 2 in bovine spermatozoa and testicles. *Andrology*, 7(3), 373–381. <https://doi.org/10.1111/andr.12610>
- Hao, S.-L., Ni, F.-D., & Yang, W.-X. (2019). The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene*, 706, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.027>
- Harper, C. V, Barratt, C. L. R., Publicover, S. J., & Kirkman-Brown, J. C. (2006). Kinetics of the progesterone-induced acrosome reaction and its relation to intracellular calcium responses in individual human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 75(6), 933–939. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.054627>
- Harper, C. V, Cummerson, J. A., White, M. R. H., Publicover, S. J., & Johnson, P. M. (2008). Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 13), 2130–2135. <https://doi.org/10.1242/jcs.030379>
- Henkel, R., Franken, D. R., & Habenicht, U. F. (1998). Zona pellucida as physiological trigger for the induction of acrosome reaction. *Andrologia*, 30(4–5), 275–280. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1998.tb01171.x>
- Henkel, R., Maass, G., Hajimohammad, M., Menkveld, R., Staf, T., Villegas, J., ... Schill, W.-B. (2003). Urogenital inflammation: changes of leucocytes and ROS. *Andrologia*, 35(5), 309–313. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14535861>
- Herz, Z., Northey, D., Lawyer, M., & First, N. L. (1985). Acrosome reaction of bovine spermatozoa in vivo: sites and effects of stages of the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 32(5), 1163–1168. <https://doi.org/10.1095/biolreprod32.5.1163>
- Hino, T., & Yanagimachi, R. (2019). Active peristaltic movements and fluid production of the mouse oviduct: their roles in fluid and sperm transport and fertilization†. *Biology of reproduction*, 101(1), 40–49. <https://doi.org/10.1093/biolre/iz0061>
- Hirohashi, N., & Yanagimachi, R. (2018). Sperm acrosome reaction: its site and role in fertilization. *Biology of Reproduction*, 99(1), 127–133. <https://doi.org/10.1093/biolre/iy045>
- Ho, H. C., & Suarez, S. S. (2001). Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*, 122(4), 519–526. <https://doi.org/10.1530/reprod/122.4.519>
- Howes, L., & Jones, R. (2002). Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *Journal of Reproductive Immunology*, 53(1–2), 181–192. [https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(01\)00101-2](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(01)00101-2)
- Huang, Venus W., Zhao, W., Lee, C. L., Lee, C. Y. L., Lam, K. K. W., Ko, J. K. Y., ... Chiu, P. C. N. (2013). Cell membrane proteins from oviductal epithelial cell line protect human spermatozoa from oxidative damage. *Fertility and Sterility*, 99(5), 1444–1452.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.056>

- Huang, Venus Wenxin, Lee, C.-L., Lee, Y.-L., Lam, K. K. W., Ko, J. K. Y., Yeung, W. S. B., ... Chiu, P. C. N. (2015). Sperm fucosyltransferase-5 mediates spermatozoa-oviductal epithelial cell interaction to protect human spermatozoa from oxidative damage. *Molecular Human Reproduction*, *21*(6), 516–526. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav015>
- Hunter, R. H. (1995). Human sperm reservoirs and Fallopian tube function: a rôle for the intra-mural portion? *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, *74*(9), 677–681. <https://doi.org/10.3109/00016349509021173>
- Hunter, R. H. F. (2011). Sperm head binding to epithelium of the oviduct isthmus is not an essential preliminary to mammalian fertilization - review. *Zygote (Cambridge, England)*, *19*(3), 265–269. <https://doi.org/10.1017/S0967199410000341>
- Hunter, R. H. F. (2012). Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biological Reviews*, *87*(1), 244–255. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2011.00196.x>
- Hunter, R. H., Nichol, R., & Crabtree, S. M. (1980). Transport of spermatozoa in the ewe: timing of the establishment of a functional population in the oviduct. *Reproduction, Nutrition, Developpement*, *20*(6), 1869–1875. <https://doi.org/10.1051/rnd:19801013>
- Inhorn, M. C., & Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update*, *21*(4), 411–426. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016>
- Inki, P. (1997). Expression of syndecan-1 in female reproductive tract tissues and cultured keratinocytes. *Molecular Human Reproduction*, *3*(4), 299–305. <https://doi.org/10.1093/molehr/3.4.299>
- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., & Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, *434*(7030), 234–238. <https://doi.org/10.1038/nature03362>
- Inoue, N., Satouh, Y., Ikawa, M., Okabe, M., & Yanagimachi, R. (2011). Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(50), 20008–20011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116965108>
- Irez, T., Sahmay, S., Ocal, P., Goymen, A., Senol, H., Erol, N., ... Guralp, O. (2015). Investigation of the association between the outcomes of sperm chromatin condensation and decondensation tests, and assisted reproduction techniques. *Andrologia*, *47*(4), 438–447. <https://doi.org/10.1111/and.12286>
- Ito, S., Kobayashi, Y., Yamamoto, Y., Kimura, K., & Okuda, K. (2016). Remodeling of bovine oviductal epithelium by mitosis of secretory cells. *Cell and Tissue Research*, *366*(2), 403–410. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2432-8>
- Jackson, J. A., Friberg, A. C., & Bahr, J. M. (1991). Preovulatory changes in glycosaminoglycans and collagen content in the stigma region of the follicle of the domestic hen. *Biology of Reproduction*, *45*(2), 301–307. <https://doi.org/10.1095/biolreprod45.2.301>
- Jenkins, T. G., Aston, K. I., Meyer, T. D., Hotaling, J. M., Shamsi, M. B., Johnstone, E. B., ... Carrell, D. T. (2016). Decreased fecundity and sperm DNA methylation patterns. *Fertility and Sterility*, *105*(1), 51-7.e73. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.09.013>
- Jin, J.-X., Kang, J.-D., Li, S., Jin, L., Zhu, H.-Y., Guo, Q., ... Yin, X.-J. (2015). PXD101 significantly improves nuclear reprogramming and the in vitro developmental competence of porcine SCNT embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *456*(1), 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.11.051>
- Jones, M. J., Goodman, S. J., & Kobor, M. S. (2015). DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell*, *14*(6), 924–932. <https://doi.org/10.1111/accel.12349>
- Julianelli, V., Farrando, B., Alvarez Sedó, C., Calvo, L., Romanato, M., & Calvo, J. C. (2012). Heparin

- enhances protamine disulfide bond reduction during in vitro decondensation of human spermatozoa. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27(7), 1930–1938. <https://doi.org/10.1093/humrep/des139>
- Julianelli, V. L., Romanato, M., Valzacchi, G. J. R., Rolando, R. N., Rodriguez, M. L., Arenas, G., ... Calvo, J. (2013). *Evaluación de la capacidad descondensante in vitro de espermatozoides humanos y su relación con el éxito en reproducción asistida*. Cancún, México.
- Karydis, S., Asimakopoulou, B., Papadopoulou, N., Vakalopoulos, I., Al-Hasani, S., & Nikolettos, N. (2005). ICSI outcome is not associated with the incidence of spermatozoa with abnormal chromatin condensation. *In Vivo (Athens, Greece)*, 19(5), 921–925. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16097447>
- Kavitha, P., & Malini, S. S. (2014). Positive association of sperm dysfunction in the pathogenesis of recurrent pregnancy loss. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(11), OC07-OC10. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/9109.5172>
- Kazerooni, T., Asadi, N., Jadid, L., Kazerooni, M., Ghanadi, A., Ghaffarpasand, F., ... Zolghadr, J. (2009). Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26(11–12), 591–596. <https://doi.org/10.1007/s10815-009-9361-3>
- Kelly, F. D., Tawia, S. A., & Rogers, P. A. (1995). Immunohistochemical characterization of human endometrial microvascular basement membrane components during the normal menstrual cycle. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 10(2), 268–276. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a135927>
- Kerns, K., Zigo, M., & Sutovsky, P. (2018). Zinc: A Necessary Ion for Mammalian Sperm Fertilization Competency. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 4097. <https://doi.org/10.3390/ijms19124097>
- Kervancioglu, M. E., Saridogan, E., Atasü, T., Camlibel, T., Demircan, A., Sarikamis, B., & Djahanbakhch, O. (1997). Human Fallopian tube epithelial cell co-culture increases fertilization rates in male factor infertility but not in tubal or unexplained infertility. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 12(6), 1253–1258. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.6.1253>
- Kervancioglu, M. E., Saridogan, E., Martin, J. E., Maguiness, S. D., & Djahanbakhch, O. (1994). A simple technique for the long-term non-polarised and polarised culture of human fallopian tube epithelial cells. *Biology of the Cell*, 82(2–3), 103–107. [https://doi.org/10.1016/s0248-4900\(94\)80012-x](https://doi.org/10.1016/s0248-4900(94)80012-x)
- Killian, G. (2011). Physiology and endocrinology symposium: evidence that oviduct secretions influence sperm function: a retrospective view for livestock. *Journal of Animal Science*, 89(5), 1315–1322. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3349>
- Kim, E., Park, K.-E., Kim, J.-S., Baek, D. C., Lee, J.-W., Lee, S.-R., ... Chang, K.-T. (2009). Importance of the porcine ADAM3 disintegrin domain in sperm-egg interaction. *The Journal of Reproduction and Development*, 55(2), 156–162. <https://doi.org/10.1262/jrd.20134>
- Kim, K. H., Kim, E. Y., Lee, S. Y., Ko, J. J., & Lee, K. A. (2018). Oocyte Cytoplasmic Gas6 and Heparan Sulfate (HS) are Required to Establish the Open Chromatin State in Nuclei during Remodeling and Reprogramming. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45(1), 37–53. <https://doi.org/10.1159/000486221>
- Kim, K. S., Cha, M. C., & Gerton, G. L. (2001). Mouse sperm protein sp56 is a component of the acrosomal matrix. *Biology of Reproduction*, 64(1), 36–43. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.1.36>
- Kirchhoff, C., & Hale, G. (1996). Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Molecular Human Reproduction*, 2(3), 177–184. <https://doi.org/10.1093/molehr/2.3.177>
- Kolk, A. H., & Samuel, T. (1975). Isolation, chemical and immunological characterization of two strongly

- basic nuclear proteins from human spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta*, 393(2), 307–319. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(75\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0005-2795(75)90057-4)
- Kopečný, V., & Fléchon, J. E. (1987). Ultrastructural localization of labeled acrosomal glycoproteins during in vivo fertilization in the rabbit. *Gamete Research*, 17(1), 35–42. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120170105>
- Kornbluth, S., & Fissore, R. (2015). Vertebrate Reproduction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(10), a006064–a006064. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006064>
- Kumar, N., & Singh, A. K. (2015). Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 8(4), 191–196. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.170370>
- Kundu, T. K., Satyanarayana Rao, M. R., Tp, S. P., & Rao, M. R. S. (1996). Zinc dependent recognition of a human CpG island sequence by the mammalian spermatidal protein TP2. *Biochemistry*, 35(49), 15626–15632. <https://doi.org/10.1021/bi961271i>
- Kuzan, F. B., Fleming, A. D., & Seidel Jr, G. E. (1984). Successful fertilization in vitro of fresh intact oocytes by perivitelline (acrosome-reacted) spermatozoa of the rabbit. *Fertility and Sterility*, 41(5), 766–770. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)47847-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)47847-7)
- Lai, T.-H., King, J. A., Shih, I.-M., Vlahos, N. F., & Zhao, Y. (2007). Immunological localization of syndecan-1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Fertility and Sterility*, 87(1), 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.06.042>
- Lamy, J., Labas, V., Harichaux, G., Tsikis, G., Mermillod, P., & Saint-Dizier, M. (2016). Regulation of the bovine oviductal fluid proteome. *Reproduction (Cambridge, England)*, 152(6), 629–644. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0397>
- Laqqan, M., Ahmed, I., Yasin, M., Hammadeh, M. E., & Maged, Y. (2019). Influence of variation in global sperm DNA methylation level on the expression level of protamine genes and human semen parameters. *Andrologia*, (October), 1–8. <https://doi.org/10.1111/and.13484>
- Laqqan, M., Tierling, S., Alkhaled, Y., LoPorto, C., & Hammadeh, M. E. (2017). Alterations in sperm DNA methylation patterns of oligospermic males. *Reproductive Biology*, 17(4), 396–400. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.10.007>
- Lassalle, B., & Testart, J. (1991). Sequential transformations of human sperm nucleus in human egg. *Journal of Reproduction and Fertility*, 91(2), 393–402. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0910393>
- Lázaro-Peña, M. I., Díaz-Balzac, C. A., Bülow, H. E., & Emmons, S. W. (2018). Synaptogenesis Is Modulated by Heparan Sulfate in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 209(1), 195–208. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300837>
- Leclerc, P., & Goupil, S. (2000). Distribution and localization of calmodulin-binding proteins in bull spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 62(6), 1875–1881. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.6.1875>
- Leese, H J, Tay, J. I., Reischl, J., & Downing, S. J. (2001). Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction (Cambridge, England)*, 121(3), 339–346. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210339>
- Leese, Henry J, Hugentobler, S. A., Gray, S. M., Morris, D. G., Sturmey, R. G., Whitear, S.-L., & Sreenan, J. M. (2008). Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reproduction, Fertility, and Development*, 20(1), 1–8. <https://doi.org/10.1071/rd07153>
- Lenz, R. W., Ax, R. L., Grimek, H. J., & First, N. L. (1982). Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 106(4), 1092–1098. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(82\)91224-4](https://doi.org/10.1016/0006-291x(82)91224-4)

- Lévesque, D., Veilleux, S., Caron, N., & Boissonneault, G. (1998). Architectural DNA-binding properties of the spermatidal transition proteins 1 and 2. *Biochemical and biophysical research communications*, 252(3), 602–609. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9687>
- Li, Y.-Y., Jia, Y.-P., Duan, L.-Y., & Li, K.-M. (2019). Participation of the inositol 1,4,5-trisphosphate-gated calcium channel in the zona pellucida- and progesterone-induced acrosome reaction and calcium influx in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, 10.4103/aja.aja_44_19. https://doi.org/10.4103/aja.aja_44_19
- Lin, X., Buff, E. M., Perrimon, N., & Michelson, A. M. (1999). Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during *Drosophila* embryonic development. *Development (Cambridge, England)*, 126(17), 3715–3723. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10433902>
- Luque, G. M., Dalotto-Moreno, T., Martín-Hidalgo, D., Ritagliati, C., Puga Molina, L. C., Romarowski, A., ... Buffone, M. G. (2018). Only a subpopulation of mouse sperm displays a rapid increase in intracellular calcium during capacitation. *Journal of Cellular Physiology*, 233(12), 9685–9700. <https://doi.org/10.1002/jcp.26883>
- Ma, F., Wu, D., Deng, L., Secret, P., Zhao, J., Varki, N., ... Gagneux, P. (2012). Sialidases on mammalian sperm mediate deciduous sialylation during capacitation. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(45), 38073–38079. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.380584>
- Mahmoud, A. I., & Parrish, J. J. (1996). Oviduct fluid and heparin induce similar surface changes in bovine sperm during capacitation: a flow cytometric study using lectins. *Molecular Reproduction and Development*, 43(4), 554–560. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199604\)43:4<554::AID-MRD19>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199604)43:4<554::AID-MRD19>3.0.CO;2-Z)
- Martin, G., Sabido, O., Durand, P., & Levy, R. (2005). Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20(12), 3459–3468. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei245>
- McKay, D. J., Renaux, B. S., & Dixon, G. H. (1985). The amino acid sequence of human sperm protamine P1. *Bioscience Reports*, 5(5), 383–391. <https://doi.org/10.1007/bf01116555>
- McLachlan, R. I., & O'Bryan, M. K. (2010). Clinical Review#: State of the art for genetic testing of infertile men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(3), 1013–1024. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1925>
- McNutt, T. L., & Killian, G. J. (1991). Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. *Journal of Andrology*, 12(4), 244–252. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1917690>
- Medeiros, C. M., & Parrish, J. J. (1996). Changes in lectin binding to bovine sperm during heparin-induced capacitation. *Molecular Reproduction and Development*, 44(4), 525–532. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199608\)44:4<525::AID-MRD12>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199608)44:4<525::AID-MRD12>3.0.CO;2-X)
- Menez, Y., Clement, P., & Amar, E. (2017). Evaluation of sperm DNA structure, fragmentation and decondensation: an essential tool in the assessment of male infertility. *Translational Andrology and Urology*, 6(Suppl 4), S553–S556. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.03.11>
- Meslin, C., Plakke, M. S., Deutsch, A. B., Small, B. S., Morehouse, N. I., & Clark, N. L. (2015). Digestive organ in the female reproductive tract borrows genes from multiple organ systems to adopt critical functions. *Molecular Biology and Evolution*, 32(6), 1567–1580. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv048>
- Meyer-Ficca, M. L., Lonchar, J. D., Ihara, M., Bader, J. J., & Meyer, R. G. (2013). Alteration of poly(ADP-ribose) metabolism affects murine sperm nuclear architecture by impairing pericentric heterochromatin condensation. *Chromosoma*, 122(4), 319–335. <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0416-y>
- Misell, L. M., Holochwost, D., Boban, D., Santi, N., Shefi, S., Hellerstein, M. K., & Turek, P. J. (2006). A

- stable isotope-mass spectrometric method for measuring human spermatogenesis kinetics in vivo. *The Journal of Urology*, 175(1), 242–246. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)00053-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)00053-4)
- Mo, B., Vendrov, A. E., Palomino, W. A., DuPont, B. R., Apparao, K. B. C., & Lessey, B. A. (2006). ECC-1 Cells: A Well-Differentiated Steroid-Responsive Endometrial Cell Line with Characteristics of Luminal Epithelium1. *Biology of Reproduction*, 75(3), 387–394. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.051870>
- Molina, L. C. P., Luque, G. M., Balestrini, P. A., Marín-Briggiler, C. I., Romarowski, A., & Buffone, M. G. (2018). Molecular basis of human sperm capacitation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(July), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00072>
- Mondéjar, I., Avilés, M., & Coy, P. (2013). The human is an exception to the evolutionarily-conserved phenomenon of pre-fertilization zona pellucida resistance to proteolysis induced by oviductal fluid. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 28(3), 718–728. <https://doi.org/10.1093/humrep/des423>
- Montjean, D., Ravel, C., Benkhalifa, M., Cohen-Bacrie, P., Berthaut, I., Bashamboo, A., & McElreavey, K. (2013). Methylation changes in mature sperm deoxyribonucleic acid from oligozoospermic men: assessment of genetic variants and assisted reproductive technology outcome. *Fertility and Sterility*, 100(5), 1241–1247. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.06.047>
- Morales, P., Palma, V., Salgado, A. M., & Villalon, M. (1996). Sperm interaction with human oviductal cells in vitro. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 11(7), 1504–1509. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019426>
- Morales, P., palma, V., Salgado, M., & Villalon, M. (1996). Fertilization and early embryology: Sperm interaction with human oviductal cells in vitro. *Human Reproduction*, 11(7), 1504–1509. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019426>
- Moros-Nicolás, C., Fouchécourt, S., Goudet, G., & Monget, P. (2018). Genes Encoding Mammalian Oviductal Proteins Involved in Fertilization are Subjected to Gene Death and Positive Selection. *Journal of Molecular Evolution*, 86(9), 655–667. <https://doi.org/10.1007/s00239-018-9878-0>
- Muratori, M., & De Geyter, C. (2019). Chromatin condensation, fragmentation of DNA and differences in the epigenetic signature of infertile men. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 33(1), 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.10.004>
- Murray, S. C., & Smith, T. T. (1997). Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation. *Fertility and Sterility*, 68(2), 351–357. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(97\)81528-2](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(97)81528-2)
- Myles, D. G., & Primakoff, P. (1997). Why did the sperm cross the *cumulus*? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biology of Reproduction*, 56(2), 320–327. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.2.320>
- Nakanishi, T., Ikawa, M., Yamada, S., Toshimori, K., & Okabe, M. (2001). Alkalinization of acrosome measured by GFP as a pH indicator and its relation to sperm capacitation. *Developmental Biology*, 237(1), 222–231. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0353>
- Nakanishi, Tomoko, Isotani, A., Yamaguchi, R., Ikawa, M., Baba, T., Suarez, S. S., & Okabe, M. (2004). Selective passage through the uterotubal junction of sperm from a mixed population produced by chimeras of calmegin-knockout and wild-type male mice. *Biology of Reproduction*, 71(3), 959–965. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028647>
- Nelson, S. M., & Greer, I. A. (2008). The potential role of heparin in assisted conception. *Human Reproduction Update*, 14(6), 623–645. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn031>
- Neto, F. T. L., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., & Goldstein, M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 59, 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.04.009>

- Oehninger, S., Mahony, M. C., Swanson, J. R., & Hodgen, G. D. (1993). The specificity of human spermatozoa/zona pellucida interaction under hemizona assay conditions. *Molecular Reproduction and Development*, 35(1), 57–61. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080350110>
- Okabe, M. (2016). The Acrosome Reaction: A Historical Perspective. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 220, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30567-7_1
- Oliva, R., & Dixon, G. H. (1991). Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 40, 25–94. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(08\)60839-9](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60839-9)
- Oliva, Rafael. (2006). Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*, 12(4), 417–435. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml009>
- Olszewska, M., Barciszewska, M. Z., Fraczek, M., Huleyuk, N., Chernykh, V. B., Zastavna, D., ... Kurpisz, M. (2017). Global methylation status of sperm DNA in carriers of chromosome structural aberrations. *Asian Journal of Andrology*, 19(1), 117–124. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.168684>
- Overstreet, J. W., & Cooper, G. W. (1979). The time and location of the acrosome reaction during sperm transport in the female rabbit. *The Journal of Experimental Zoology*, 209(1), 97–104. <https://doi.org/10.1002/jez.1402090112>
- Pacey, A. (2018). Is sperm DNA fragmentation a useful test that identifies a treatable cause of male infertility? *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 53, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.09.003>
- Palermo, G. D., Neri, Q. V., Cozzubbo, T., & Rosenwaks, Z. (2014). Perspectives on the assessment of human sperm chromatin integrity. *Fertility and Sterility*, 102(6), 1508–1517. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.10.008>
- Pandya, I. J., & Cohen, J. (1985). The leukocytic reaction of the human uterine cervix to spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 43(3), 417–421. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)48442-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)48442-6)
- Parrington, J., Arnoult, C., & Fissore, R. A. (2019). The eggstraordinary story of how life begins. En *Molecular Reproduction and Development* (Vol. 86). <https://doi.org/10.1002/mrd.23083>
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A., & First, N. L. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction*, 38(5), 1171–1180. <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.5.1171>
- Pérez-Cerezales, S., Laguna-Barraza, R., De Castro, A. C., Sánchez-Calabuig, M. J., Cano-Oliva, E., De Castro-Pita, F. J., ... Gutiérrez-Adán, A. (2018). Sperm selection by thermotaxis improves ICSI outcome in mice. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21335-8>
- Perreault, S. D., Barbee, R. R., Elstein, K. H., Zucker, R. M., & Keefer, C. L. (1988a). Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vitro by flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 39(1), 157–167. <https://doi.org/10.1095/biolreprod39.1.157>
- Perreault, S. D., Barbee, R. R., & Slott, V. L. (1988b). Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Developmental Biology*, 125(1), 181–186. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(88\)90070-x](https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90070-x)
- Perreault, S. D., Naish, S. J., & Zirkin, B. R. (1987). The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content. *Biology of Reproduction*, 36(1), 239–244. <https://doi.org/10.1095/biolreprod36.1.239>
- Perreault, S. D., Wolff, R. A., & Zirkin, B. R. (1984). The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Developmental Biology*, 101(1), 160–167. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(84\)90126-x](https://doi.org/10.1016/0012-1606(84)90126-x)
- Plant, T., & Zeleznik, A. (2015). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 2684. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2011-1-07288-0>

- Ploutarchou, P., Melo, P., Day, A. J., Milner, C. M., & Williams, S. A. (2015). Molecular analysis of the cumulus matrix: Insights from mice with O-glycan-deficient oocytes. *Reproduction*, *149*(5), 533–543. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0503>
- Pollard, J. W., Plante, C., King, W. A., Hansen, P. J., Betteridge, K. J., & Suarez, S. S. (1991). Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. *Biology of Reproduction*, *44*(1), 102–107. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.1.102>
- Pollow, K., Inthraphuvasak, J., Grill, H. J., & Manz, B. (1982). Estradiol and progesterone binding components in the cytosol of normal human fallopian tubes. *Journal of Steroid Biochemistry*, *16*(3), 429–435. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(82\)90056-5](https://doi.org/10.1016/0022-4731(82)90056-5)
- Pongsawasdi, P., & Svasti, J. (1976). The heterogeneity of the protamines from human spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta*, *434*(2), 462–473. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(76\)90236-1](https://doi.org/10.1016/0005-2795(76)90236-1)
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., & Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, *258*(5536), 598–599. <https://doi.org/10.1038/258598a0>
- Potter, S. W., & Morris, J. E. (1992). Changes in histochemical distribution of cell surface heparan sulfate proteoglycan in mouse uterus during the estrous cycle and early pregnancy. *The Anatomical Record*, *234*(3), 383–390. <https://doi.org/10.1002/ar.1092340308>
- Poulain, F. E., & Yost, H. J. (2015). Heparan sulfate proteoglycans: a sugar code for vertebrate development? *Development (Cambridge, England)*, *142*(20), 3456–3467. <https://doi.org/10.1242/dev.098178>
- Pradeepa, M. M., & Rao, M. R. S. (2007). Chromatin remodeling during mammalian spermatogenesis: role of testis specific histone variants and transition proteins. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, *63*, 1–10. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17566256>
- Quintero, I., Ghersevich, S., Caille, A., Muncue, M. J., Daniele, S. M., & Morisoli, L. (2005). Effects of human oviductal in vitro secretion on spermatozoa and search of sperm-oviductal proteins interactions. *International Journal of Andrology*, *28*(3), 137–143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00525.x>
- Rahman, N. A., Bennink, H. J. T. C., Chrusciel, M., Sharp, V., Zimmerman, Y., Dina, R., ... Huhtaniemi, I. (2012). A novel treatment strategy for ovarian cancer based on immunization against zona pellucida protein (ZP) 3. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *26*(1), 324–333. <https://doi.org/10.1096/fj.11-192468>
- Reyes, R., Magdaleno, V. M., Hernández, O., Rosado, A., & Delgado, N. M. (1983). Effect of zinc on decondensation of human spermatozoa nuclei by heparin. *Archives of Andrology*, *10*(2), 155–160. <https://doi.org/10.3109/01485018308987557>
- Reyes, R., Rosado, A., Hernández, O., & Delgado, N. M. (1989). Heparin and glutathione: physiological decondensing agents of human sperm nuclei. *Gamete Research*, *23*(1), 39–47. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120230105>
- Rockwell, P. L., & Storey, B. T. (2000). Kinetics of onset of mouse sperm acrosome reaction induced by solubilized zona pellucida: fluorimetric determination of loss of pH gradient between acrosomal lumen and medium monitored by dapoxyl (2-aminoethyl) sulfonamide and of intracellular Ca(2+) chan. *Molecular Reproduction and Development*, *55*(3), 335–349. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200003\)55:3<335::AID-MRD12>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<335::AID-MRD12>3.0.CO;2-5)
- Rodgers, R. J., Irving-Rodgers, H. F., & Russell, D. L. (2003). Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction (Cambridge, England)*, *126*(4), 415–424. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260415>
- Romanato, M., Julianelli, V., Zappi, M., Calvo, L., & Calvo, J. C. (2008). The presence of heparan sulfate in the mammalian oocyte provides a clue to human sperm nuclear decondensation in vivo. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *23*(5), 1145–1150. <https://doi.org/10.1093/humrep/den028>

- Romanato, Marina, Cameo, M. S., Bertolesi, G., Baldini, C., Calvo, J. C., & Calvo, L. (2003). Heparan sulphate: a putative decondensing agent for human spermatozoa in vivo. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *18*(9), 1868–1873. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg354>
- Romanato, Marina, Regueira, E., Cameo, M. S., Baldini, C., Calvo, L., & Calvo, J. C. (2005). Further evidence on the role of heparan sulfate as protamine acceptor during the decondensation of human spermatozoa. *Human Reproduction*, *20*(10), 2784–2789. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei124>
- Saïdi, H., Nasreddine, N., Jenabian, M.-A., Lecerf, M., Schols, D., Krief, C., ... Bélec, L. (2007). Differential in vitro inhibitory activity against HIV-1 of alpha-(1-3)- and alpha-(1-6)-D-mannose specific plant lectins: implication for microbicide development. *Journal of Translational Medicine*, *5*, 28. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-28>
- Sakkas, D., Urner, F., Bianchi, P. G., Bizzaro, D., Wagner, I., Jaquenoud, N., ... Campana, A. (1996). Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *11*(4), 837–843. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019263>
- Saling, P. M., Sowinski, J., & Storey, B. T. (1979). An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction. *The Journal of experimental zoology*, *209*(2), 229–238. <https://doi.org/10.1002/jez.1402090205>
- Sanchez, M. C., Alvarez Sedo, C., Julianelli, V. L., Romanato, M., Calvo, L., Calvo, J. C., & Fontana, V. A. (2013). Dermatan sulfate synergizes with heparin in murine sperm chromatin decondensation. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *59*(2), 82–90. <https://doi.org/10.3109/19396368.2012.756952>
- Sánchez, M. C., Fontana, V. A., Galotto, C., Cambiasso, M. Y., Sobarzo, C. M. A., Calvo, L., ... Cebal, E. (2018). Murine sperm capacitation, oocyte penetration and decondensation following moderate alcohol intake. *Reproduction*, *155*(6), 529–541. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0507>
- Santi, S., Rubbini, S., Cinti, C., Squarzone, S., Matteucci, A., Caramelli, E., ... Maraldi, N. M. (1994). Nuclear matrix involvement in sperm head structural organization. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, *81*(1), 47–57. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(94\)90054-X](https://doi.org/10.1016/0248-4900(94)90054-X)
- Saucedo, L., Buffa, G. N., Rosso, M., Guillardoy, T., Góngora, A., Munuce, M. J., ... Marín-Briggiler, C. (2015). Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFRs) in Human Sperm: Expression, Functionality and Involvement in Motility Regulation. *PLoS One*, *10*(5), e0127297–e0127297. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127297>
- Schagdarsuren, U., Paradowska, A., & Steger, K. (2012). Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction. *Nature Reviews. Urology*, *9*(11), 609–619. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.183>
- Schulte, R. T., Ohl, D. A., Sigman, M., & Smith, G. D. (2010). Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *27*(1), 3–12. <https://doi.org/10.1007/s10815-009-9359-x>
- Seisenberger, S., Peat, J. R., & Reik, W. (2013). Conceptual links between DNA methylation reprogramming in the early embryo and primordial germ cells. *Current Opinion in Cell Biology*, *25*(3), 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.02.013>
- Seytanoglu, A., Georgiou, A. S., Sostaric, E., Watson, P. F., Holt, W. V., & Fazeli, A. (2008). Oviductal cell proteome alterations during the reproductive cycle in pigs. *Journal of Proteome Research*, *7*(7), 2825–2833. <https://doi.org/10.1021/pr8000095>
- Shamsi, M. B., Kumar, R., & Dada, R. (2008). Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *The Indian Journal of Medical Research*, *127*(2), 115–123.

Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18403788>

- Simon, L., Emery, B. R., & Carrell, D. T. (2017). Review: Diagnosis and impact of sperm DNA alterations in assisted reproduction. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, *44*, 38–56. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.07.003>
- Simons, J., & Fauci, L. (2018). A Model for the Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. *Bulletin of Mathematical Biology*, *80*(9), 2481–2501. <https://doi.org/10.1007/s11538-018-0478-3>
- Smits, K., Nelis, H., Van Steendam, K., Govaere, J., Roels, K., Ververs, C., ... Van Soom, A. (2017). Proteome of equine oviducal fluid: effects of ovulation and pregnancy. *Reproduction, Fertility, and Development*, *29*(6), 1085–1095. <https://doi.org/10.1071/RD15481>
- Soleilhavoup, C., Riou, C., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G., Kohnke, P., ... Druart, X. (2016). Proteomes of the Female Genital Tract During the Oestrous Cycle. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, *15*(1), 93–108. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.052332>
- Sosa, C. M., Pavarotti, M. A., Zanetti, M. N., Zoppino, F. C. M., De Blas, G. A., & Mayorga, L. S. (2015). Kinetics of human sperm acrosomal exocytosis. *Molecular Human Reproduction*, *21*(3), 244–254. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau110>
- Soubry, A., Hoyo, C., Jirtle, R. L., & Murphy, S. K. (2014). A paternal environmental legacy: evidence for epigenetic inheritance through the male germ line. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *36*(4), 359–371. <https://doi.org/10.1002/bies.201300113>
- Steger, K., & Balhorn, R. (2018). Sperm nuclear protamines: A checkpoint to control sperm chromatin quality. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, *47*(4), 273–279. <https://doi.org/10.1111/ahc.12361>
- Steger, K., Wilhelm, J., Konrad, L., Stalf, T., Greb, R., Diemer, T., ... Weidner, W. (2008). Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *23*(1), 11–16. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem363>
- Suarez, S S, & Pacey, A. A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, *12*(1), 23–37. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi047>
- Suarez, Susan S. (2008). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *The International Journal of Developmental Biology*, *52*(5–6), 455–462. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072527ss>
- Suarez, Susan S. (2002). Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, *37*(3), 140–143. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00346.x>
- Suarez, Susan S. (2016). Interactions of Gametes with the Female Reproductive Tract. *Cell Tissue Res*, *363*(1), 185–194. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2244-2>
- Sullivan, R., Frenette, G., & Girouard, J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian Journal of Andrology*, *9*(4), 483–491. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00281.x>
- Talevi, R., & Gualtieri, R. (2010). Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology*, *73*(6), 796–801. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.005>
- Tarozzi, N., Nadalini, M., Stronati, A., Bizzaro, D., Dal Prato, L., Coticchio, G., & Borini, A. (2009). Anomalies in sperm chromatin packaging: implications for assisted reproduction techniques. *Reproductive Biomedicine Online*, *18*(4), 486–495. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60124-1](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60124-1)
- Tateno, H., Krapf, D., Hino, T., Sánchez-Cárdenas, C., Darszon, A., Yanagimachi, R., & Visconti, P. E. (2013). Ca²⁺ ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(46), 18543–18548.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1317113110>

- Tavalae, M., Razavi, S., & Nasr-Esfahani, M. H. (2009). Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertility and Sterility*, *91*(4), 1119–1126. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.01.063>
- Teclé, E., & Gagneux, P. (2015). Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Molecular Reproduction and Development*, *82*(9), 635–650. <https://doi.org/10.1002/mrd.22500>
- Teclé, E., Reynoso, H. S., Wang, R., & Gagneux, P. (2019). The female reproductive tract contains multiple innate sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (Siglecs) that facilitate sperm survival. *The Journal of Biological Chemistry*, *294*(31), 11910–11919. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008729>
- Tesarik, J., & Kopečný, V. (1989). Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Research*, *24*(2), 135–149. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120240203>
- Thompson, L. A., Barratt, C. L., Bolton, A. E., & Cooke, I. D. (1992). The leukocytic reaction of the human uterine cervix. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*, *28*(2), 85–89. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1992.tb00765.x>
- Tienthai, P., Kjellén, L., Pertoft, H., Suzuki, K., & Rodriguez-Martinez, H. (2000). Localization and quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the tissues and intraluminal fluid of the pig oviduct. *Reproduction, Fertility, and Development*, *12*(3–4), 173–182. <https://doi.org/10.1071/rd00034>
- Tollner, T. L., Bevins, C. L., & Cherr, G. N. (2012). Multifunctional glycoprotein DEFB126—a curious story of defensin-clad spermatozoa. *Nature Reviews. Urology*, *9*(7), 365–375. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.109>
- Tollner, T. L., Yudin, A. I., Tarantal, A. F., Treece, C. A., Overstreet, J. W., & Cherr, G. N. (2008a). Beta-defensin 126 on the surface of macaque sperm mediates attachment of sperm to oviductal epithelia. *Biology of Reproduction*, *78*(3), 400–412. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064071>
- Tollner, T. L., Yudin, A. I., Treece, C. A., Overstreet, J. W., & Cherr, G. N. (2008b). Macaque sperm coating protein DEFB126 facilitates sperm penetration of cervical mucus. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *23*(11), 2523–2534. <https://doi.org/10.1093/humrep/den276>
- Töpfer-Petersen, E. (1999). Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Human Reproduction Update*, *5*(4), 314–329. <https://doi.org/10.1093/humupd/5.4.314>
- Tosti, E., & Ménézo, Y. (2016). Gamete activation: basic knowledge and clinical applications. *Human Reproduction Update*, *22*(4), 420–439. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw014>
- Touré, A., Martinez, G., Kherraf, Z. E., Cazin, C., Beurois, J., Arnoult, C., ... Coutton, C. (2020). The genetic architecture of morphological abnormalities of the sperm tail. *Human Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02113-x>
- Tse, P.-K., Lee, Y.-L., Chow, W.-N., Luk, J. M. C., Lee, K.-F., & Yeung, W. S. B. (2008). Preimplantation embryos cooperate with oviductal cells to produce embryotrophic inactivated complement-3b. *Endocrinology*, *149*(3), 1268–1276. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1277>
- Tulsiani, D. R., Abou-Haila, a, Loeser, C. R., & Pereira, B. M. (1998). The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Experimental cell research*, *240*(2), 151–164.
- Tulsiani, D. R. P. (2006). Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: an overview of their potential role in sperm maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *250*(1–2), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.025>

- Tumova, S., Woods, A., & Couchman, J. R. (2000). Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32(3), 269–288. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(99\)00116-8](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(99)00116-8)
- van Tilburg, M. F., Rodrigues, M. A. M., Moreira, R. A., Moreno, F. B., Monteiro-Moreira, A. C. O., Cândido, M. J. D., & Moura, A. A. (2013). Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. *Theriogenology*, 79(9), 1247–1261. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.03.013>
- Varner, J. A. (1995). Cell adhesion in sponges: potentiation by a cell surface 68 kDa proteoglycan-binding protein. *Journal of Cell Science*, 108 (Pt 9), 3119–3126. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8537451>
- Visconti, P. E. (2009). Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(3), 667–668. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811895106>
- Vivès, R. R., Seffouh, A., & Lortat-Jacob, H. (2014). Post-Synthetic Regulation of HS Structure: The Yin and Yang of the Sulfs in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 3, 331. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00331>
- Wang, C., Liu, Y., Chang, C., Wu, S., Gao, J., Zhang, Y., ... Deng, G. (2016). Human fallopian tube proteome shows high coverage of mesenchymal stem cells associated proteins. *Bioscience Reports*, 36(1), e00297–e00297. <https://doi.org/10.1042/BSR20150220>
- Wang, Z., Hsieh, P. H., Xu, Y., Thieker, D., Chai, E. J. E., Xie, S., ... Liu, J. (2017). Synthesis of 3-O-Sulfated Oligosaccharides to Understand the Relationship between Structures and Functions of Heparan Sulfate. *Journal of the American Chemical Society*, 139(14), 5249–5256. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b01923>
- Ward, W. Steven. (2009). Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Molecular Human Reproduction*, 16(1), 30–36. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap080>
- Ward, W S. (1993). Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biology of reproduction*, 48(6), 1193–1201. <https://doi.org/10.1095/biolreprod48.6.1193>
- Wassarman, P. M. (1999). Fertilization in animals. *Developmental Genetics*, 25(2), 83–86. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1999\)25:2<83::AID-DVG1>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1999)25:2<83::AID-DVG1>3.0.CO;2-J)
- Watson, L. N., Mottershead, D. G., Dunning, K. R., Robker, R. L., Gilchrist, R. B., & Russell, D. L. (2012). Heparan sulfate proteoglycans regulate responses to oocyte paracrine signals in ovarian follicle morphogenesis. *Endocrinology*, 153(9), 4544–4555. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1181>
- Xu, X., Ding, J., Rao, G., Shen, J., Prinz, R. A., Rana, N., & Dmowski, W. P. (2007). Estradiol induces heparanase-1 expression and heparan sulphate proteoglycan degradation in human endometrium. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 22(4), 927–937. <https://doi.org/10.1093/humrep/del483>
- Yamada, T., Kerever, A., Yoshimura, Y., Suzuki, Y., Nonaka, R., Higashi, K., ... Arikawa-Hirasawa, E. (2017). Heparan sulfate alterations in extracellular matrix structures and fibroblast growth factor-2 signaling impairment in the aged neurogenic niche. *Journal of Neurochemistry*, 142(4), 534–544. <https://doi.org/10.1111/jnc.14081>
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote (Cambridge, England)*, 2(4), 371–372. <https://doi.org/10.1017/s0967199400002240>
- Yanagimachi, R., & Mahi, C. A. (1976). The sperm acrosome reaction and fertilization in the guinea-pig: a study in vivo. *Journal of Reproduction and Fertility*, 46(1), 49–54. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0460049>
- Yeste, M., Flores, E., Estrada, E., Bonet, S., Rigau, T., & Rodríguez-Gil, J. E. (2013). Reduced glutathione

- and procaine hydrochloride protect the nucleoprotein structure of boar spermatozoa during freeze-thawing by stabilising disulfide bonds. *Reproduction, Fertility, and Development*, 25(7), 1036–1050. <https://doi.org/10.1071/RD12230>
- Yeung, W. S., Ng, V. K., Lau, E. Y., & Ho, P. C. (1994). Human oviductal cells and their conditioned medium maintain the motility and hyperactivation of human spermatozoa in vitro. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 9(4), 656–660. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138566>
- Yoon, S.-Y., Eum, J. H., Lee, J. E., Lee, H. C., Kim, Y. S., Han, J. E., ... Yoon, T. K. (2012). Recombinant human phospholipase C zeta 1 induces intracellular calcium oscillations and oocyte activation in mouse and human oocytes. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27(6), 1768–1780. <https://doi.org/10.1093/humrep/des092>
- Yoon, S.-Y., Jellerette, T., Salicioni, A. M., Lee, H. C., Yoo, M.-S., Coward, K., ... Fissore, R. A. (2008). Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca(2+) release and are unable to initiate the first step of embryo development. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(11), 3671–3681. <https://doi.org/10.1172/JCI36942>
- Yoshida, M. (1993). Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 35(1), 76–81. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080350113>
- Yoshii, T., Kuji, N., Komatsu, S., Iwahashi, K., Tanaka, Y., Yoshida, H., ... Yoshimura, Y. (2005). Fine resolution of human sperm nucleoproteins by two-dimensional electrophoresis. *Molecular Human Reproduction*, 11(9), 677–681. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah217>
- Young, C., Grasa, P., Coward, K., Davis, L. C., & Parrington, J. (2009). Phospholipase C zeta undergoes dynamic changes in its pattern of localization in sperm during capacitation and the acrosome reaction. *Fertility and Sterility*, 91(5 SUPPL.), 2230–2242. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.05.021>
- Zandieh, Z., Ashrafi, M., Aflatoonian, K., Aflatoonian, R., Ann L Coker, Betarelli, R. P., ... Chernomordik, L. V. (2019). Factors controlling sperm migration through the oviduct revealed by gene-modified mouse models. *Molecular Reproduction and Development*, 33(1), 1–12. <https://doi.org/10.1093/humrep/den028>
- Zanetti, N., & Mayorga, L. S. (2009). Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, 81(2), 396–405. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076166>
- Zeng, H. T., Ren, Z., Guzman, L., Wang, X., Sutton-Mcdowall, M. L., Ritter, L. J., ... Gilchrist, R. B. (2013). Heparin and cAMP modulators interact during pre-in vitro maturation to affect mouse and human oocyte meiosis and developmental competence. *Human Reproduction*, 28(6), 1536–1545. <https://doi.org/10.1093/humrep/det086>
- Zhu, J., Barratt, C. L., Lippes, J., Pacey, A. A., Lenton, E. A., & Cooke, I. D. (1994). Human oviductal fluid prolongs sperm survival. *Fertility and Sterility*, 61(2), 360–366. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8299797>
- Zumoffen, C. M., Caille, A. M., Munuce, M. J., Cabada, M. O., & Ghersevich, S. A. (2010). Proteins from human oviductal tissue-conditioned medium modulate sperm capacitation. *Human Reproduction*, 25(6), 1504–1512. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq063>
- Zumoffen, C. M., Massa, E., Caille, A. M., Munuce, M. J., & Ghersevich, S. A. (2015). Effects of lactoferrin, a protein present in the female reproductive tract, on parameters of human sperm capacitation and gamete interaction. *Andrology*, 3(6), 1068–1075. <https://doi.org/10.1111/andr.12093>

Anexo

Receta medio de cultivo A+B:

Solución A (50 mL):

Componente	Cantidad	Masa molar
NaCl	0,5803 g	58,44 g/mol
Glucosa	0,1 g	180 g/mol
KCl	0,0201 g	74,56 g/mol
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,0056 g	177,99 g/mol
Piruvato de Na	0,0055 g	110,04 g/mol
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0264 g	147,02 g/mol
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,0102 g	203,30 g/mol
Lactato	0,35 mL	
Penicilina	0,0063 g	
Estreptomina	0,0050 g	
Rojo fenol	Punta de tip	

Solución B (50 ml):

Componente	Cantidad	Masa molar
NaHCO ₃	0,2106 g	84,01 g/mol

Filtrar ambas soluciones en esterilidad, fraccionar en tubos tipo Falcon estériles y conservar a 4°C durante un mes y medio como máximo.

El día del experimento, preparar 10 mL de medio: 5 mL sol A + 5 mL sol B + 30 mg de BSA.

Agregar la albúmina por encima del medio, sin agitar. Incubar en la estufa de CO₂ a 37°C por lo menos 30 minutos para equilibrar (no cerrar la tapa del tubo totalmente para que pueda entrar el CO₂). Mantener el medio siempre a 37°C y colocar en la estufa cuando no se usa.

Receta medio HTF (Human Tubal Fluid, de acuerdo con el manual de la OMS, 2010)

Compuesto	Concentración (mM)
KCl	4,69
KH ₂ PO ₄	0,37
NaCl	101,48
MgSO ₄	0,20
Glucosa	2,77
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2,04
NaHCO ₃	24,90
Piruvato de sodio	0,34
Lactato de sodio	16,34

Reactivos utilizados para realizar los distintos experimentos de esta tesis:

Aceite mineral: Sigma Aldrich Co, Cat N° M5904

Alcohol etílico (graduación 96°): PUROCOL.

BSA (Albúmina Sérica Bovina): Fracción V, SIGMA Cat N° A-7906

DMSO: Sigma Aldrich Co, Cat N° W-387520

DNAsa: Sigma Aldrich Co, Cat N° D-5025

Eosina Y: Sigma Aldrich Co, Cat N° 230251

Glutaraldehído: Sigma Aldrich Co, Cat N° G6257

GSH (γ-Glu-Cys-Gly): Sigma Aldrich Co, Cat N° G-4251

hCG (Gonadotropina coriónica humana): Sigma- Aldrich Co, Cat N° C-1063

Heparina (13500 Da, 170 IU/mg Grado I-A: de mucosa intestinal porcina): Sigma Cat N° H-3393

Hoechst 33342: Sigma Aldrich Co, Cat N° 14533

Paraformaldehído: Sigma Aldrich y Co, Cat N° P6148.

PMSG (Gonadotropina sérica de yegua preñada): Novormon 5000, Syntex, Buenos Aires, Argentina.

TUNEL: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany

Vectashield: Laboratorios Vector, U.S.A.

Determinación de la síntesis de HS en COCs de ratón.

Como un punto a estudiar en el comienzo de este trabajo de tesis doctoral, se trató de investigar el sitio de producción del heparán sulfato, dado que podía ser local en el oocito o adquirido a través de las uniones que se establecen con las células del *cumulus*. Dificultades asociadas con la determinación de HS y su marcación radiactiva, hicieron que este objetivo no llegara a cumplirse por lo que se incluye como parte de un anexo.

Recuperación de complejo *cumulus*-oocito de ratón.

Para la obtención de oocitos maduros se utilizaron ratones hembra F1 (c57xBalBc) de 8 semanas de edad alimentadas *ad-libitum*, criados en bioterio a una temperatura de 20 °C con períodos de luz-oscuridad de 12 horas (Bioterio IBYME). El cuidado y manipulación de los animales se realizó siguiendo las guías institucionales y la guía de principios sobre cuidado y uso de animales (publicaciones DHEW, NIH 80-23) y el proyecto cuenta con la aprobación del CICUAL-IBYME.

Las hembras fueron estimuladas hormonalmente con 7,5 UI de gonadotrofina sérica de yegua preñada (PMSG) (Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) seguido de 7,5 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG) 48 horas más tarde. Luego de 12-14 horas post hCG, se procedió al sacrificio de los animales por dislocación cervical. Los complejos *cumulus*-oocito (COCs) se obtuvieron tras un corte con aguja de tuberculina en la región de la ampulla. Una vez liberados, se descartaron los oviductos y se juntaron los COCs en una gota de 100 µL de PBS con pipeta Pasteur de vidrio (estirada con calor de manera que el diámetro de esta fuera del tamaño de un COC).

Detección de biosíntesis de HS en COCs de ratón.

Para el estudio de la biosíntesis de glicosaminoglicanos/proteoglicanos los COCs fueron cultivados durante 24 horas en 1 mL de medio A+B de ratón a 37 °C y en atmósfera 5 % CO₂, recibiendo 20 µL de [³H]- glucosamina (50 µCi de cada isótopo/mL de medio final). Posteriormente, se separó el medio de los COCs, y se extrajo con 1 mL de buffer guanidina (guanidina 4 M, acetato de sodio 50 mM, pH 6,0, conteniendo Tritón X-100 al 2 % (p/v)).

Aislamiento de proteoglicanos.

Los extractos fueron analizados, primero, por cromatografía en columna de tamiz molecular con Sephadex G-10, equilibrada con buffer guanidina y eluida con el mismo buffer, a fin de separar la glucosamina radiactiva no incorporada. La fracción macromolecular excluida se sembró, luego, en una columna de Sephacryl S-500 HR (30 cm de altura por 1 cm de diámetro). Las fracciones se recolectaron cada 0,4 mL y se mezclaron con 2 mL de líquido centelleante (HiSafe) y la radiactividad se determinó con un contador de centelleo líquido (contador β , Packard TriCarb).

Resultados de las cromatografías.

Al intentar determinar la presencia de proteoglicanos en COCs de ratón, con oocitos maduros obtenidos de las ratonas inyectadas previamente con PMSG y con hCG, observamos que el pico de [^3H]-glucosamina estándar aparecía en las mismas fracciones que el pico obtenido a partir del medio de cultivo, luego de separar los COCs y un pico muy marcado con mayor radiactividad y correspondiendo a entidades con pesos moleculares muy superiores, cuando se analizaron los COCs por separado (Figura 85).

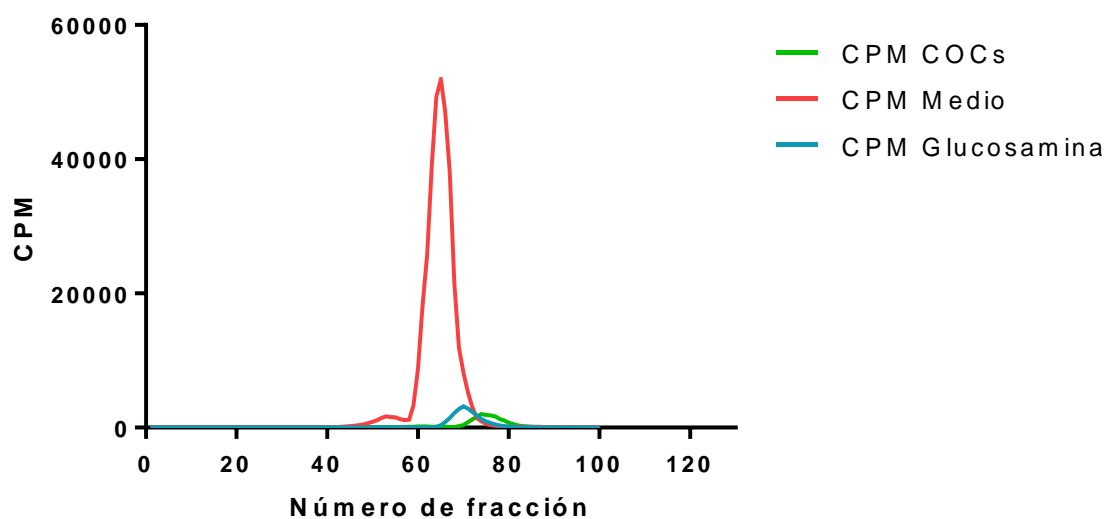


Figura 85. Curva obtenida por cromatografía de medio y COCs conteniendo [^3H]-glucosamina.

Para corroborar que ese pico correspondía al glicosaminoglicano sulfatado, debimos cultivar en presencia de [^{35}S]-Sulfato de sodio, pero la incorporación fue tan pequeña que los resultados no fueron confiables y se decidió no continuar con este objetivo.

El oocito es una célula que al madurar ya contiene todos los elementos necesarios para que, luego de la penetración del espermatozoide, se desencadene la posterior singamia y formación del embrión. Por lo tanto, probablemente sea necesario observar la síntesis de HS en estadios previos de maduración del oocito, como puede ser en estadio de vesícula germinal, metafase I y, también, mejorar la técnica para observar la síntesis en las células del *cumulus*, que podrían ser las encargadas de que luego el HS sea transportado al oocito previo a su maduración.

Por otra parte, existe evidencia reciente en la literatura que demuestra la presencia HS y condroitín sulfato en la matriz extracelular de los COCs de ratón y humano y que estos serían producto de la síntesis por parte de las células foliculares (Colombe et al., 2017; Ploutarchou et al., 2015; Z. Wang et al., 2017; Zeng et al., 2013).

Interacción entre espermatozoides y oocitos de ratón mediada por HS.

Al finalizar los objetivos propuestos para esta tesis doctoral, fue de particular interés poder establecer qué ocurría con la fusión entre oocitos y espermatozoides de ratón al interrumpir la acción de HS clivándolo con Hasa, directamente inyectada al interior del oocito.

Para esta parte, en colaboración con el laboratorio del Dr. Marcelo Rubinstein (INGEBI-CONICET), nos planteamos realizar una fecundación *in vitro*, tal y como se describe a continuación.

Fertilización in vitro (FIV)

Recuperación de espermatozoides murinos para realizar la FIV

Se obtuvieron espermatozoides de *cauda* epididimario de ratones control, tal como se describiera previamente en Materiales y Métodos. Luego de determinar los parámetros seminales, los espermatozoides se incubaron en condiciones capacitantes en una gota de 300 μ L de medio A+B cubierta con aceite mineral, a una concentración de $1-5 \times 10^6$ espermatozoides/mL, durante 90 minutos a 37°C y bajo atmósfera de 5% de CO₂.

Superovulación y recuperación de oocitos de ratón

Con el fin de obtener una mayor cantidad de oocitos, se estimularon hormonalmente ratones hembra de la F1 (c57xBalBc) de 8 semanas de edad con una inyección de 10 UI de PMSG seguida de

una inyección de 10 UI de hCG, 48 horas más tarde. A las 16 -17 horas post hCG, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical, se recuperaron los oviductos y cada uno de ellos se colocó en una gota de 100 µL de medio A+B. Se recuperó el complejo *cumulus*-oocito (COC) de cada oviducto pinchando con aguja de jeringa tipo tuberculina en la región de la *ampulla* (ver Materiales y Métodos). Una vez recuperados los COCs, se descartaron los oviductos y se colocó cada COC en una gota de 90 µL de medio A+B en la cual posteriormente se realizaría la FIV.

FIV con espermatozoides de los ratones.

En cada gota de FIV conteniendo los correspondientes COCs, tal como se detallase en el punto anterior, se colocó una alícuota de 10 µL de espermatozoides murinos capacitados ($1-5 \times 10^5$ espermatozoides/mL), obtenidos tal como se indicara en el punto correspondiente. Las gotas se colocaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire. Con el fin de analizar la cinética posterior a la FIV, se interrumpió la coincubación de los gametos en distintas gotas a distintos tiempos (2,5-3,5 y 4,5 h), se fijaron los oocitos en paraformaldehído al 2% en PBS, se lavaron durante 10 min en gota de PBS, se colorearon con Hoechst 33342 durante 10 minutos y se lavaron nuevamente en gota de PBS durante 10 minutos. Luego, los oocitos provenientes de cada condición se montaron en portaobjetos multipocillo (“multiwell”) con medio de montaje Vectashield para ser observados al microscopio de fluorescencia (Excitación 350 nm/Emisión 461 nm).

Los diferentes grupos por estudiar fueron: oocitos con ZP y espermatozoides sin tratamiento, oocitos con ZP microinyectados con placebo, oocitos con ZP microinyectados con HASA. De esta manera, se pretendió estudiar lo que ocurría con los espermatozoides en el interior de éstos tras la FIV. La microinyección de los oocitos llevó a la activación de estos, no observándose resultados positivos en la FIV. Con lo cual, el objetivo es poder realizar estos experimentos sacando la ZP de los oocitos, esperando un menor porcentaje de reacción de zona, para que los espermatozoides puedan acceder a fecundar o a fusionarse con la membrana de los oocitos.

Independientemente de esto y, corroborando nuestros resultados que indican la importancia del HS oocitario en el proceso de descondensación del núcleo espermático, hay evidencias en la literatura de que el bloqueo de la síntesis de HS en los oocitos provoca una disminución en el porcentaje de espermatozoides descondensados tras la FIV (Kim et al., 2018).

Además, en colaboración con el grupo del Dr. Salomone (Facultad de Agronomía-UBA) hemos demostrado en bovinos que también podría ser el HS el encargado de la descondensación de los

espermatozoides *in vivo*. Se inyectó HASA dentro del citoplasma de oocitos madurados *in vitro*, y se procedió a realizar la FIV utilizando espermatozoides criopreservados de toro a una concentración final de 15×10^6 espermatozoides/mL. Tras 5 h de incubación, se removieron las células del *cumulus* y los espermatozoides unidos a la ZP. También se realizó la FIV a un grupo de oocitos que fueron inyectados únicamente con el vehículo, y otros que no fueron inyectados. Todos los cigotos se cultivaron durante 16 h, se permeabilizaron luego con Tritón X-100 al 0,2% durante 15 minutos y se tiñó el DNA con yoduro de propidio. La tasa de cigotos con 2 pronúcleos fue menor en el grupo tratado con HASA que el tratado con el vehículo y el control. Por lo tanto, se concluye de estos experimentos, realizados en una especie filogenéticamente emparentada con los humanos que el HS está involucrado en la descondensación de la cromatina espermática bovina (Canel et al., 2016).