

Tesis Doctoral

# Papel del heparan sulfato en el proceso de descondensación de la cromatina del espermatozoide humano

Romanato, Marina

2009

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

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

Cita tipo APA:

Romanato, Marina. (2009). Papel del heparan sulfato en el proceso de descondensación de la cromatina del espermatozoide humano. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Romanato, Marina. "Papel del heparan sulfato en el proceso de descondensación de la cromatina del espermatozoide humano". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



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

# **PAPEL DEL HEPARAN SULFATO EN EL PROCESO DE DESCONDENSACION DE LA CROMATINA DEL ESPERMATOZOI DE HUMANO**

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

**Marina Romanato**

**Director: Dr. Juan Carlos Calvo**

**Director Asistente: Dra. Lucrecia Piñeiro**

**Consejero de Estudios: Dr. Juan Carlos Calvo**

Laboratorio de Proteoglicanos y Matriz Extracelular. Instituto de  
Biología y Medicina Experimental (IByME – CONICET)

Buenos Aires, Marzo 2009.

Para Alfonsina

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes revistas científicas:

**Further evidence on the role of heparan sulfate as protamine acceptor during the decondensation of human spermatozoa. Romanato M, Regueira E, Cameo MS, Baldini C, Calvo L y Calvo JC. *Human Reproduction* Vol. 20, No.10 pp.2784-2789. (2005).**

**The presence of heparan sulfate in the mammalian oocyte provides a clue to human sperm nuclear decondensation in vivo. Romanato M, Julianelli V, Zappi M, Calvo L y Calvo JC. *Human Reproduction* Vol. 23, No 5 pp. 1145-1150. (2008).**

Agradecimientos .....	7
Resumen .....	9
Abstract .....	10
Abreviaturas .....	11
Introducción .....	14
❖ En el comienzo .....	14
❖ El proceso de fecundación .....	15
❖ El espermatozoide .....	22
❖ El núcleo espermático y la organización de su cromatina .....	27
❖ La descondensación del núcleo espermático .....	33
❖ El heparán sulfato como posible aceptor de protaminas .....	44
Objetivos .....	55
Materiales y métodos .....	56
❖ Población estudiada .....	57
❖ Parámetros evaluados en el espermograma .....	57
❖ Concentración .....	57
❖ Motilidad .....	57
❖ Viabilidad .....	58
❖ Procesamiento de las muestras de semen .....	58
❖ Obtención de una fracción altamente mótil .....	59
❖ Incubación en condiciones capacitantes .....	60
❖ Obtención de núcleos aislados de espermatozoides humanos .....	60
❖ Inmunocitoquímica de espermatozoides y núcleos aislados con un anticuerpo anti acrosina humana .....	61

❖ Aislamiento de cromatina de espermatozoides humanos .....	62
❖ Ensayo de descondensación espermática .....	62
❖ Descondensación de espermatozoides enteros .....	62
❖ Descondensación de núcleos espermáticos y cromatina aislada .....	64
❖ Efecto de la sulfatación de la heparina sobre su actividad descondensante en núcleos aislados .....	64
❖ Actividad descondensante de diferentes glicosaminoglicanos en núcleos aislados .....	65
❖ Los GAGs como aceptores de protaminas durante el proceso de descondensación nuclear .....	66
❖ Extracción de proteínas nucleares .....	67
❖ Electroforesis de proteínas nucleares en geles ácidos de poliacrilamida .....	68
❖ Superovulación y recolección de ovocitos de ratón .....	68
❖ Evaluación de la capacidad descondensante de ovocitos frescos de ratón .....	71
❖ Ensayo de descondensación: micrométodo .....	71
❖ Descondensación en presencia de ovocitos frescos de ratón .....	72
❖ Efecto de distintas glicosidasas sobre la capacidad descondensante del ovocito .....	73
❖ Evaluación de la presencia de Heparán sulfato en el ovocito .....	73
❖ Tinción de ovocitos con Rubipy .....	73
❖ Inmunocitoquímica de ovocitos con anticuerpo anti-HS .....	74
Resultados .....	76

❖ Estudio de la descondensación <i>in vitro</i> de núcleos aislados de espermatozoides humanos .....	77
❖ Obtención de núcleos aislados de espermatozoides humanos .....	77
❖ Inmunocitoquímica de espermatozoides y núcleos aislados con anti-acrosina humana .....	78
❖ Descondensación <i>in vitro</i> de espermatozoides capacitados, núcleos y cromatina aislada en presencia de heparina y GSH .....	79
❖ Sulfatación de la heparina y actividad descondensante .....	83
❖ Actividad descondensante de diferentes glicosaminoglicanos (GAGs) .....	85
❖ Los GAGs como aceptores de protaminas <i>in vitro</i> .....	87
❖ Electroforesis de proteínas nucleares en geles ácidos de poliacrilamida .....	87
❖ Electroforesis de proteínas aisladas de núcleos espermáticos descondensados con diferentes GAGs .....	88
❖ Estudio de la presencia y actividad descondensante del heparan sulfato en el ovocito .....	90
❖ Localización de heparán sulfato en el ovocito .....	90
❖ Marcación histoquímica con Rubipy .....	90
❖ Inmunocitoquímica de ovocitos con anticuerpo anti-HS .....	92
❖ Descondensación de espermatozoides en presencia de ovocitos frescos de ratón .....	95
❖ Ensayo de descondensación: micrométodo .....	95
❖ Descondensación en presencia de ovocitos .....	96
❖ Efecto de distintas glicosidasas sobre la capacidad descondensante del ovocito .....	97

Discusión .....	99
Bibliografía .....	115



A Juan Carlos y Lucre por haberme permitido trabajar con ellos. Por ser más que mis jefes y mucho más que mis padres científicos... son parte de mi familia. Gracias por acompañarme, aconsejarme y enseñarme tantas cosas. Gracias por su simpleza y sobre todo por compartir cada paso de mi vida desde hace 10 años. Los quiero mucho!

A toda mi familia. A Lucas por ser mi compañero, por haberme acompañado siempre y haberme cedido tantas horas para que pueda hacer lo que me gusta... pero sobre todo, gracias por haberme dado lo más lindo de mi vida... nuestra hija. Te amo. A mamá y papá por haberme alentado siempre y por apoyarme, por sus innumerables consejos y sobre todo por acompañarme siempre en cada decisión. Son mi ejemplo de vida. A mis hermanos Lucas y Juan, por ser los mejores hermanos que alguien puede desear tener y por haberme dado siempre todo. Gracias por el aliento durante mis primeros costosos pasos en la carrera. A Gaby y Sol por darme su alegría permanente y por haber compartido todos estos años juntas. A Mate y Guille, por hacerme sentir una hija más, por sus permanentes consejos y preocupación, por su aliento constante. A mis hermanos postizos Luli, Cuca, Fer, Alejo y cía...por haberme hecho sentir tan bien desde el primer día. Por su permanente compañía, por su alegría...los quiero!. A todos mis sobrinos: Luchi, Tincho, Mati, Cami, Fausti y Jero... por regalarme cada momento, por su inyección de alegría permanente.

A Coky, Lu, Caro, Lucila, Nato, Pichi y July; por ser mis amigas y vivir juntas los mejores momentos de mi vida. Las quiero! A Mica, Tincho y Clementina; por estar siempre conmigo, ser amigos incondicionales y por compartir todo.

A Ari por ser mi pipona... por hacer más divertidos los días de trabajo, por hacer que siempre todo parezca sencillo y sobre todo por ser mi amiga. Rami, gracias por tu simpleza y por tu buena onda siempre. Te quiero! A Ro, Fede y Lauti por todos los momentos lindos compartidos. Ubiler, gracias por dejarme entrar en tu vida.

A mis compañeras y amigas del laboratorio, Vani, Paulet, Vir y July. Gracias por compartir cada día y hacerlo divertido. Por su permanente ayuda y sus consejos. Formamos un buen equipo de trabajo. A Vani Fontana por sus consejos, su apoyo y por haberme enseñado los secretos del ovocito.

A mi querido pasillo del IByME y cada uno de sus integrantes. Sin ustedes no podría ir a trabajar con la alegría con que voy. También gracias por su ayuda día a día.

A los Betas por haberme abierto sus puertas, y sobre todo a Mechita, Grace y Diego por haber compartido tantas risas juntos entre café y café.

A todos los integrantes del laboratorio de la Dra. Lanari, por las charlas y consejos. Por las risas interminables.

A Virginia y Consuelo por ser mis compañeras y amigas en esta profesión. Por haber soñado siempre juntas, por habernos reído tanto y por seguir riéndonos.

Pao y Naty... por hacer siempre el trabajo sucio por mí y por ayudarme cada vez que lo necesito.

A todas las reproductólogas del IByME (espermatozoides y ovocitos) por la gran ayuda que me brindan en cada consejo, especialmente a Fer.

A la Dra. Mónica Cameo, quien me permitió dar mis primeros pasos en investigación en su laboratorio Biología de la Reproducción. A Paula por los lindos momentos compartidos.

A las autoridades del IByME por haberme dado lugar para que realizara los experimentos para mi trabajo de Tesis. Finalmente, al CONICET y PLACIRH por las Becas otorgadas.

## **PAPEL DEL HEPARAN SULFATO EN EL PROCESO DE DESCONDENSACION DE LA CROMATINA DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO**

Nuestro laboratorio estudia la descondensación nuclear del espermatozoide humano *in vitro*, intentando ahondar en la comprensión de las etapas del proceso y las moléculas involucradas en el mismo. La descondensación requiere la reducción de puentes disulfuro en las protaminas y la remoción de las mismas para ser reemplazadas por histonas ovocitarias. Los espermatozoides humanos pueden descondensarse *in vitro* con heparina y glutatión. Observamos en estudios previos que el heparán sulfato (HS), análogo estructural de la heparina, pero no así otros glicosaminoglicanos, presenta actividad descondensante *in vitro* similar a la heparina y propusimos que HS actuaría *in vivo* como aceptor de protaminas. El presente trabajo tuvo como objetivos (1) acercarse a las condiciones *in vivo* analizando el comportamiento de núcleos aislados frente a la descondensación con heparina y glutatión *in vitro* y (2) demostrar que HS está presente en el ovocito y podría funcionar como agente descondensante. Se utilizaron espermatozoides de donantes normospermicos (OMS) y ovocitos de ratón. Los núcleos espermáticos aislados descondensaron con glutatión y heparán sulfato o heparina pero no con otros glicosaminoglicanos. El análisis por microscopía confocal reveló localización de HS en el citoplasma y el espacio perivitelino del ovocito. La utilización de enzimas específicas indicó que la capacidad descondensante del ovocito podía atribuirse a la presencia de HS. Estas son las primeras evidencias de la presencia de HS en el ovocito y de su posible rol como aceptor de protaminas durante la descondensación del espermatozoide humano *in vivo*.

**Palabras clave:** descondensación del núcleo espermático, heparán sulfato, protamina, glicosaminoglicano, heparina, espermatozoide, ovocito.

## **ROLE OF HEPARAN SULFATE IN THE PROCESS OF HUMAN SPERM CHROMATIN DECONDENSATION**

Our laboratory studies human sperm nuclear decondensation *in vitro*, in an attempt to further understand the different stages of the process and the molecules involved in it. Decondensation requires protamine disulfide bond reduction followed by protamine removal to allow replacement by oocyte histones. Human spermatozoa can be decondensed *in vitro* with heparin and glutathione. In previous studies we showed that heparan sulfate (HS), structural analogue of heparin, but not other glycosaminoglycans, has a similar decondensing ability *in vitro* and we proposed that HS could function as protamine acceptor *in vivo*. The aims of the present study were (1) to approach *in vivo* conditions analyzing the decondensation of isolated sperm nuclei *in vitro* with heparin/HS and glutathione and (2) to demonstrate that HS is present in the oocyte and could thus function as decondensing agent *in vivo*. Spermatozoa obtained from normozoospermic (OMS) donors and mouse oocytes were used. Isolated sperm nuclei decondensed *in vitro* with HS or heparin but not with other glycosaminoglycans. Confocal microscopy revealed that HS is present in the ooplasm and perivitelline space of the oocyte. The use of specific glycosidases showed that oocyte decondensing capacity *in vitro* could be attributed to HS. These results provide the first evidence on the presence of HS in the oocyte and its possible role as sperm protamine acceptor during human sperm decondensation *in vivo*.

**Key words:** nuclear sperm decondensation, heparan sulfate, heparin, protamine, glycosaminoglycans, spermatozoa, oocyte.

**ADN:** Acido desoxirribonucleico

**AH:** Acido hialurónico

**Ana I:** Anafase I

**BSA:** Albúmina Sérica Bovina

**BSO:** Sulfoximina de butionina

**CS:** Condroitín sulfato

**Da:** Dalton

**DS:** Dermatán sulfato

**DTT:** ditioneitol

**EDTA:** Acido Etilendiaminotetraacético

**EN:** Envoltura Nuclear

**FITC:** Isotiocianato de Fluoresceína

**GAGs:** Glicosaminoglicanos

**GGT:**  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa

**GR:** GSH reductasa

**GSH:** Glutati3n reducido

**GSSG:** Glutati3n oxidado

**hCG:** Gonadotrofina Cori3nica Humana

**Hep:** Heparina

**HS:** Heparán sulfato

**HTF:** Fluído Tubario Humano

**ICSI:** Inyecci3n intracitoplasmática del espermatozoide

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IgM:** Inmunoglobulina M

**kDa:** kilo Dalton

**Masa crom:** Masa cromatínica

**Met I:** Metafase I

**Met II:** Metafase II

**MTAB:** Bromuro de metildodecil trimetil amonio

**N-des:** N-desulfatada

**N-des N-ac:** N-desulfatada N-acetilada

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

**O-des:** O-desulfatada

**O/N-des N-ac:** O/N-desulfatada N-acetilada

**P<sub>1</sub>:** Protamina 1

**P<sub>2</sub>:** Protamina 2

**PBS:** Solución buffer fosfato

**PMSG:** Gonadotropina sérica de yegua preñada

**Promet I:** Prometafase I

**PS:** Protamina con puente disulfuro

**PSH:** Protamina tiorreducida

**ROS:** Especies reactivas de Oxígeno

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio

**SH:** grupo sulfhidrilo

**Tel:** Telofase

**TCA:** Acido tricloroacético

**VG:** Vesícula Germinal

**VG Cond:** Vesícula Germinal Condensada

**W:** Watt

# Introducción

***En el comienzo...***

La actividad sexual significa, en cierto modo, el triunfo de la vida sobre la muerte; ofrece a nuestros genes la promesa de inmortalidad. Nuestros cuerpos y nuestro comportamiento son el producto de la evolución Darwiniana impulsada por una descarnada competencia para reproducirse.

Los antiguos griegos creían que los seres humanos fueron, originalmente, hermafroditas con cuatro manos y cuatro pies y dos caras mirando en dirección opuesta. Tales individuos eran tan fuertes que representaron un desafío para los dioses y, entonces, Zeus decidió debilitarlos cortándolos en mitades que, inmediatamente, se buscaron y abrazaron.

Aristóteles, sin duda alguna, mostró un interés particular en detallar el proceso de la generación de los animales. Luego de describir en su tratado “De las partes de los animales” cada sistema y órgano, pasa a su estudio “De la generación de los animales” donde dice: “...sin duda, algunos animales se forman como resultado de la cópula del macho y de la hembra, a saber: los animales que pertenecen a aquellos grupos en que existen los dos sexos, el macho y la hembra, ya que hemos de recordar que no todos los grupos tienen los dos sexos, macho y hembra. Entre los animales que tienen sangre, con muy pocas excepciones, el individuo, cuando está completamente formado, es o bien macho o bien hembra; pero entre los animales que no tienen sangre, aún cuando algunos grupos poseen ambos sexos, macho y hembra, y en consecuencia procrean hijos que son idénticos en especie a sus progenitores, hay otros grupos que, aunque engendran, no engendran hijos idénticos a sus progenitores. Tales son los vivientes que son engendrados no como consecuencia de una cópula de animales vivos, sino a partir del estiércol en putrefacción y a partir de residuos.” “...podemos, con toda seguridad establecer como principios básicos de la generación el factor macho y el factor hembra;



el factor macho como poseedor del principio del movimiento y de la generación; el factor hembra, como poseedor del principio de la materia. Es más probable llegar a la convicción de esto considerando de qué manera se forma el semen y de dónde procede; pues, aún cuando las cosas que son formadas en el curso de la Naturaleza sin duda deben su nacimiento al semen, no hemos de dejar de advertir de qué manera se forma el semen a partir del macho y la hembra, porque, debido precisamente a que esta parte es segregada del macho y la hembra y a que esta segregación tiene lugar en ellos y fuera de ellos, el macho y la hembra son principios de la generación. Entiendo por animal macho el que engendra en otro, y por animal hembra el que engendra en sí mismo.”

Los espermatozoides fueron observados, por primera vez en 1678, por el holandés Anthony van Leeuwenhoek, quien los llamó de esa manera pensando que eran parásitos invadiendo el semen (“animales en el semen”). Recién en 1827, el microscopista alemán Karl von Baer pudo observar el ovocito, pero la primera descripción de la fecundación en mamíferos data de 1875, por el belga Edouard van Beneden.

### *El proceso de fecundación*

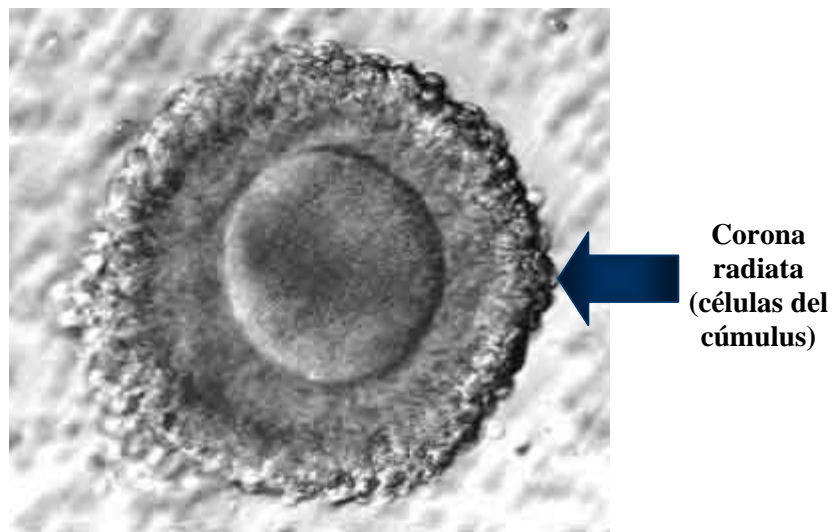
La **fecundación** es el proceso mediante el cual gametas individuales provenientes del macho y de la hembra se unen para crear descendencia con un componente genético diferente al de los padres. Este modo bisexual de reproducción vía fertilización surgió durante la evolución y se ha mantenido en la mayoría de los metazoos incluidos los mamíferos (Yanagimachi, 1994).

Desde el punto de vista del genoma, los **ovocitos** y los **espermatozoides** son muy similares, pero su historia y comportamiento antes y durante la fertilización son algo diferentes. Si bien ambas gametas (haploides) se originan en las gónadas a partir de un precursor diploide a través de un proceso meiótico, la **espermatogénesis** ocurre en

forma ininterrumpida desde la pubertad mientras que la **ovogénesis** comienza durante el desarrollo embrionario, se arresta antes del nacimiento, y sólo se completa al producirse la entrada del espermatozoide al ooplasma durante la fertilización. Así activado, el ovocito, con un complemento dual de genoma femenino y masculino, elimina todos o casi todos los elementos que no forman parte del núcleo del espermatozoide y comienza a desarrollar un nuevo individuo (Yanagimachi, 1994).

El proceso de interacción entre las gametas que lleva a la formación del cigoto es sumamente complejo. El ovocito de los mamíferos está rodeado de una serie de envolturas que el espermatozoide debe atravesar eficazmente para poder ingresar finalmente al ooplasma.

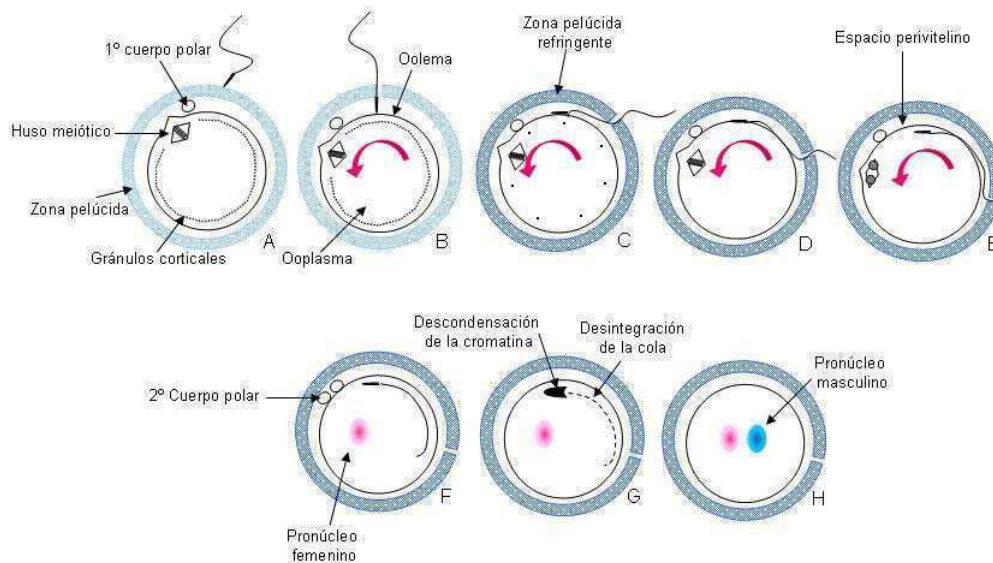
En el humano, una vez que el espermatozoide llegó al sitio de fertilización, específicamente ubicado en la zona de la ampolla de una de las trompas de Falopio, y se encuentra en las inmediaciones del ovocito recientemente ovulado y arrestado en la metafase de la segunda división meiótica, debe en primera instancia atravesar la **corona radiata**. (Figura 1).



**Figura 1:** Fotografía de microscopía óptica en donde se observa al ovocito rodeado por las células del cúmulus (corona radiata). (Tomado de Internet).

La corona radiata está formada por las células del cúmulus y su matriz extracelular y se encuentra rodeando completamente al ovocito. El componente principal de esta matriz es el ácido hialurónico (2500 kDa) (Piko, 1979) asociado no covalentemente a proteínas (Virji y col, 1990). El espermatozoide logra atravesar esta barrera probablemente a través de la acción combinada de su **motilidad hiperactivada** caracterizada por una elevada amplitud del batido flagelar que confiere mayor fuerza de penetración y de la enzima **hialuronidasa** presente en su superficie (Kim y col, 2008).

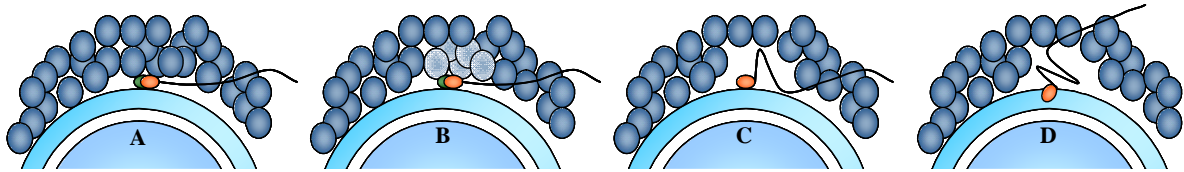
Una vez que ha atravesado las células del cúmulus, el espermatozoide se encuentra con una segunda barrera: la **zona pelúcida** (Figura 2). El espermatozoide interactúa con receptores específicos en la zona a través de proteínas específicas localizadas en la membrana plasmática de la región apical de la cabeza. Como consecuencia de esta interacción se produce la **reacción acrosomal**, evento exocitótico del espermatozoide que permite la liberación de una variedad de enzimas líticas, particularmente hialuronidasa y **acrosina**.



**Figura 2: Secuencia de eventos que tiene lugar desde que el espermatozoide alcanza las inmediaciones del ovocito, culminando con la formación de ambos pronúcleos.** **A:** El espermatozoide se pone en contacto con la zona pelúcida activándose de esa manera la reacción acrosomal. **B:** El espermatozoide logra atravesar la zona pelúcida y se contacta con la membrana plasmática del ovocito (oolema). **C:** Fusión del oolema con la región del segmento ecuatorial del espermatozoide. En este momento, la zona pelúcida se hace refractaria a otros espermatozoides por liberación de gránulos corticales (reacción cortical). **D y E:** Entrada del espermatozoide al ooplasma y activación del ovocito. **F:** Extrusión del segundo cuerpo polar y formación del pronúcleo femenino, concomitante con el inicio de la descondensación de la cromatina del espermatozoide. **G:** Descondensación de la cromatina y desintegración de la cola del espermatozoide. **H:** Fin de la descondensación de la cromatina del espermatozoide para dar lugar a la formación del pronúcleo masculino propiamente dicho. (Modificado de Austin C.R. 1965).

Se cree que la liberación de hialuronidasa permitiría disgregar las células del cúmulus que se encuentran alrededor de la cola, facilitando el batido flagelar del espermatozoide hiperactivado (Yanagimachi, 1994) que de esta manera alcanzaría la fuerza necesaria para poder atravesar la zona pelúcida, con la ayuda de la acrosina, proteasa con acción de tripsina, que participaría en la digestión enzimática de la zona (Figura 3) (Honda y

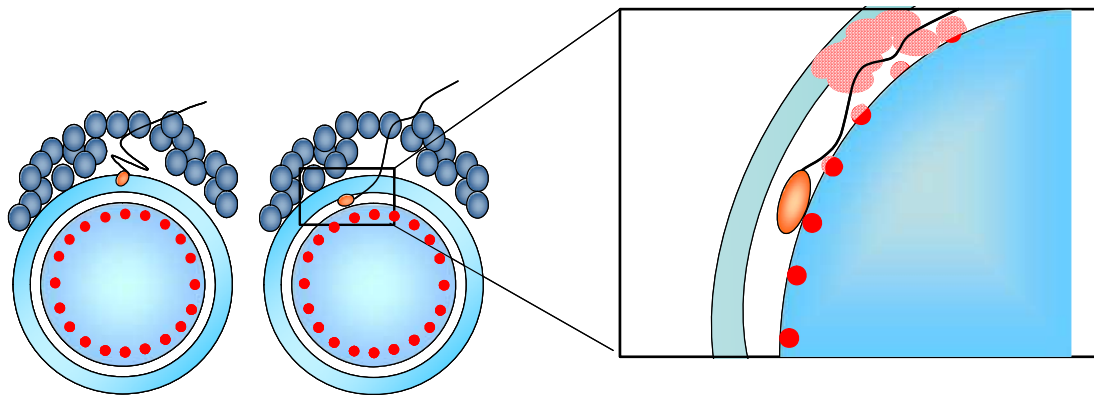
col, 2002). De esta forma, el espermatozoide habría logrado atravesar la zona pelúcida mediante un mecanismo que combina acciones mecánica y enzimática.



**Figura 3: Hipótesis mecánico-enzimática para el pasaje del espermatozoide a través de la zona pelúcida.** La liberación de hialuronidasa durante la reacción acrosomal en la superficie de la zona pelúcida despolimeriza localmente la matriz extracelular (liberando a las células de cúmulus), para permitir de esa manera el movimiento libre de la región proximal de la cola del espermatozoide que quiere penetrar al ovocito. **A:** El espermatozoide que logró atravesar las células del cúmulus se pone en contacto con la zona pelúcida. **B:** Se dispara la reacción acrosomal, liberando entre otras enzimas, la hialuronidasa contenida dentro del acrosoma. **C:** Disgregación de las células del cúmulus lindantes, permitiendo de esa manera el libre movimiento de la región proximal del flagelo. **D:** Dicho movimiento se cree que otorga mayor fuerza al espermatozoide para que pueda atravesar la zona pelúcida. (Modificado de Drobnis y col. 1988).

Una vez en el **espacio perivitelino**, la cabeza del espermatozoide se ubica lateralmente, para permitir la interacción de moléculas de reconocimiento específicas localizadas en su segmento ecuatorial, con la membrana plasmática del ovocito (Bedford y col, 1978; Moore y col, 1983). En consecuencia, ambas membranas se fusionan y se produce un englobamiento del resto del espermatozoide, logrando su internalización total (Yanagimachi, 1994). En el momento en el que el espermatozoide logra entrar en el ovocito, se produce por un lado el fenómeno conocido como **reacción cortical** y por otro, la reanudación de la meiosis ovocitaria. La reacción cortical consiste en la exocitosis de los gránulos corticales, ubicados inmediatamente por debajo del ooplasma, en respuesta a la liberación de calcio intracelular (Jaffe, 1983; Szollosi, 1967; Turner y col, 1986). El contenido de los mismos, liberado al espacio perivitelino, produce

modificaciones estructurales en la zona pelúcida que la tornan refractaria a cualquier otro espermatozoide que intente ingresar (Figura 4).



**Figura 4: Liberación de los gránulos corticales.** Una vez que el espermatozoide sufre la reacción acrosomal y logra atravesar la zona pelúcida (A), se fusiona la membrana plasmática del ovocito (oolema) con la región del segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide (B). Al comenzar la internalización del espermatozoide, los gránulos corticales ubicados por debajo del oolema se fusionan con él, liberando de esa manera su contenido. Así, la zona pelúcida se vuelve refractaria al resto de los espermatozoides (C).

Al mismo tiempo, se completa la segunda división meiótica, fenómeno que se hace visible por la extrusión del segundo corpúsculo polar. El resultado final de la activación del ovocito es la formación del pronúcleo femenino, portador de 23 cromosomas en el humano.

El espermatozoide sufre una serie de cambios morfológicos y funcionales una vez adentro del ovocito, la mayor parte de los cuales tiene lugar en su núcleo y culmina con la formación del pronúcleo masculino, para luego poder llevar a cabo su función última: la fusión de su material genético con el del ovocito. De modo tal que cabe decir que la función de la gameta masculina en el proceso de fecundación no finaliza con la penetración del espermatozoide al ooplasma.

La mayor parte de los cambios que sufre el espermatozoide una vez dentro del ovocito tiene lugar a nivel de su cromatina. Estos cambios suelen dividirse en dos períodos: un primer período de **descondensación cromatínica** y un segundo período de formación del pronúcleo propiamente dicho (Figura 2) (Tesarik, 1989). En el hombre, al igual que en otros mamíferos, la descondensación cromatínica en ovocitos homólogos es precedida por la desintegración completa del envoltorio nuclear, y constituye el primer cambio visible en el espermatozoide una vez que ha penetrado en el ovocito. El interés por estudiar más detalladamente el núcleo del espermatozoide, el proceso de descondensación nuclear y los factores espermáticos y ovocitarios involucrados en dicho proceso, se ha renovado en las dos últimas décadas con el objetivo de encontrar explicación a las fallas de fertilización observadas en procedimientos de reproducción asistida, tal como la presencia de una cabeza de espermatozoide condensada en el interior del ovocito o la falla en la activación del ovocito, entre otras. En particular, con el advenimiento de la técnica conocida como ICSI (inyección intracitoplasmática del espermatozoide), al superarse toda las barreras naturales que presenta el ovocito, ya no preocupa si el espermatozoide puede interactuar eficazmente con el cúmulus, la zona pelúcida o el oolema y, entonces, cobran especial importancia todos los procesos que ocurren una vez que el espermatozoide se encuentra dentro del ooplasma.

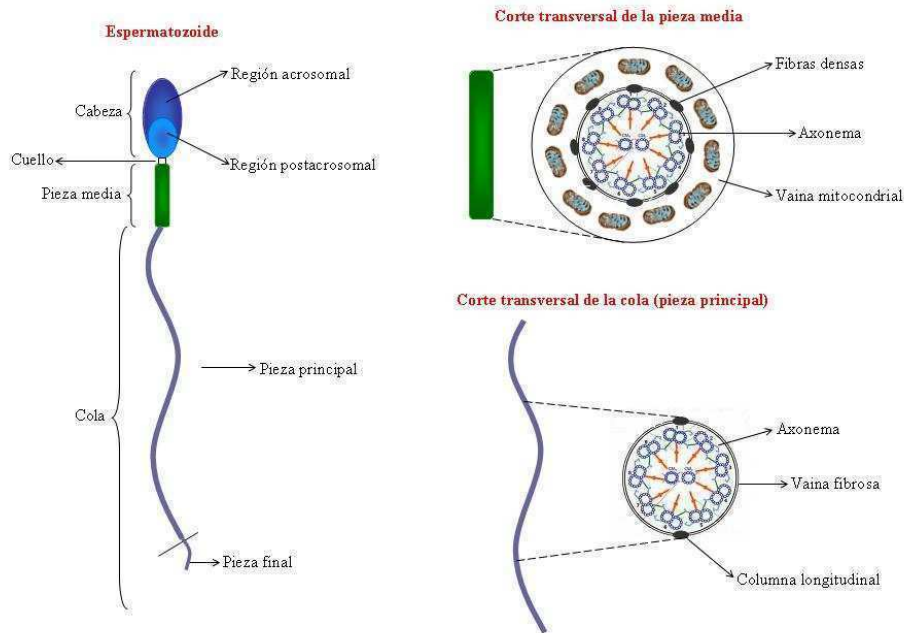
Fue por ello que nos pareció interesante estudiar el proceso de descondensación de la cromatina espermática durante la fertilización e intentar dilucidar cuál o cuáles podrían ser las moléculas responsables de dicho proceso para, de alguna manera, poder extrapolarlo a la clínica y proporcionar una herramienta más para el diagnóstico en parejas con problemas de fertilidad.

### ***El espermatozoide***

El espermatozoide es una célula altamente especializada con características estructurales y funcionales únicas, cuyo objetivo último podría considerarse el transporte de su material genético intacto desde su sitio de producción en el testículo hasta el interior del ovocito. Sin embargo, sería un grave error considerar al espermatozoide como un simple envoltorio de lujo para el ADN paterno. Por ejemplo, se ha demostrado en los primates que el centriolo a partir del cual se genera el sistema microtubular que posibilita tanto el acercamiento de los pronúcleos durante la fertilización como así también la formación del huso mitótico, para las primeras divisiones del cigoto, es de herencia paterna (Sun y col, 2007; Palermo y col, 1997). También existen numerosas evidencias experimentales que sugieren que la calidad del espermatozoide influye normalmente sobre la calidad del embrión (Farhi y col, 2008; Meseguer y col, 2008; Chenoweth 2007).

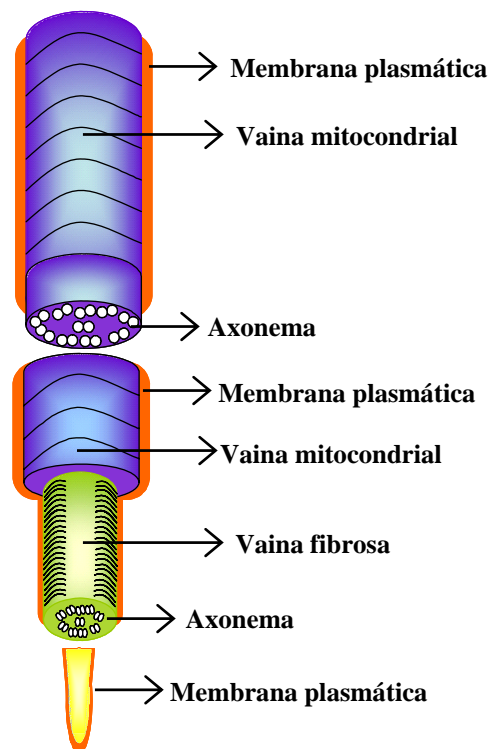
El espermatozoide se encuentra morfológicamente dividido en dos partes: la **cabeza** y la **cola** (Figura 5). La **cola o flagelo** del espermatozoide humano se divide en cuatro regiones: pieza conectora o cuello (0.5  $\mu\text{m}$ ), pieza media (3.5  $\mu\text{m}$ ), pieza principal (50  $\mu\text{m}$ ) y pieza final (3  $\mu\text{m}$ ), alcanzando el espermatozoide un largo total aproximado de 60  $\mu\text{m}$  (Figura 5).





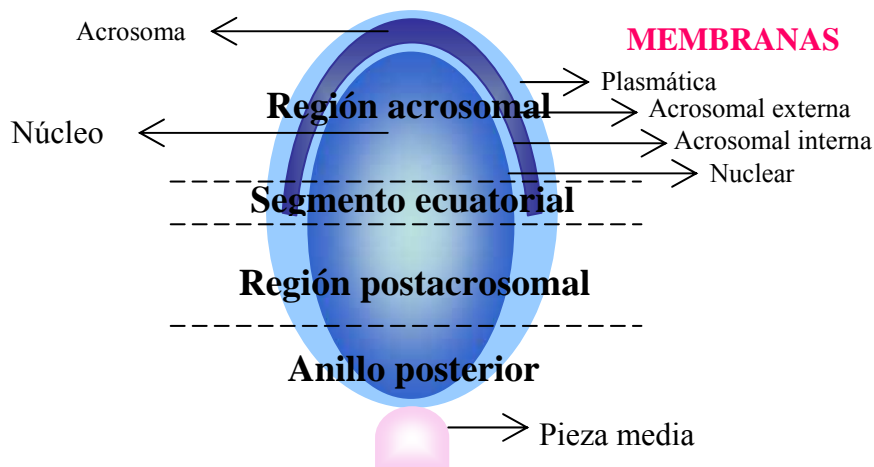
**Figura 5: Esquema de un espermatozoide humano.** Se señalan las principales características estructurales (modificado de Matsumoto y col. 1996). A la derecha de la figura se esquematizan los componentes de la cola en corte transversal a nivel de la pieza media (panel superior) y de la pieza principal (panel inferior).

El **axonema o filamento axial**, compuesto por un par central de microtúbulos rodeado por nueve dobletes, se extiende a lo largo de la totalidad de la cola del espermatozoide constituyendo su aparato motor. Asociadas a cada par de microtúbulos se encuentran las **fibras densas**, que se extienden desde la pieza media hasta algún punto variable de la pieza principal. La **pieza principal** se caracteriza, además, por la presencia de la **vaina fibrosa** formada por dos columnas longitudinales conectadas entre sí por una serie de filamentos, que rodean a los microtúbulos y a las fibras densas asociadas. La pieza media contiene la **vaina mitocondrial**, formada por un número (específico para cada especie) de mitocondrias distribuidas en forma helicoidal alrededor del axonema y que constituye el sitio de obtención de energía del espermatozoide. La **pieza final** está compuesta simplemente por el axonema (Figura 5, Figura 6).



**Figura 6: Esquema del flagelo del espermatozoide** en el que se señalan las estructuras principales que lo conforman (modificado de Amann y col, 1994).

La **cabeza** del espermatozoide comprende al **núcleo** y al **acrosoma** y, en el humano, posee un largo aproximado de 5 a 6  $\mu\text{m}$  y un ancho de 2,5 a 3  $\mu\text{m}$ . Se pueden distinguir en ella dos regiones principales: acrosomal (anterior) y post-acrosomal (posterior), separadas por una zona extremadamente importante y funcionalmente característica: el **segmento ecuatorial** (Figura 7). Rodeando al núcleo del espermatozoide en la región acrosomal, se encuentra una sucesión de cuatro membranas fácilmente identificables por microscopía electrónica: desde afuera hacia adentro, éstas son la membrana plasmática o celular, las membranas acrosomales externa e interna y la membrana nuclear (Figura 7).

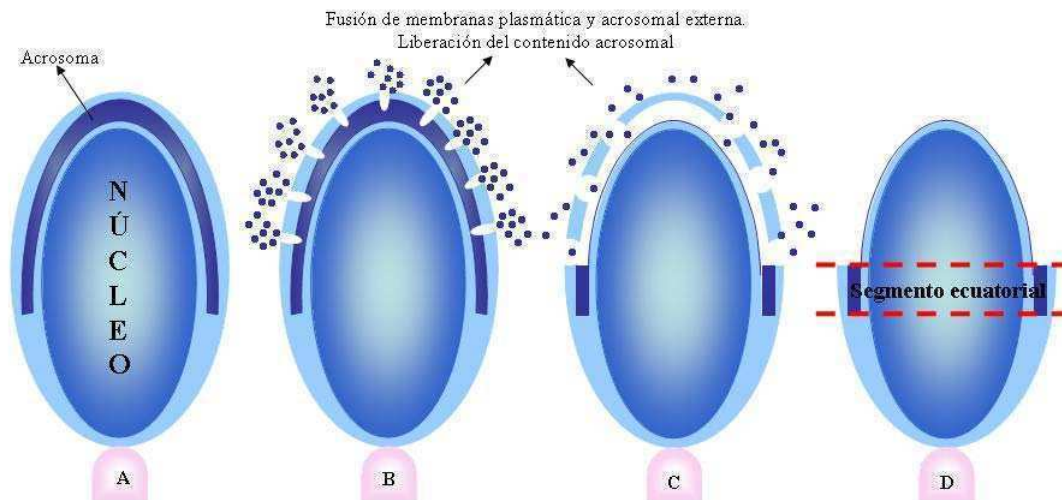


**Figura 7: Estructura de la cabeza del espermatozoide humano.** Se diferencian cuatro regiones: la región acrosomal, el segmento ecuatorial, la región postacrosomal y el anillo posterior. La membrana plasmática recubre la membrana acrosomal externa. La membrana acrosomal interna recubre la envoltura nuclear.

El acrosoma es una vesícula lisosomal que contiene una gran variedad de enzimas líticas, entre las que vale la pena mencionar hialuronidasa y acrosina que, como ya se puntualizara, son fundamentales para que el espermatozoide pueda atravesar las cubiertas externas del ovocito. El segmento ecuatorial es la región a través de la cual se produce la fusión del espermatozoide con el oolema. Su membrana plasmática es muy estable y se cree que podría actuar como barrera impidiendo el pasaje de partículas entre los dominios de membrana de la región anterior y post acrosomal (Curry y Watson, 1995). El **anillo posterior** constituye una barrera física entre los dominios de las membranas plasmática y nuclear.

Se mencionó previamente que cuando el espermatozoide llega a la zona pelúcida del ovocito, se dispara la reacción acrosomal. Este fenómeno excitotónico que permite la liberación de las enzimas líticas presentes en el interior del acrosoma, consiste en la

fusión de la membrana plasmática del espermatozoide y la membrana acrosomal externa (Figura 8), con la consecuente exposición de la membrana acrosomal interna (Wassarman y col, 2008).

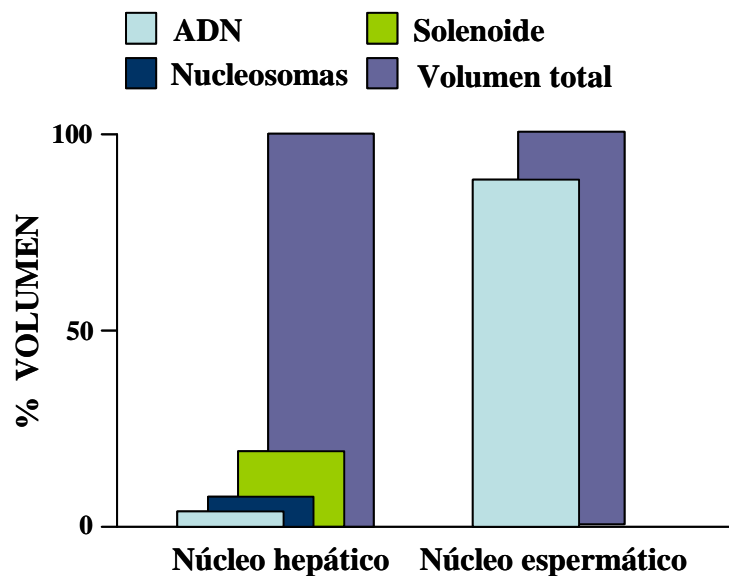


**Figura 8: Esquema de la reacción acrosomal.** **A:** Espermatozoide con acrosoma intacto; **B y C:** Las membranas plasmática y acrosomal externa se fusionan formando poros, permitiendo de esa manera la liberación del contenido enzimático del acrosoma. La reacción acrosomal no involucra al segmento ecuatorial, cuya membrana plasmática intervendrá luego en el proceso de fusión con el ovocito. **D:** Fin de la reacción acrosomal, quedando en la región anterior de la cabeza del espermatozoide expuesta la membrana acrosomal interna.

Pero más importante aún, es que como consecuencia de este proceso excitótico, la membrana plasmática del segmento ecuatorial sufre importantes cambios que le confieren fusogenicidad pudiendo, entonces, fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Yanagimachi, 1981; Yanagimachi, 1988a y 1988b) por lo que se considera a la reacción acrosomal un requisito para que ocurra la fertilización.

### *El núcleo espermático y la organización de su cromatina*

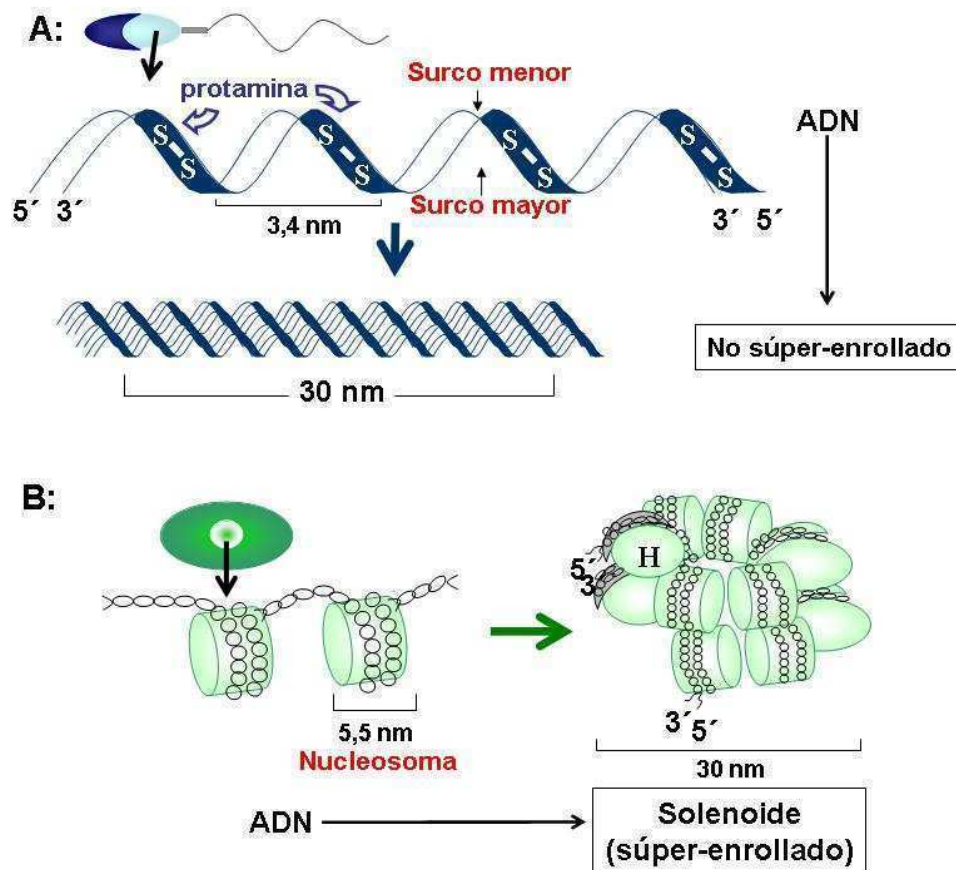
La membrana nuclear de los espermatozoides es diferente a la de otros tipos celulares, reflejando la naturaleza inerte del núcleo con su cromatina altamente condensada y la ausencia de actividad biosintética. Es así que sólo presenta poros nucleares en la región caudal del anillo posterior. Adicionalmente, la separación entre las membranas interna y externa de la envoltura nuclear es de apenas 7 a 10 nm en el núcleo espermático, mientras que en otras células esta distancia varía entre 40 y 60 nm (Curry y Watson, 1995). Además, el volumen nuclear está ocupado casi en su totalidad por cromatina, mientras que en las células somáticas la cromatina ocupa un 20 – 30% del volumen total del núcleo (Figura 9).



**Figura 9:** Esquema comparativo de la fracción del núcleo ocupada por ADN y cromatina en un espermatozoide y una célula somática, en este caso un hepatocito. (Modificado de Ward y col, 1991)

En consecuencia el volumen nuclear del núcleo espermático es significativamente menor que el del núcleo de una célula somática (aproximadamente seis veces), lo cual

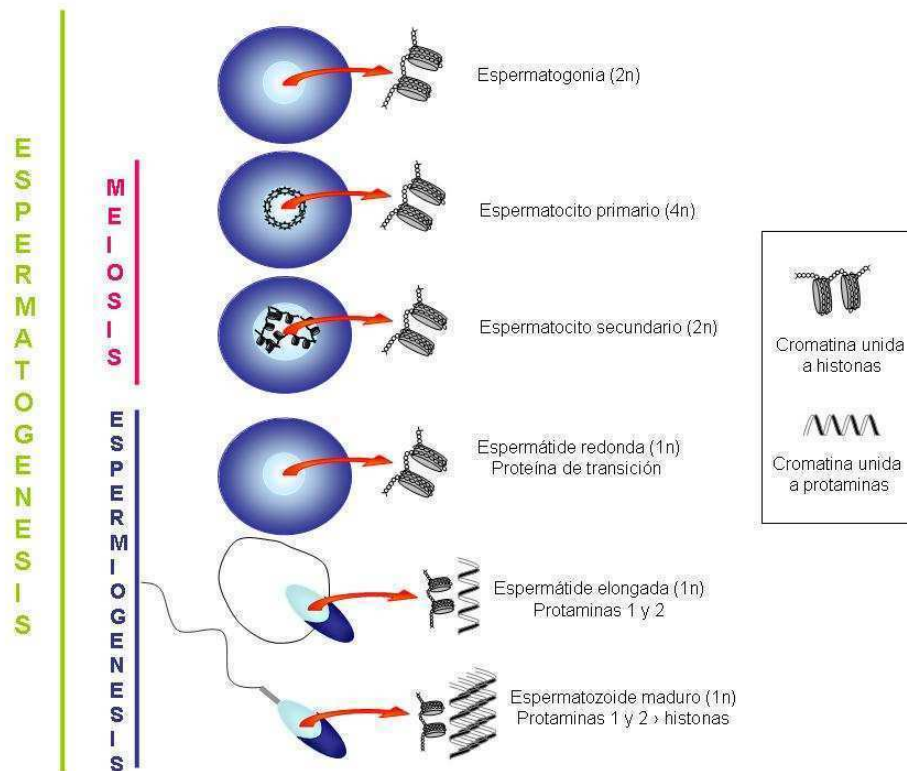
se logra además a través de una organización muy particular de la cromatina, diferente de la de las células somáticas (Figura 10) (Balhorn, 1982; Ward y col. 1991) que genera una cromatina altamente condensada (Dooher y col, 1973; Roosen-Runge, 1962).



**Figura 10: Esquema que compara la organización cromatínica del núcleo del espermatozoide humano (A) con la organización cromatínica del núcleo de una célula somática (B).** Al igual que en la célula somática, la cromatina del espermatozoide se encuentra anclada a la matriz nuclear, de modo tal que los cromosomas no están ubicados al azar dentro del núcleo. De esta manera, por ejemplo, los cromosomas sexuales se encuentran en el extremo anterior del núcleo (al menos en primates). **A:** Las uniones puente disulfuro presentes entre las protaminas hacen que el ADN del núcleo del espermatozoide se compacte 6 veces más que el ADN del núcleo de una célula somática. La organización nuclear es en forma de lámina plegada  $\beta$ . **B:** El núcleo de una célula somática es empaquetado por histonas formando los nucleosomas característicos que constituyen una estructura mucho más laxa que la lámina plegada presente en el espermatozoide: el solenoide (Modificado de Ward WS, 1991).

Este grado de compactación de la cromatina espermática es posible debido a que durante la espermatogénesis testicular, la mayor parte de las histonas cromatínicas

(alrededor del 85% en humanos) es reemplazada por proteínas transicionales y luego por protaminas (Figura 11).



**Figura 11: Esquema del proceso de espermatogénesis.** En el humano, alrededor del 85% de las histonas es reemplazado por protaminas en el primer paso de la espermiogénesis, dando de esa manera, su forma compacta al núcleo del espermatozoide.

Este reempaquetamiento del genoma característico del espermatozoide es iniciado por la síntesis y ubicación de las protaminas en el núcleo durante el último estadio de

espermátide (Balhorn y col, 1984; Bellvé y col, 1975; Goldberg y col, 1977) y culmina cuando las protaminas se unen al ADN desplazando al resto de las proteínas que se encuentran unidas a la cromatina (Yanagimachi, 1994).

Las protaminas son proteínas más pequeñas (50-60 aminoácidos) y más básicas que las histonas y con un alto contenido de residuos de cisteína y arginina que neutralizan muy eficazmente las cargas del ADN y permiten una mayor compactación del mismo. El complejo altamente condensado de protamina – ADN es estabilizado por uniones puente disulfuro intra e intermoleculares entre los residuos de cisteína de las protaminas, confiriendo al núcleo espermático una extraordinaria estabilidad mecánica y química. Esta estabilidad se incrementa aún más por acción del zinc (de origen prostático) presente en el plasma seminal. El zinc se une a los grupos sulfhidrilo libres de las protaminas impidiendo que tenga lugar el intercambio entre estos residuos y los puentes disulfuro ya formados (Yanagimachi, 1994; Kvist, 1980). De esta forma se impediría la descondensación prematura de la cromatina durante el tránsito del espermatozoide por el tracto genital masculino y el femenino antes de incorporarse definitivamente al ooplasma y, además, se protegería al ADN espermático de la acción de agentes mutagénicos y de los efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno.

Se han propuesto dos modelos generales que explican la asociación de las protaminas con el ADN (Bellvé y col, 1983), ambos basados en datos físicos y teniendo en cuenta la ausencia de nucleosomas en el núcleo del espermatozoide. El primero de ellos sugiere que las protaminas están presentes con una configuración extendida; se unen al surco mayor y menor de la hélice de ADN y logran el entrecruzamiento de la cromatina a través de la formación de puentes disulfuro con protaminas en hebras de ADN vecinas. El otro modelo propone que las protaminas se encuentran empaquetadas en cilindros  $\alpha$  – hélice (Warrant y col, 1978), que se alojan en el surco mayor y menor del



ADN para facilitar luego una condensación ordenada del mismo. Subsecuentemente, los cilindros se entrecruzarían con cilindros vecinos a través de puentes disulfuro para efectivizar la estabilización. Ciertos estudios sugerirían que en los espermatozoides de algunos mamíferos, la cromatina forma una estructura de láminas apiladas (Bendet y col, 1972); sin embargo, en el hombre, la organización sería de tipo fibrogranular dispuesta al azar (Koehler, 1972).

Se han descrito dos grupos de protaminas, P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>. Las P<sub>1</sub> están presentes en los espermatozoides de todas las especies y tienen un alto contenido de cisteína y arginina, mientras que las P<sub>2</sub> que están presentes en algunas especies (incluyendo el humano), contienen histidina además de cisteína y arginina y pueden unir Zn<sup>2+</sup>. Más aún, formarían estructuras tridimensionales del tipo “dedos de zinc”, a través de las cuales interactuarían con el ADN (Bench y col, 2000; Pradeepa y col, 2007). Si bien el contenido total de protaminas (P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>) con respecto a la cantidad de ADN es constante para todas las especies, la relación P<sub>1</sub>/P<sub>2</sub> es variable (Corzett y col, 1999; Corzett y col, 2002) y está aparentemente vinculada con el tiempo necesario para que pueda llevarse a cabo la descondensación nuclear. Aquellas especies que contienen P<sub>2</sub> además de P<sub>1</sub> parecerían descondensar el núcleo más rápido, sugiriendo que P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> difieren en el grado de estabilidad que confieren a la cromatina (Tabla 1) (Perreault y col, 1987; Perreault, 1990).

<b>Especie</b>	<b>Protaminas</b>	<b>Descondensación (min)</b>
<b>Humano</b>	1 y 2 (50%)	15
<b>Mono</b>	1 y 2	30
<b>Ratón</b>	1 y 2 (67%)	30
<b>Chinchilla</b>	1 y 2	45-60
<b>Hámster sirio</b>	1 y 2 (33%)	45-60
<b>Hámster armenio</b>	1	>60
<b>Hámster chino</b>	1	>60
<b>Rata</b>	1	>60
<b>Toro</b>	1	>60

**Tabla 1: Diferencias interespecie en el contenido de protaminas espermáticas y el tiempo de descondensación nuclear en ovocitos de Hámster sirio.** La proporción de protamina 2 (si se conoce), se da entre paréntesis. (Modificado de Perreault, 1990).

La importancia de una adecuada interacción protamina /ADN espermático en el proceso de fertilización ha quedado confirmada por la observación que ratones “knock-out” para  $P_1$  o  $P_2$  son infértiles (Cho y col, 2001). En el hombre, se ha documentado la presencia de una relación  $P_1/P_2$  alterada o incluso la ausencia de  $P_2$  en individuos infértiles (Belokopytova y col, 1993; Yebra y col, 1993). Asimismo, se ha descrito que una deficiencia de zinc en semen y, potencialmente, en la cromatina espermática y alteraciones que interfieren con la remoción de las histonas o con el proceso precursor de protamina 2, son factores que conducirían a infertilidad masculina (Balhorn y col, 1988; Blanchard y col, 1990; Kvist y col, 1988; Bach y col, 1990). Más aún, una

publicación reciente (Iguchi y col, 2006) describe la presencia de un polimorfismo de nucleótido único en el gen de P<sub>1</sub> en un pequeño grupo de pacientes infértiles.

Por otra parte, el eyaculado comúnmente contiene cantidades variables de espermatozoides que no han reemplazado la mayoría de sus histonas o proteínas transicionales por protaminas (Tanphaichitr y col, 1978; Chevaillier y col, 1987; Gatewood y col, 1987). Estos núcleos que contienen cantidades anormales de histonas, se conocen generalmente como núcleos inmaduros (Kramer y col, 1997) y se ha observado que el eyaculado de hombres infértiles contiene una mayor proporción de los mismos que el de hombres fértiles (Foresta y col, 1992; Auger y col, 1993).

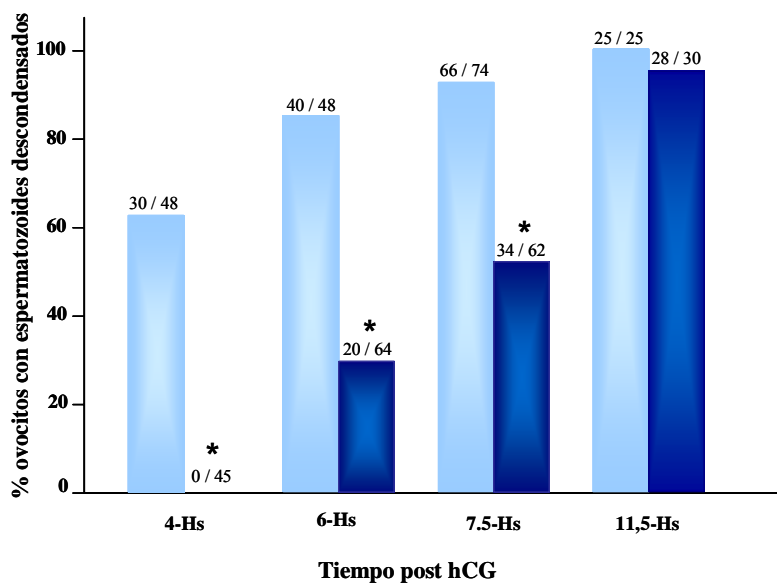
Se cree que la relación entre la deficiencia de protaminas y la infertilidad se encuentra vinculada a un ADN menos protegido, más susceptible a la acción nociva de las especies reactivas de oxígeno (ROS) o a la existencia de un incremento en la fragmentación del ADN como consecuencia de la falta de compactación (Agarwal y col, 2004; Shamsi y col, 2008).

### ***La descondensación del núcleo espermático***

El núcleo del espermatozoide, a pesar de su alta resistencia, se descondensa rápidamente luego de su entrada al ooplasma (Jager, 1990). La reducción de los puentes disulfuro sería el primer evento en la descondensación del núcleo espermático en el ovocito y se ha demostrado en distintas especies que este fenómeno ocurre gracias a la acción del glutatión (GSH) presente en el ooplasma (Liu y Baker, 1992) y que constituiría el paso limitante en el proceso de descondensación nuclear (Perreault, 1990). Cuando se inyectan núcleos aislados de espermatozoides de hámster en ovocitos homólogos, éstos normalmente requieren de 45 a 60 minutos para descondensarse (Perreault y col, 1987); sin embargo, si los núcleos espermáticos son pobres en puentes disulfuro como

consecuencia de haber sido tratados con agentes tiorreductores previamente a la inyección, se descondensan en 5 a 10 minutos. Resulta interesante también que la descondensación de núcleos pobres en puentes disulfuro no se bloquea al disminuir la temperatura de incubación a 4°C, como sucede con la descondensación de núcleos ricos en puentes disulfuro (Perreault y Zirkin, 1983), sugiriendo la posible participación de algún mecanismo enzimático en el proceso de tiorreducción.

El contenido de GSH en el ovocito maduro (metafase II) es significativamente mayor que en el ovocito inmaduro en estadio de vesícula germinal (Perreault 1988, 1990). Perreault y col (1990) observaron que la síntesis máxima de GSH en ovocitos de hámster ocurría poco después de la ruptura de la vesícula germinal y que la inhibición de dicha síntesis, mediante el uso de un inhibidor de la  $\gamma$ -glutamyl transferasa (BSO, sulfoximina de butionina), no afectaba la capacidad descondensante de ovocitos maduros (metafase II), que ya presentaban altos contenidos de GSH, pero sí impedía que hubiera descondensación en ovocitos que recién habían sufrido ruptura de la vesícula germinal (Figura 12).

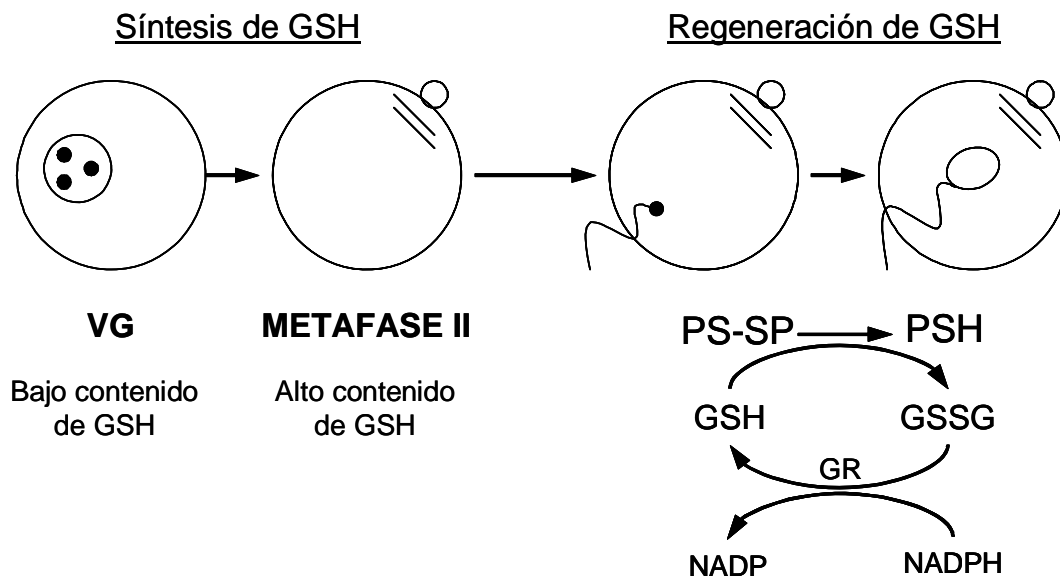


**Figura 12: Efectos del BSO sobre la adquisición de la capacidad descondensante en ovocitos de hámster en distintos estadios de maduración.** Se cosecharon ovocitos a diferentes tiempos luego de la administración de hCG, se preincubaron durante 4 hs. en ausencia (barras celestes) o presencia (barras azules) de BSO (1 mM), y se microinyectaron subsecuentemente con núcleos espermáticos. Se evaluó el estado de los núcleos espermáticos inyectados luego de 1 hora y 25 minutos adicionales de incubación. El número de espermatozoides descondensados se colocó por encima de cada barra y representa la suma de 4 o 5 experimentos separados. \* significativamente distinto del control no tratado con BSO ( $p < 0.01$ ) (Tomado de Perreault, 1988).

Estos resultados sugerían que las tasas de síntesis y degradación de GSH debían ser bajas en el ovocito ya maduro, con lo cual cabía preguntarse cuál sería la importancia para la actividad descondensante de dicho ovocito de los sistemas regeneradores de GSH luego de su oxidación a GSSG. En la mayoría de los sistemas celulares, el GSSG es rápidamente reducido gracias a la acción de la glutatión reductasa, una enzima dependiente de NADPH (Meister y col, 1989) y hay evidencias de que los ovocitos operarían de manera similar para regenerar y mantener el GSH en estado tiol (Wiesel y col, 1981). De hecho, la inhibición de la descondensación nuclear espermática utilizando diamida, agente que oxida al GSH a GSSG, es reversible, sugiriendo que los

ovocitos son capaces de reducir el GSSG a GSH fácilmente (Perreault y col. 1984). Justamente, Perreault y colaboradores (1984) demostraron que la incubación de ovocitos maduros de hámster con iodoacetamida, que bloquea irreversiblemente los grupos SH libres, inhibía en forma dependiente de la dosis a la descondensación de núcleos espermáticos inyectados en el ovocito. Esto les llevó a proponer que el GSH debe ser regenerado de manera continua en el ovocito maduro, para poder mantener los sulfhidrilos de las protaminas en estado reducido el tiempo suficiente como para que los factores ovocitarios responsables de la descondensación tengan acceso a la cromatina espermática. Distinguieron, entonces, dos aspectos importantes con referencia al metabolismo del GSH en el ovocito y su participación en la descondensación del espermatozoide: durante la maduración ovocitaria es relevante la síntesis *de novo* de GSH que permite alcanzar los niveles elevados de GSH que confieren al ovocito su capacidad tiorreductora de las protaminas espermáticas, mientras que en el ovocito maduro prácticamente no hay actividad sintética de GSH y los niveles elevados del mismo se mantienen gracias a la actividad de los sistemas regeneradores de GSH a partir del GSSG (Figura 13).

**MADURACION OVOCITARIA      OVULACION Y FERTILIZACION**




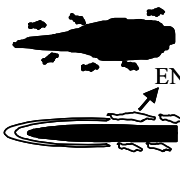



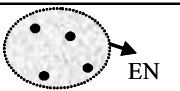

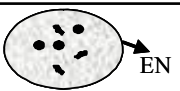

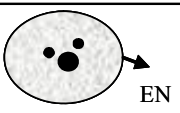
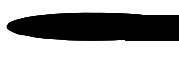


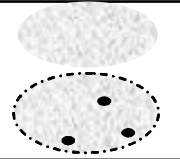


**Figura 13: Hipótesis de la adquisición de la capacidad descondensate del ovocito durante la maduración en mamíferos.** Se necesitaría por un lado la síntesis de GSH luego de la ruptura de la vesícula germinal que proporcionaría niveles elevados de GSH en el interior del ovocito maduro (metafase II) y, por otro, un adecuado sistema regenerador de GSH en el momento de la fertilización, que sería la enzima GSH reductasa (GR) dependiente de NADPH. **PS-SP:** protamina con puente disulfuro. **PSH:** protamina tiorreducida. **GSSG:** glutatión oxidado. (Tomado de Perreault, 1990).

También se han registrado cambios en el contenido de GSH ovocitario como consecuencia de la fertilización. En la rata, por ejemplo, se ha demostrado que el contenido de GSH ovocitario disminuye entre los procesos de descondensación espermática y formación de pronúcleo, hecho que podría deberse a una actividad aumentada de la GGT ( $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa), una de las enzimas que participa en la degradación del GSH (Funahashi 1999). Por otra parte, se ha observado en porcinos, que el contenido de GSH en ovocitos maduros e inseminados es menor que el contenido de GSH en ovocitos maduros pero no inseminados, lo cual podría deberse a un bloqueo de la síntesis de GSH inducido por la penetración del espermatozoide, o podría estar

simplemente reflejando la utilización del GSH para descondensar a los espermatozoides que han penetrado (Yoshida 1993).

Usui y Yanagimachi (1976) demostraron que la capacidad del ovocito para descondensar al espermatozoide y promover la formación del pronúcleo varía a lo largo del desarrollo ovocitario, desde el estadio de vesícula germinal hasta la fertilización. Si bien observaron la desintegración de las envolturas intrínsecas del espermatozoide en ovocitos en todos los estadios hasta el de dos células, la velocidad de descondensación de la cromatina y formación del pronúcleo fue influenciada marcadamente por el estadio en que se encontraba el ovocito en el momento en que fue penetrado por el espermatozoide (Tabla 2). En ovocitos en estadio de vesícula germinal, el núcleo del espermatozoide permaneció condensado; en ovocitos en prometafase I, se produjo una descondensación parcial de la cromatina del espermatozoide; en ovocitos en metafase-anafase I, la mayoría de los espermatozoides se descondensó y finalmente, en ovocitos maduros en estadio de metafase II, se observó descondensación más rápida y formación del pronúcleo masculino. En virtud a los cambios observados, estos autores sugirieron que existe un cambio a nivel madurativo del citoplasma del ovocito que se manifiesta en un aumento de la capacidad del ovocito para descondensar la cromatina espermática y convertirla en el pronúcleo masculino con la maduración ovocitaria. Los ovocitos fertilizados en estadio de pronúcleo o en estadio de 2 a 4 células no mostraron actividad descondensante, pero sin embargo se observó descondensación de la cromatina espermática en aquellos ovocitos que fueron penetrados justo antes del primer clivaje. Estos autores proponen, por lo tanto, que los factores responsables de la descondensación espermática no se encontrarían presentes o por lo menos no se encontrarían presentes de manera activa en el citoplasma del ovocito en todos los estadios sino que aparecerían (o se activarían) sólo en algún punto del ciclo celular.



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

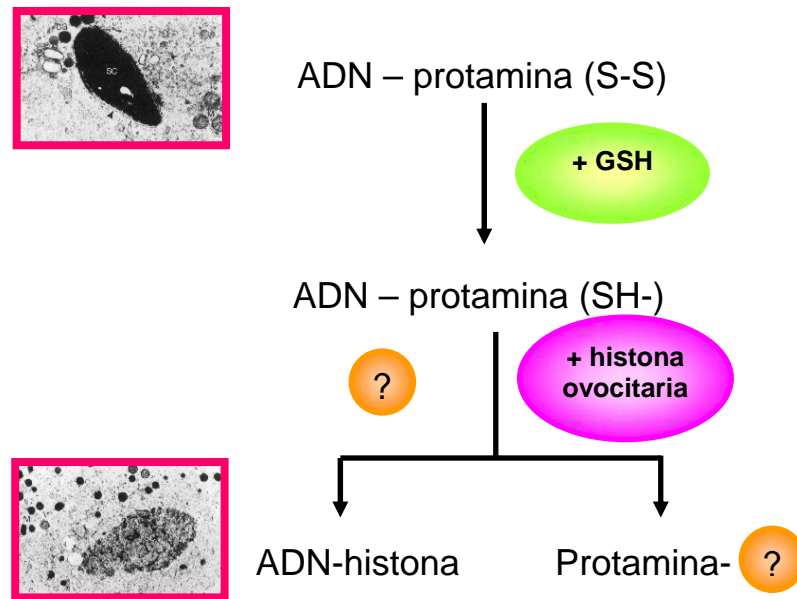
**Tabla 2: Cambios en el núcleo del espermatozoide incorporado en el interior del ovocito en varios estadios de maduración y desarrollo temprano. VG:** vesícula germinal; **VG Cond:** vesícula germinal condensada que contiene cromatina condensada; **Promet:** prometafase; **Met:** metafase; **Ana:** anafase; **Tel:** telofase; **Masa crom:** masa de cromatina; **EN:** nueva envoltura nuclear (Tomado de Usui y Yanagimachi, 1976).

Vale la pena mencionar aquí que, si bien un sólo espermatozoide necesita ser descondensado *in vivo*, cuando se lleva a cabo la fertilización *in vitro* de ovocitos de hámster sin zona pelúcida, cada ovocito puede descondensar alrededor de 50 espermatozoides (Hirao y col, 1979). Se podría especular que el núcleo del espermatozoide que fertiliza le presenta un reto oxidativo al ovocito vía una rápida

depleción de los niveles de GSH y que esto podría causar una estimulación compensatoria de la actividad de la GSH reductasa. De esta manera, el primer espermatozoide podría intensificar la capacidad del ovocito para descondensar un espermatozoide adicional.

Si bien no cabe duda de que la tiorreducción de las protaminas constituye un evento clave en el proceso de descondensación cromatínica *in vivo*, no es suficiente para promover el intercambio de protaminas espermáticas por histonas ovocitarias. En algunas especies, como por ejemplo el hámster, se ha propuesto un mecanismo enzimático (Marushige y Marushige, 1975; 1978; Zirkin y Chang, 1977, Zirkin y col, 1982) con participación de una proteasa de origen ovocitario que degradaría las protaminas básicas del núcleo espermático. La intervención de una enzima en el proceso de descondensación se vería apoyada por el hecho que en algunas especies se ha observado una disminución en el grado de descondensación espermática alcanzado al disminuir la temperatura de incubación de los 37 °C a temperatura ambiente o a 4 °C (Perreault, 1990).

Por otra parte, se ha sugerido la participación de una macromolécula con fuerte carga negativa que pueda competir con el ADN por las protaminas, y actuar como aceptora de las mismas, posibilitando así el reemplazo de las protaminas espermáticas por histonas ovocitarias (Figura 14).



**Figura 14:** Esquema en el que se señalan las etapas del proceso de descondensación del espermatozoide humano *in vivo*. ? Molécula propuesta como aceptora de protaminas (nucleoplasmina, heparina, GAGs).

Se ha demostrado, en algunos peces, en anfibios y en *Drosophila melanogaster*, que la nucleoplasmina, que es una chaperona molecular que interviene en el ensamblaje de los nucleosomas a partir de ADN y de histonas (Laskey y col, 1978; Philpott y col, 1992; Philpott y col, 2000; Prado y col, 2004; Frehlick y col, 2007) y que está presente en gran cantidad en el ovocito (Mills y col, 1980; Krohne y col, 1980; Philpott y col, 1991), es responsable de la descondensación cromatínica del espermatozoide (Ohsumi y Katagiri, 1991; Philpott y col, 1991; Kawasaki y col, 1994). Sin embargo, este hallazgo no ha podido hacerse extensivo a los mamíferos, incluido el hombre. Aunque se ha encontrado nucleoplasmina en el ovocito de ratón, la misma no sería necesaria para el proceso de descondensación espermática ya que los espermatozoides procedentes de ratones “knock-out” se descondensan normalmente (Burns y col, 2003).

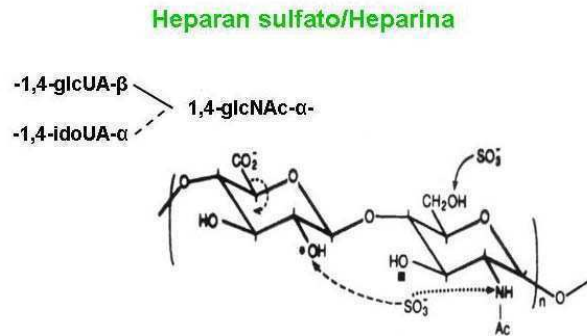
La descondensación de la cromatina del espermatozoide humano *in vitro* puede inducirse de varias maneras, y de hecho todas ellas se han utilizado en la clínica para tratar de desarrollar ensayos de evaluación de la capacidad descondensante del espermatozoide. Pueden utilizarse agentes farmacológicos tales como SDS / DTT o SDS / EDTA (Liu y col, 1987; Gopalkrishnan y col, 1991), agentes fisiológicos como heparina y GSH (Reyes y col, 1989) e incluso extractos de ovocitos de diferentes especies animales, como por ejemplo, erizo de mar, sapo y ratón (Delgado y col, 1982; Maleszewski, 1990; Shimada y col, 2000). La posibilidad de usar extractos ovocitarios de otras especies pone de manifiesto un concepto importante: en el proceso de descondensación espermática *in vivo* estarían interviniendo moléculas que no son específicas de especie.

En el afán de dilucidar cuáles podrían ser *in vivo* las moléculas responsables de la descondensación espermática, resulta particularmente interesante como modelo el sistema de descondensación *in vitro* con heparina + GSH, ya que ambos son agentes fisiológicos, presentes en el organismo y, si bien no existe duda de la participación del GSH como agente tiorreductor en el proceso de descondensación, el papel de la heparina es aún motivo de controversia. Algunos autores sostienen que la heparina se une a la membrana de los espermatozoides (Delgado y col, 1982) a través de una interacción de tipo ligando-receptor (Delgado y col, 1982; Handrow y col, 1984; Lulich y col, 1989; Lasalle y Testart, 1992) que resultaría en la desestabilización de la membrana plasmática, y permitiría de esta manera la entrada de otros compuestos (como por ejemplo el GSH) al espermatozoide (Delgado y col, 1982; Reyes y col, 1984). Otros autores proponen, en cambio, un efecto directo de la heparina sobre la cromatina del espermatozoide, ya que se ha demostrado que la heparina posee una fuerte afinidad por las protaminas y es capaz de combinarse con éstas formando un

complejo insoluble (Chargaff y Olson, 1938). Sin embargo, ninguna de las evidencias existentes es directa y contundente y poco se sabe en realidad del papel de la heparina en el proceso de descondensación nuclear. En los últimos años, Delgado y otros autores (Delgado y col, 1999; Delgado y col, 2001; Reyes y col, 2001; Sánchez-Vázquez, 2008) han desarrollado un modelo para estudiar el mecanismo de la descondensación del núcleo espermático *in vitro* utilizando una estructura cromatínica altamente organizada, el nucleón, aislada a partir de espermatozoides de distintas especies. Utilizando nucleones de toro, Delgado y colaboradores demostraron la importancia de la heparina en el proceso de descondensación nuclear (Delgado y col, 2001), apoyando la hipótesis de una acción directa de la heparina sobre la cromatina.

Algunos autores han propuesto que, también *in vivo*, la heparina podría ser responsable de la descondensación cromatínica (Lalich y col, 1989; Montag y col, 1992), pero esto sería poco probable debido a que no habría heparina en el complejo cúmulus – ovocito ya que la única célula capaz de sintetizar heparina *in vivo* es el mastocito (Feyerabend y col, 2006; Hagner-Mcwhirter y col, 2000).

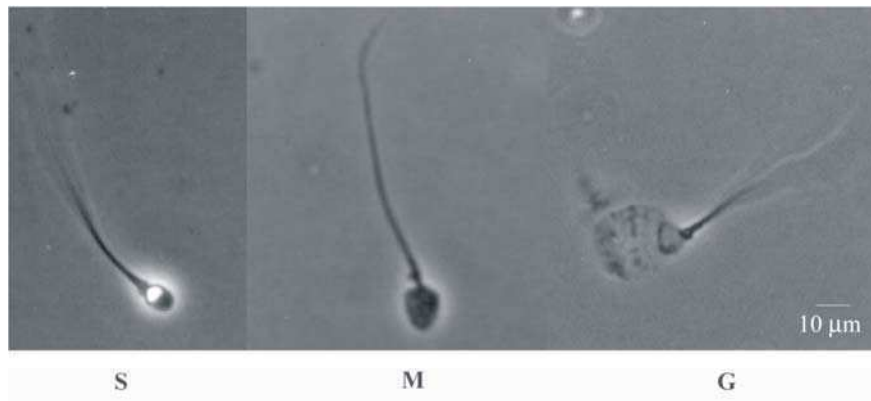
Por otra parte, existen en la literatura numerosas evidencias de la presencia de otros glicosaminoglicanos (GAGs) en el complejo cúmulus – ovocito en distintas especies (Gebauer y col, 1978; Salustri y col, 1989; Ball y col, 1982; Bellin y Ax, 1984) incluyendo al heparán sulfato (HS), análogo estructural de la heparina, que en la mayoría de los sistemas biológicos estudiados posee acciones biológicas equivalentes a las de la heparina (Figura 15) (Delgado y col, 1982; Jackson y col, 1991; Rosemberg y col, 1997; Yanagishita y Hascall 1992a). Evidencias experimentales acumuladas en nuestro laboratorio nos llevaron a plantear hace unos años la hipótesis que el HS podría actuar como aceptor de protaminas durante la descondensación cromatínica del espermatozoide humano *in vivo* (Romanato y col, 2003).



**Figura 15: Estructura química del disacárido base que constituye la heparina y el heparán sulfato.** En esta figura se puede observar claramente la similitud estructural que existe entre ambas moléculas.

### ***El heparán sulfato como posible aceptor de protaminas***

En nuestro laboratorio se estudia desde hace varios años la descondensación nuclear del espermatozoide humano *in vitro* en presencia de heparina y GSH, con el objeto de dilucidar el papel de la heparina en este proceso. El ensayo de descondensación nuclear en presencia de heparina y GSH originariamente descrito por Reyes y colaboradores (Reyes y col, 1989) fue modificado en nuestro laboratorio (Romanato y col, 2003) y utilizado para evaluar la actividad descondensante de la heparina y otros glicosaminoglicanos. Este ensayo permite distinguir por observación al microscopio de contraste de fase tres estadios de descondensación diferentes del núcleo espermático: S (espermatozoides Sin cambios), M (espermatozoides Moderadamente descondensados) y G (espermatozoides Groseramente descondensados) (Figura 16). De esta manera, se expresa la descondensación alcanzada en una situación experimental determinada como la suma de los porcentajes de formas M y G

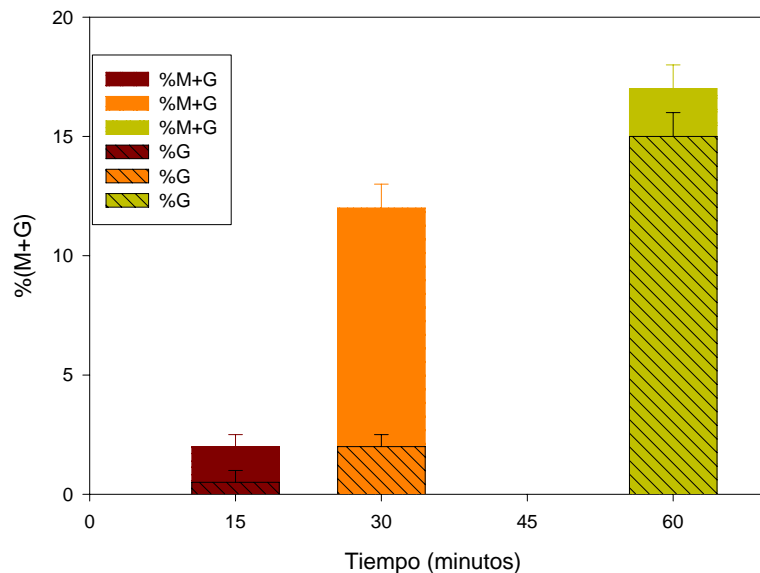


**Figura 16: Estadios de descondensación del espermatozoide humano observado al microscopio de contraste de fase. S:** espermatozoide sin cambio, **M:** espermatozoide moderadamente descondensado y **G:** espermatozoide groseramente descondensado. Aumento: 400X.

La Figura 17 muestra la cinética de descondensación nuclear característica obtenida al incubar espermatozoides humanos previamente capacitados en presencia de heparina y GSH. Se evaluó el estado de descondensación al cabo de 15, 30 y 60 minutos de incubación y en el gráfico se representan las formas S, M y G a cada uno de los tiempos evaluados. Las barras lisas corresponden al porcentaje de descondensación total (M+G) alcanzado en cada tiempo, mientras que las barras rayadas corresponden al porcentaje de formas G. Se observa claramente que la mayoría de los espermatozoides que no llegaron a descondensarse a los 30 minutos de incubación, ya no lo harán, debido a que el total de formas descondensadas (M+G) aumenta muy poco entre los 30 y 60 minutos; mientras que la mayoría de las formas M observadas a los 30 minutos pasa a formas G a los 60 minutos.

El prolongar la incubación de 30 a 60 minutos permite que prácticamente todos aquellos espermatozoides que han comenzado a descondensarse en la primera media hora puedan

hacerlo por completo. Consideramos entonces como parámetro de descondensación máxima alcanzada el porcentaje de M+G a los 60 minutos.

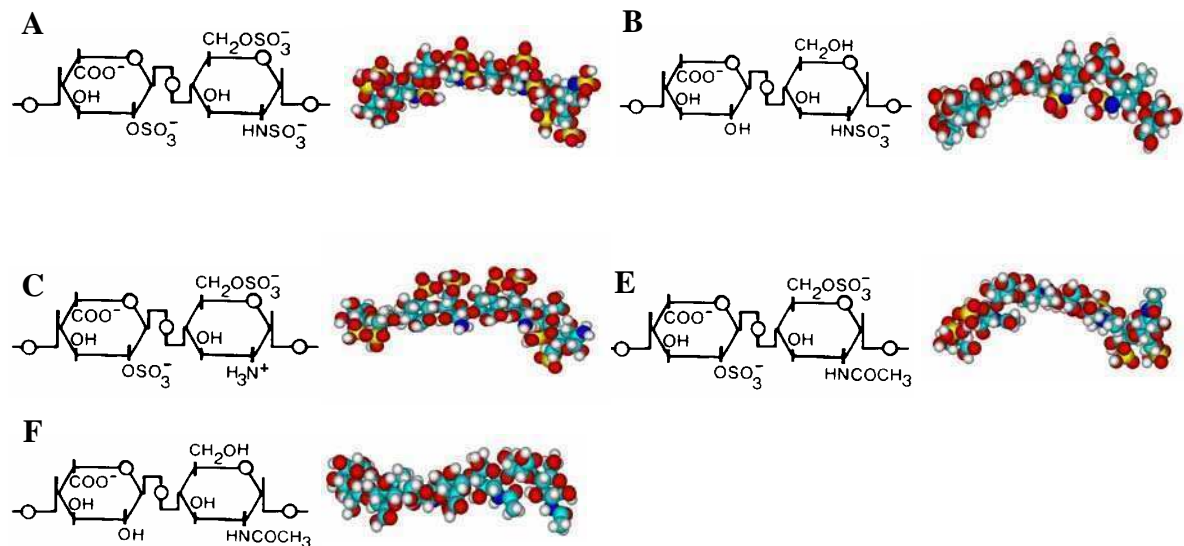


**Figura 17: Cinética de descondensación *in vitro* de espermatozoides humanos capacitados en presencia de heparina y GSH.** Las barras lisas representan la suma de los porcentajes de formas M y formas G, y las barras rayadas representan los porcentajes de formas G solamente.

Para comenzar a entender cómo y por qué la heparina actúa como descondensante espermático *in vitro*, en una primera instancia se estudió el efecto producido por cambios estructurales en la molécula de heparina sobre su actividad descondensante, ya que existen numerosas evidencias en la literatura y en otros sistemas biológicos, que demuestran que dichos cambios inducen modificaciones en su actividad biológica (Jackson col, 1991; Bertolesi y col, 1997). A este efecto, se evaluó la actividad descondensante *in vitro* de espermatozoides humanos capacitados, utilizando heparinas químicamente modificadas mediante desulfatación parcial: heparina parcialmente O-desulfatada (O-des), heparina parcialmente N-desulfatada (N-des), heparina parcialmente N-desulfatada N-acetilada (N-des N-ac) y heparina parcialmente O/N-desulfatada N-acetilada (O/N-des N-ac). La O- o N-desulfatación y N-acetilación



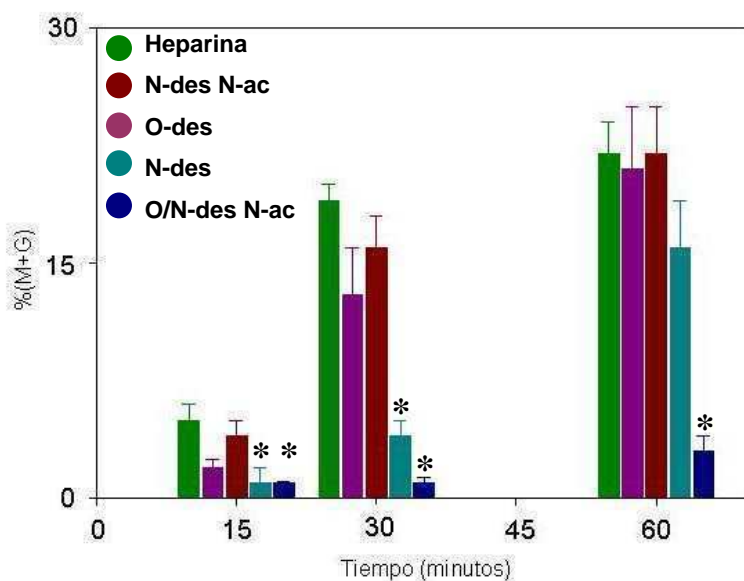
alteran no sólo la carga neta de la unidad disacáridica sino también la localización de las cargas positivas y negativas en la misma (Figura 18).



**Figura 18: Estructura química de las unidades disacáridicas que constituyen la heparina y las heparinas químicamente modificadas. A:** Heparina; **B:** heparina O – des; **C:** heparina N – des; **D:** heparina N – des N – ac y **E:** heparina O/N – des N – ac. Modelado molecular realizado con el programa Hyperchem 7.5 (Hypercube, Inc).

La actividad descondensante de la heparina se vio fuertemente afectada por la sulfatación de la molécula (Figura 19), y los resultados obtenidos sugirieron que se trata no sólo de un efecto de carga neta sino que también es importante la posición de las cargas en la unidad disacáridica (Romanato y col, 2003). Indudablemente, esto sería consecuencia de que la localización de las cargas en las unidades disacáridicas de la molécula determina las interacciones electrostáticas entre los grupos cargados por lo que si estas se modifican, se inducen cambios conformacionales en la molécula que podrán verse reflejados en su actividad biológica. Es de interés observar que N-des fue menos activa que O-des, lo cual está en desacuerdo con la idea general que la N-

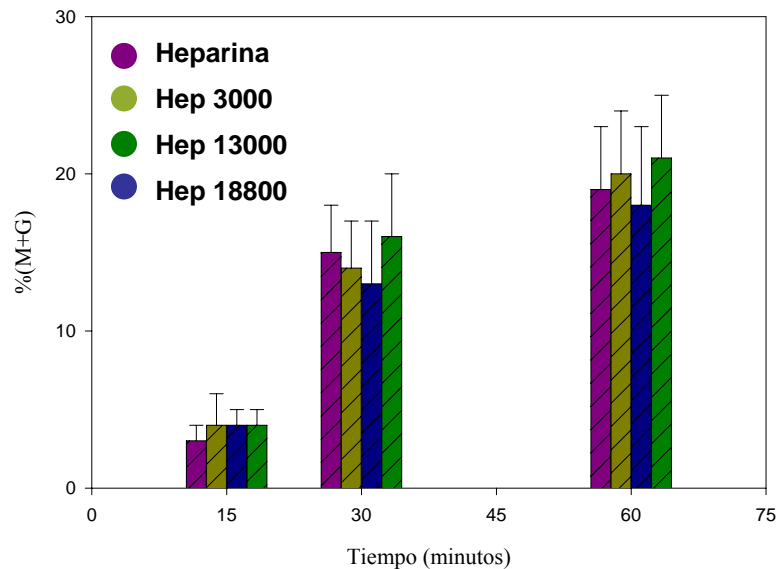
sulfatación es importante para la actividad biológica de la heparina (Bertolesi y col, 1997; Lindahl y Kjellen, 1991). También vale la pena mencionar que O/N-des N-ac resultó inactiva, al igual que en todos los sistemas biológicos en que se la ha probado hasta el momento (Bertolesi y col, 1994; Bertolesi y col, 1995; Bertolesi y col, 1997).



**Figura 19: Descondensación *in vitro* de espermatozoides capacitados en presencia de heparina o heparinas químicamente modificadas y GSH. N-des:** parcialmente *N*-desulfatada; **O-des:** parcialmente *O*-desulfatada; **N-des N-ac:** parcialmente *N*-desulfatada *N*-acetilada; **O/N-des N-ac:** parcialmente *O/N*-desulfatada *N*-acetilada. %M+G: Descondensación total. \* significativamente diferente de la heparina control.

En segundo lugar, teniendo en cuenta que la actividad biológica de los GAGs está en muchos casos asociada al tamaño de la molécula (Fedarko y Conrad, 1986), posiblemente debido a que ciertos fragmentos específicos de ésta puedan ser incorporados en la célula y eventualmente alcanzar el núcleo (Hiscock y col, 1994), o a la posibilidad de una orientación espacial de cargas diferencial en función de la longitud de la molécula, se evaluó la actividad descondensante *in vitro* de tres heparinas de diferente peso molecular (Figura 20). Se encontró que la actividad descondensante de la

heparina era independiente de su peso molecular, por lo menos dentro del rango de pesos moleculares estudiado (3.000-18.800 Da) (Romanato y col, 2003).

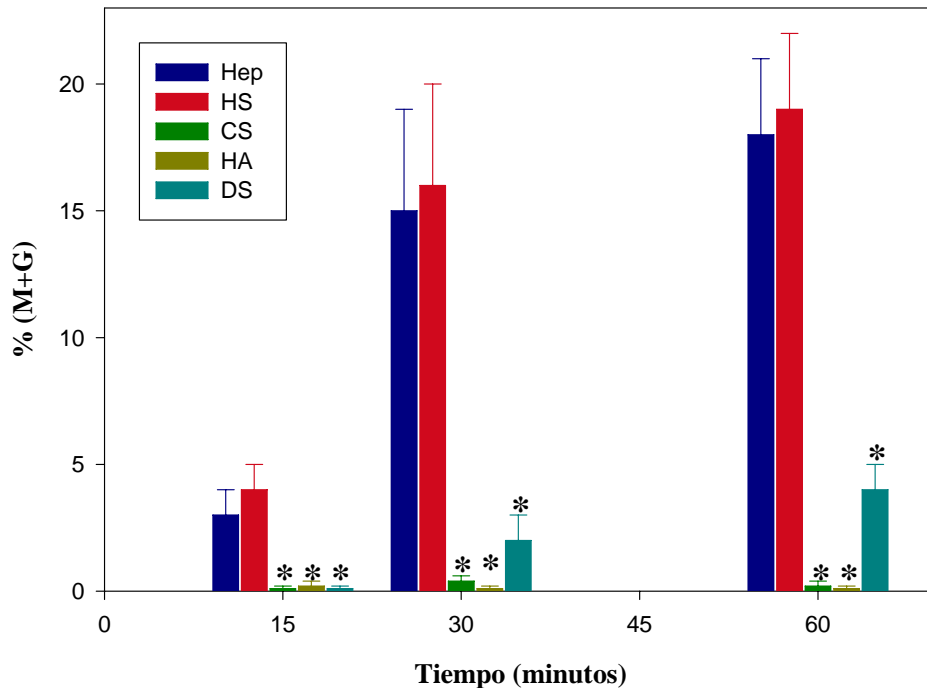


**Figura 20:** Cinética de descondensación *in vitro* de espermatozoides humanos capacitados en presencia de heparinas de diferente peso molecular y GSH. % (M+G): porcentaje de descondensación total.

Habiendo así demostrado que la actividad descondensante de la heparina *in vitro* está efectivamente relacionada con características estructurales de la molécula y no es una actividad inespecífica simplemente vinculada a que la heparina es una macromolécula aniónica con elevada carga neta, que podría simplemente en virtud de su carga competir con el ADN por las protaminas, se evaluó la actividad descondensante *in vitro* de otros GAGs, cuya presencia en el complejo cúmulus-ovocito es conocida, con miras a encontrar un candidato que pudiera estar reemplazando a la heparina *in vivo*. Cabe recordar aquí que, al no encontrarse en el complejo cúmulus-ovocito, la heparina no podría ser el agente descondensante *in vivo*, a diferencia de otros GAGs como el ácido

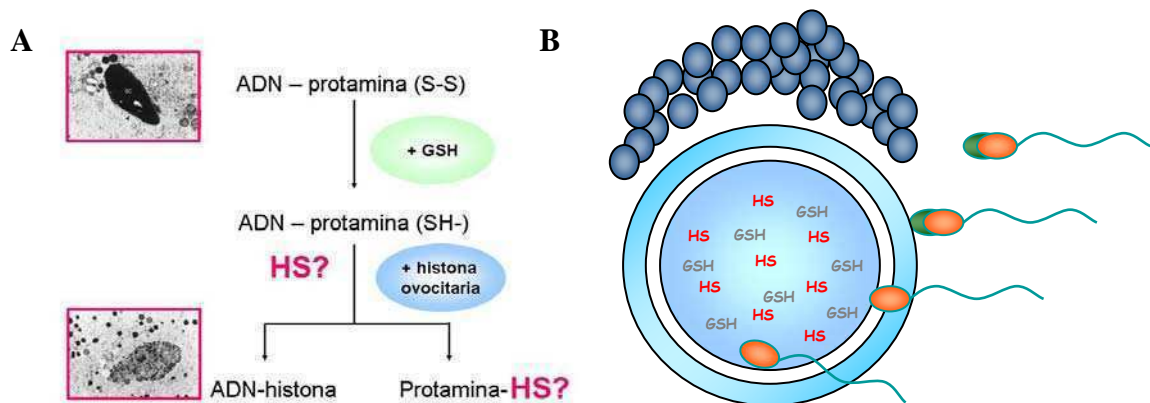
hialurónico (AH), el condroitín sulfato (CS), el heparán sulfato, el dermatán sulfato (DS) y el queratán sulfato que están presentes en el tracto genital femenino, particularmente en el fluido folicular, en varias especies (Yanagishita y col, 1979; Reyes y col, 1984; Thérien y col, 2005) incluyendo la humana (Bellin y col, 1986).

Entre los diferentes GAGs evaluados en este estudio (CS, DS, HS y AH), sólo el HS, análogo estructural de la heparina, mostró actividad descondensante *in vitro*, mientras que el ácido hialurónico, el condroitín sulfato y el dermatán sulfato fueron inactivos (Romanato y col, 2003). Más aún, la actividad descondensante de la heparina y del heparán sulfato fueron similares, a pesar del hecho que el heparán sulfato se encuentra levemente menos sulfatado que la heparina, y posee menor carga negativa neta (Figura 21), reforzando el concepto de una acción biológica específica vinculada con la estructura de la molécula y no simplemente con su carga.



**Figura 21:** Cinética de descondensación *in vitro* de espermatozoides humanos capacitados incubados en presencia de GSH y heparina o diferentes glicosaminoglicanos. HS: Heparán sulfato; CS: Condroitín sulfato; DS: Dermatán sulfato; AH: Acido hialurónico. %M+G: Descondensación total. \* significativamente diferente de la heparina control.

En conjunto, estos resultados nos llevaron a proponer al HS, presente en el complejo cúmulus-ovocito y además análogo estructural de la heparina (Jackson y col, 1991; Bellin y col, 1986; Eriksen y col, 1997), como posible aceptor de protaminas en el proceso de descondensación del núcleo espermático humano *in vivo* (Figura 22). De esta manera, al ingresar al ovocito, el GSH presente en el mismo reduciría los puentes disulfuro de las protaminas de la cromatina del espermatozoide que, una vez reducidas, interactuarían con el heparán sulfato, permitiendo así el reemplazo de dichas protaminas por histonas ovocitarias y completando entonces el proceso de descondensación espermática.



**Figura 22: Esquema en el que se señalan las dos etapas del proceso de descondensación del espermatozoide humano *in vivo*.** **A:** Los puentes disulfuro intra e intermoleculares son reducidos por acción del glutatión reducido (GSH). El HS es la molécula propuesta como aceptor de protaminas. **B:** Esquema representativo de nuestra hipótesis de trabajo. El espermatozoide atraviesa las células del cúmulus y al ponerse en contacto con la zona pelúcida sufre la reacción acrosomal. Luego ingresa al espacio perivitelino y se fusiona con la membrana plasmática del ovocito. Una vez en el interior, el núcleo del espermatozoide al ponerse en contacto con el GSH y el HS allí presentes, descondensaría su cromatina para dar lugar a la formación del pronúcleo masculino propiamente dicho.

Los resultados hasta aquí descritos se obtuvieron utilizando espermatozoides humanos capacitados pero sin embargo, no debemos olvidar que *in vivo*, el espermatozoide que ha ingresado al ooplasma ha sufrido la reacción acrosomal, como consecuencia de lo cual gran parte de su núcleo se encuentra expuesto (ver Figura 8) a las moléculas presentes en el citoplasma del ovocito. Interesados en comprender cómo ocurre la descondensación cromatínica *in vivo* a través de nuestro modelo de descondensación *in vitro*, consideramos importante estudiar la actividad descondensante *in vitro* de la heparina y demás GAGs sobre núcleos aislados a partir de espermatozoides humanos para acercarnos aún más a la situación *in vivo*.

Por otro lado, si bien se ha demostrado la presencia de ácido hialurónico en las células del cúmulus, zona pelúcida y espacio perivitelino, hasta el momento no había evidencias experimentales que indicaran que los GAGs están presentes en el interior del ovocito. Para reafirmar la hipótesis que el heparán sulfato estaría funcionando como agente descondensante *in vivo*, se hacía fundamental documentar su presencia en el ooplasma y corroborar su actividad descondensante del núcleo espermático en ese entorno.

Estas dos carencias fueron los disparadores de los objetivos que se plantearon para este trabajo de tesis.

Objetivos



El objetivo fundamental de este trabajo de tesis fue reunir los datos experimentales que permitieran reforzar la hipótesis que el heparán sulfato funcionaría como aceptor de protaminas durante el proceso de descondensación cromatínica del espermatozoide humano *in vivo*. Para ello, se plantearon 2 objetivos:

**1)** Acercarse a las condiciones *in vivo*, analizando el comportamiento de núcleos aislados de espermatozoides humanos frente a la descondensación con heparina y GSH *in vitro*. Para lograrlo:

**A:** se comparó la cinética de descondensación entre espermatozoides capacitados y núcleos aislados en presencia de heparina y glutatión *in vitro*.

**B:** se analizó el efecto de la sulfatación de la heparina sobre su actividad descondensante *in vitro* en núcleos aislados.

**C:** se evaluó la capacidad de diferentes glicosaminoglicanos presentes en el complejo cúmulus-ovocito de funcionar como aceptores de protaminas *in vitro*.

**2)** Demostrar que el heparán sulfato está presente en el ovocito y estudiar de qué manera efectivamente podría funcionar como agente descondensante, para lo cual:

**A:** se investigó la presencia de heparán sulfato en ovocitos frescos de ratón con el empleo de un colorante catiónico que reconoce específicamente grupos sulfato, y por medio de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos específicos.

**B:** se evaluó la actividad descondensante *in vitro* de ovocitos frescos de ratón en presencia y ausencia de diferentes glicosidasas.

# Materiales y Métodos

## **1. Población estudiada**

Se utilizaron muestras de semen de donantes normospérmicos de acuerdo con los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (1999). Las muestras se obtuvieron por masturbación luego de 36 a 48 horas de abstinencia sexual. Luego de la licuefacción, cada muestra fue sometida a un espermograma de rutina y utilizada dentro de la hora de su obtención.

## **2. Parámetros evaluados en el espermograma**

### **2.1. Concentración**

La concentración de espermatozoides se determinó utilizando una cámara de Neubauer. Para ello se realizó una dilución 1:20 de la muestra y se colocaron 7  $\mu$ l de la misma en la cámara. El número de espermatozoides se determinó mediante observación al microscopio de contraste de fase (Zeiss, Standard 16), (valor normal:  $\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$ ). Simultáneamente se determinó la concentración de células redondas (valor normal:  $\leq 1 \times 10^6/\text{ml}$ ).

### **2.2. Motilidad**

Se determinó el porcentaje y progresión de espermatozoides móviles. Para ello, se colocó una alícuota de semen (10  $\mu$ l) entre porta y cubreobjetos y se observó al microscopio de contraste de fase (Zeiss, Standard 16) a 400 X. Se determinó el porcentaje de espermatozoides móviles sobre un total de 100 a 200 células evaluadas.

Para evaluar la calidad de movimiento de los espermatozoides se determinó el grado de progresión de los mismos utilizando la escala propuesta por Mortimer (1986). Valores normales de motilidad:  $\geq 50\%$ , progresión  $\geq 3$ .

**Progresión 0:** Sin movimiento

**Progresión 1:** Movimiento *in situ*

**Progresión 2:** Movimiento traslativo pero no muy progresivo

**Progresión 3:** Movimiento progresivo con velocidad moderada

**Progresión 4:** Movimiento progresivo con alta velocidad

### **2.3. Viabilidad**

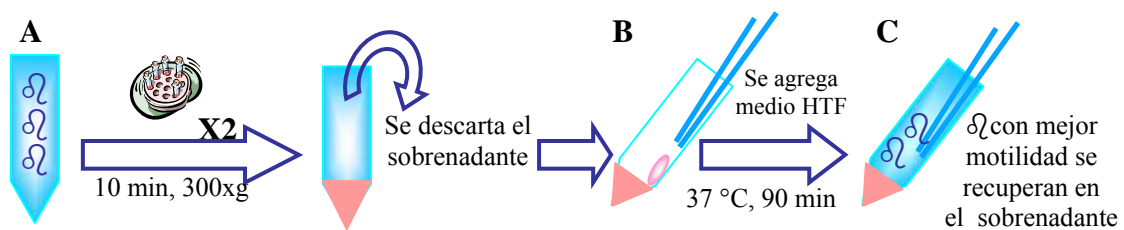
El porcentaje de espermatozoides vivos se determinó utilizando un colorante de exclusión: Eosina Y. Una alícuota de 5  $\mu$ l de espermatozoides se mezcló con una alícuota de 5  $\mu$ l de colorante (0.5 mg / ml en PBS) y se homogeneizó cuidadosamente entre porta y cubreobjetos. Al cabo de dos minutos, se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos (no teñidos de rojo) sobre un total de 200 espermatozoides evaluados mediante observación al microscopio óptico Zeiss Standard 16 (campo claro), a 400 X (Valor normal:  $\geq 70$  % células vivas).

### **3. Procesamiento de las muestras de semen**

Todas las muestras de semen utilizadas fueron procesadas como se describe a continuación, excepto en los casos en que se llevó a cabo el aislamiento de núcleos (Materiales y Métodos, Sección 4).

### 3.1. Obtención de una fracción altamente mótil

Cada muestra de semen se lavó por centrifugación en medio HTF (Human Tubal Fluid: KCl 4.6 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.37 mM; NaCl 90.7 mM; MgSO<sub>4</sub> 1.3 mM; glucosa 2.78 mM; CaCl<sub>2</sub> - 2 H<sub>2</sub>O 1.6 mM; NaHCO<sub>3</sub> 23.8 mM; piruvato de sodio 3.38 mM y lactato de sodio 80.2 mM), durante 10 minutos a 300 xg dos veces para eliminar el plasma seminal. El primer lavado se realizó sólo con HTF, mientras que el segundo lavado se hizo con HTF conteniendo 2.6 % BSA (Albúmina Sérica Bovina). Los espermatozoides así obtenidos se sometieron a la técnica de Swim-up con el objeto de obtener una fracción de espermatozoides altamente móviles. Para ello, se agregó sobre el pellet de espermatozoides, gota a gota, medio HTF suplementado con 2.6 % BSA y se incubaron los espermatozoides durante 90 minutos a 37 °C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> en aire. Al cabo de dicho tiempo se recuperó cuidadosamente el sobrenadante y se calculó la concentración de espermatozoides recuperados y el porcentaje de motilidad (Figura 23).



**Figura 23: Esquema correspondiente a la técnica del Swim-up. A:** se lava la muestra de semen dos veces por centrifugación descartando el sobrenadante. **B:** se coloca el tubo que contiene el pellet de espermatozoides en un ángulo de 45°, se agrega gota a gota y con mucho cuidado medio de cultivo y se incuban en estufa gaseada. **C:** pasado el tiempo de incubación se recupera el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur, en el cual se encuentran los espermatozoides que presentan buena motilidad.

### **3.2. Incubación en condiciones capacitantes**

Los espermatozoides procedentes del Swim-up, luego de ajustar la concentración a  $3 - 5 \times 10^6$  / ml, se incubaron durante 18 horas en tubos cónicos de 15 ml, parcialmente tapados e inclinados en un ángulo de  $45^\circ$  a  $37^\circ\text{C}$  y en una atmósfera de  $5\% \text{CO}_2$  /  $95\%$  aire. Estas condiciones promueven la capacitación espermática (Brackett y col, 1975).

### **4. Obtención de núcleos aislados de espermatozoides humanos**

Debido a que *in vivo* el núcleo espermático se encuentra prácticamente desnudo una vez adentro del ovocito, se procedió al aislamiento de núcleos para poder estudiar en los mismos el proceso de descondensación *in vitro* en condiciones más cercanas a lo que realmente ocurre *in vivo*.

Se aislaron núcleos provenientes de muestras de semen de donantes normospermicos de acuerdo al siguiente protocolo, modificado de Yebra y colaboradores (1993). El semen se lavó tres veces por centrifugación a  $1.620 \text{ xg}$  durante 10 minutos cada vez, en Tris-HCl 50 mM y NaCl 0.15 M, pH 7.2 (10 veces el volumen de la muestra). El pellet se resuspendió en 2.6 ml del mismo buffer conteniendo 1% SDS, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se sonicó 6 veces durante 15 segundos cada vez a 200 W con un sonicador Branson, modelo W140 (Branson Sonic Power Co, Plainyview, NY, USA). Una vez sonicado, el pellet se dividió en dos alícuotas. Cada alícuota se sembró en 4 ml de un colchón de sacarosa 1.1 M en Tris-HCl 50 mM, pH 7.2 y se centrifugó a  $3.500 \text{ xg}$  durante 1 hora. Los pellets obtenidos de dicho colchón se recuperaron y se lavaron dos veces a  $1.620 \text{ xg}$  (10 minutos cada lavado), en Tris-HCl 50 mM, pH 7.2. Se evaluó una posible contaminación de la fracción nuclear con colas espermáticas por

medio de la observación en el microscopio. La remoción efectiva del acrosoma se analizó por inmunocitoquímica con un anticuerpo monoclonal anti-acrosina humana (gentilmente donado por la Dra. Mónica Vázquez-Levín, IBYME). Los núcleos aislados se mantuvieron a 4°C en Tris-HCl 50 mM, pH 7.2 hasta su uso.

#### **4.1 Inmunocitoquímica de espermatozoides y núcleos aislados con un anticuerpo anti acrosina humana.**

La inmunocitoquímica se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Zahn y col. (2002). Espermatozoides enteros y núcleos aislados provenientes de la misma muestra de semen, se lavaron en buffer P1 (PBS, benzamidina 50 mM y  $\beta$ -aminobenzamidina 2 mM) a 400 xg durante 10 minutos. Los pellets se resuspendieron en formaldehído al 2% en PBS (3 veces el volumen del pellet), durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar dos veces en PBS se ajustó la concentración final a 50.000 espermatozoides o núcleos en 10  $\mu$ l. Se colocaron alícuotas de 10  $\mu$ l de cada muestra sobre un portaobjetos y se dejaron secar a 37 °C. Cada preparado se lavó una vez con PBS y las muestras se permeabilizaron por medio de una incubación de 10 minutos en metanol a 4 °C, se lavaron con PBS y se secaron cuidadosamente con papel. Cada muestra se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en solución de bloqueo (10  $\mu$ l por pocillo), conteniendo PBS y Tween-20 al 0.02%. En cada pocillo se agregó el anticuerpo específico anti acrosina humana (C5F11 Sigma) en una dilución 1:500 en PBS-Tween-20 (10  $\mu$ l por pocillo). Luego de una incubación de 60 minutos, cada preparado se lavó con PBS, se secó cuidadosamente con papel y se incubó con un anticuerpo anti IgG de ratón acoplado a rodamina (Cy3 Sigma, gentilmente donado por la Dra. Mónica Vázquez-Levín, IBYME), diluido 1:5.000 en PBS-Tween-20 (10  $\mu$ l por

pocillo), durante una hora a temperatura ambiente. Cada preparado se lavó con PBS, se secó a temperatura ambiente y se montó con una solución de n-propilgalato 0.1M, glicerol 90% en PBS. Los resultados se observaron en un microscopio de fluorescencia Olympus CH2.

## **5. Aislamiento de cromatina de espermatozoides humanos (núcleos desmembranados)**

Los núcleos obtenidos mediante la técnica descrita en el punto 4 se resuspendieron en 1 ml de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8 y MTAB 1% (Bromuro de metildodecil trimetil amonio) y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno a 3000 rpm en Tris-HCl 10 mM y NaCl 0.9%, pH 8 y los núcleos así demembrados se resuspendieron en medio HTF para realizar posteriormente el ensayo de descondensación.

## **6. Ensayo estándar de descondensación espermática**

### **6.1 Descondensación de espermatozoides enteros**

Espermatozoides capacitados según se detallara anteriormente (sección 3.2) durante 18 horas, se centrifugaron a 300 xg durante 10 minutos y se descartaron los sobrenadantes. Se resuspendió el pellet en 1 ml de HTF-BSA 2.6% y se llevó a cabo el ensayo de descondensación. Para ello se incubaron 100 µl de espermatozoides con 10 µl de heparina 46 µM y 10 µl de glutatión reducido (GSH) 10 mM (concentraciones finales) durante 15, 30 y 60 min a 37 °C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> en aire. Los controles negativos del experimento fueron espermatozoides incubados en presencia de heparina

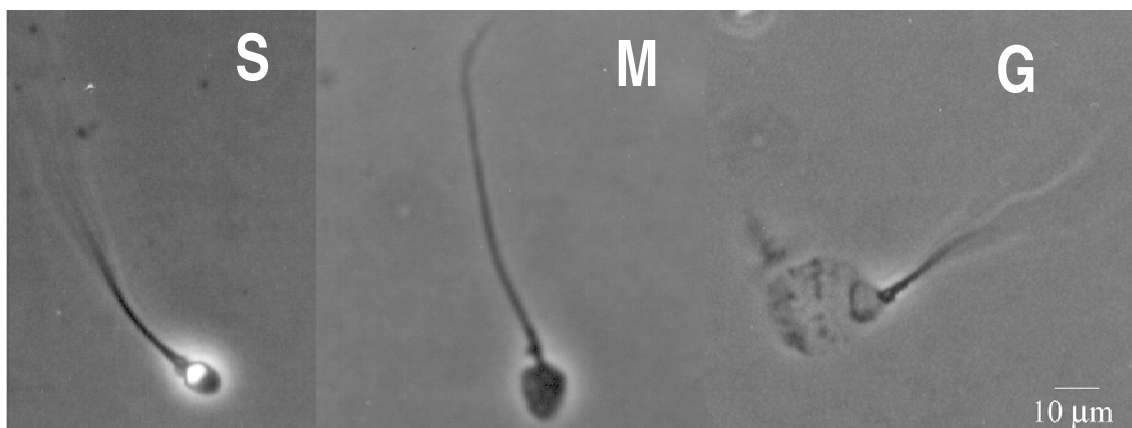


o GSH solamente. A cada uno de los tiempos evaluados se fijó una alícuota de muestra (20  $\mu$ l) con el mismo volumen de glutaraldehído al 2.5% en PBS y se observó el porcentaje de espermatozoides descondensados al microscopio de contraste de fase (Olympus CK2) a 400 X. Se evaluaron entre 100 y 200 células por alícuota. Se distinguieron tres estadios de descondensación (Figura 24):

**S (Sin cambios):** La cabeza del espermatozoide mantiene su forma y tamaño intactos y continúa con su aspecto refringente característico.

**M (Moderadamente descondensado):** La cabeza del espermatozoide comienza a aumentar de tamaño, pierde su refringencia y tiene aspecto más granular.

**G (Groseramente descondensado):** La cabeza del espermatozoide presenta un tamaño muy aumentado, aspecto granular característico y prácticamente no se ve.



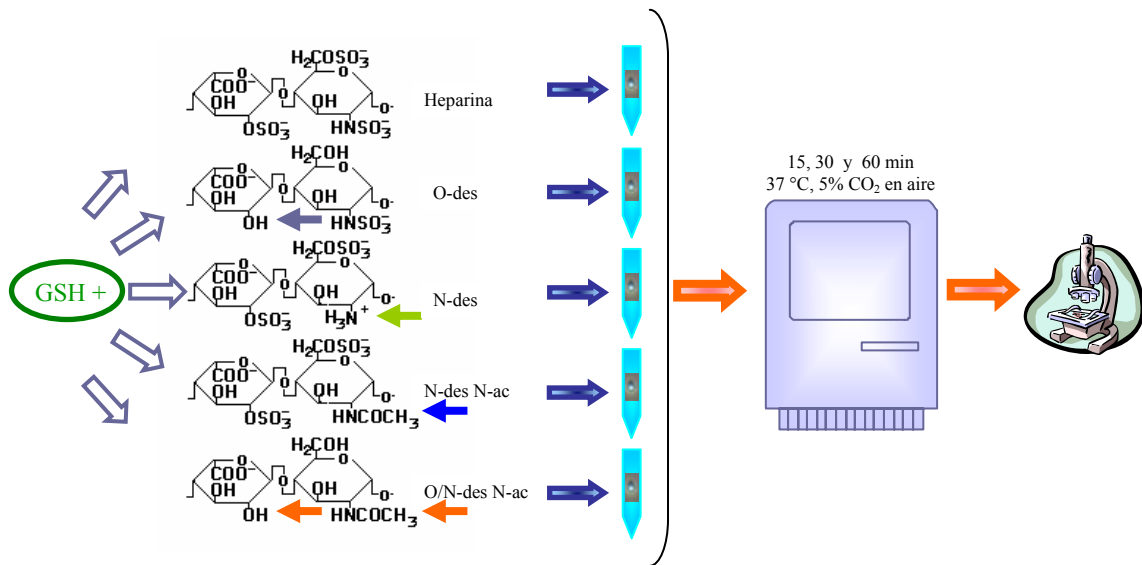
**Figura 24: Fotografía (microscopio de contraste de fase) en donde pueden observarse los distintos estadios de descondensación nuclear de espermatozoides humanos. S:** espermatozoides sin cambio; **M:** espermatozoides moderadamente descondensados; **G:** espermatozoides groseramente descondensados.

## **6.2. Descondensación de núcleos espermáticos y cromatina aislada**

Se obtuvieron espermatozoides capacitados, núcleos espermáticos y la cromatina aislada provenientes de una misma muestra de semen y se descondensaron *in vitro* de acuerdo a la técnica de descondensación detallada en el punto anterior, para comparar la cinética de descondensación de los núcleos aislados y de la cromatina aislada con la de los espermatozoides enteros. El porcentaje de espermatozoides, núcleos o cromatina descondensados se evaluó por observación al microscopio de contraste de fase tal como se detallara en la sección anterior (punto 6.1).

## **7. Efecto de la sulfatación de la heparina sobre su actividad descondensante en núcleos aislados**

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la sulfatación de la heparina afecta la actividad descondensante de la molécula en espermatozoides capacitados (Figura 19). Para evaluar si la sulfatación de la heparina influía sobre la actividad descondensante de la molécula también en núcleos aislados, dichos núcleos aislados y espermatozoides capacitados obtenidos de la misma muestra de semen se descondensaron en presencia de GSH (10 mM) final y heparina, o cada una de las siguientes heparinas químicamente modificadas (46  $\mu$ M final): heparina parcialmente N-desulfatada (**N-des**), heparina parcialmente N-desulfatada N-acetilada (**N-des N-ac**), heparina parcialmente O-desulfatada (**O-des**) y heparina parcialmente O/N-desulfatada N-acetilada (**O/N-des N-ac**), todas obtenidas a partir de la **heparina madre**. El porcentaje de descondensación total en cada muestra se determinó de la manera habitual, luego de 15, 30 y 60 minutos de incubación en condiciones descondensantes (figura 25), (Romanato y col 2003).

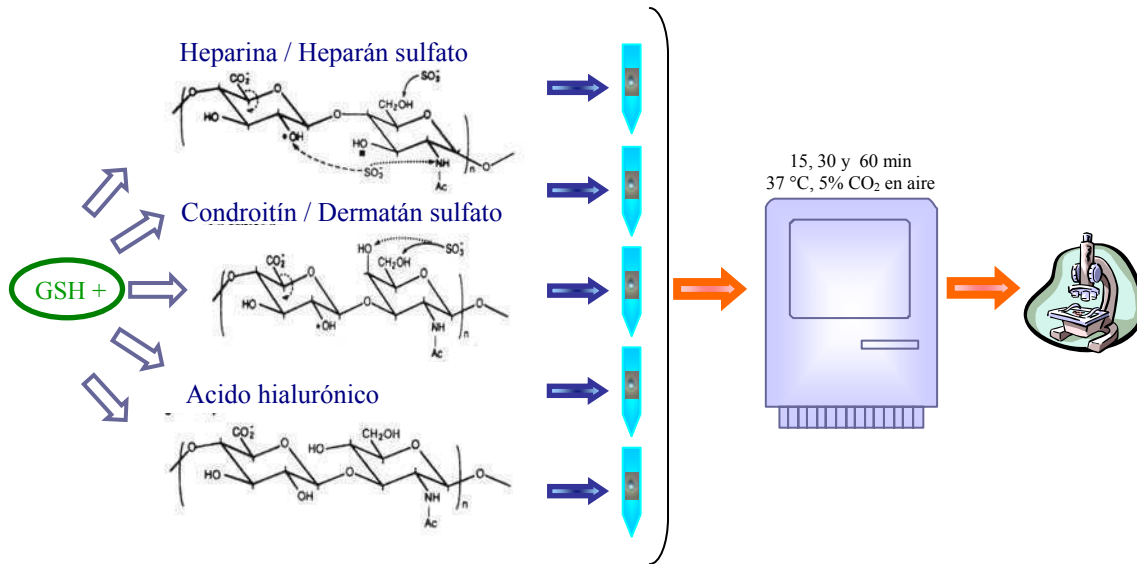


**Figura 25:** Esquema correspondiente a la metodología utilizada para la técnica de descondensación de núcleos aislados con heparinas químicamente modificadas. Los núcleos aislados se incuban en presencia de GSH y heparina o cada una de las heparinas químicamente modificadas. Finalmente, se evalúa el estado de descondensación nuclear por observación al microscopio de contraste de fase.

### 8. Actividad descondensante de diferentes glicosaminoglicanos en núcleos aislados

Trabajos previos del laboratorio, demostraron que la heparina y el heparán sulfato pero no así otros glicosaminoglicanos (GAGs) poseen actividad descondensante *in vitro* sobre espermatozoides humanos capacitados. En esta etapa del trabajo, se evaluó la actividad descondensante de los diferentes GAGs sobre núcleos espermáticos aislados. Para ello, espermatozoides capacitados y núcleos aislados provenientes de una misma muestra de semen se descondensaron en presencia de GSH 10 mM (concentración final) y heparina o cada uno de los siguientes GAGs (46  $\mu$ M concentración final a excepción del HA: 2  $\mu$ M concentración final): heparán sulfato (HS), condroitín sulfato (CS), dermatán sulfato (DS) y ácido hialurónico (HA). El porcentaje total de descondensación

se calculó de la manera habitual luego de los 15, 30 y 60 minutos de incubación en condiciones descondensantes (figura 26), (Romanato y col. 2003).



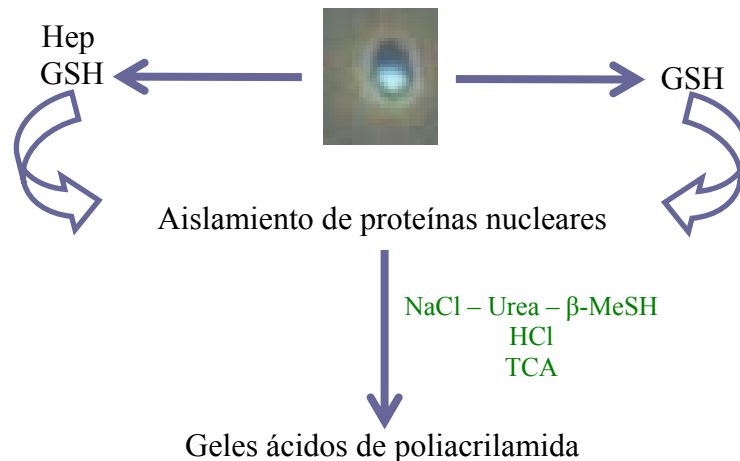
**Figura 26: Esquema correspondiente a la metodología utilizada para la técnica de descondensación de núcleos aislados en presencia de heparina o los diferentes glicosaminoglicanos.** Los núcleos aislados se incuban en presencia de GSH y heparina o cada uno de los diferentes GAGs. Finalmente, se evalúa el estado de descondensación nuclear por observación al microscopio de contraste de fase.

### 9. Los GAGs como aceptores de protaminas durante el proceso de descondensación nuclear

Con el objeto de evaluar la capacidad de diferentes GAGs de actuar como aceptores de protaminas *in vitro*, núcleos espermáticos aislados se descondensaron durante 15 y 30 minutos de acuerdo a la técnica de descondensación detallada anteriormente, pero sin el agregado de BSA en el medio de cultivo (modificado de Romanato y col. 2003).

### 9.1 Extracción de proteínas nucleares

Los núcleos incubados en condiciones descondensantes se lavaron durante 8 minutos a 8.000 xg y se extrajeron las proteínas nucleares de acuerdo a la metodología descrita por Montag y col. (1992). Los pellets resultantes del lavado se resuspendieron en NaCl 1.1 M, urea 6 M y  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1  $\mu$ M y se incubaron durante 2 horas en un baño de agua a 37 °C. Luego de agregar igual volumen de HCl 0.32 M, las muestras se incubaron durante 30 minutos en hielo y se centrifugaron a 13.000 xg durante 15 minutos a 4 °C. Se agregó TCA (Acido Tricloroacético) a los sobrenadantes de manera tal de alcanzar una concentración final de 20% y se incubó durante 48 horas a 4 °C. Al cabo de este tiempo, las muestras se lavaron por centrifugación (13.000 xg, durante 15 minutos a 4 °C) con acetona fría al 90%. Se dejó evaporar hasta sequedad y las muestras secas se resuspendieron en buffer de corrida para realizar una electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) (figura 27).



**Figura 27: Metodología para extracción de proteínas nucleares y PAGE.** Se descondensan los núcleos espermáticos según metodología descrita. Luego de la descondensación, se aíslan las proteínas nucleares mediante tratamientos con NaCl, Urea,  $\beta$ -MeSH, HCl y TCA. Finalmente, el resultado de la extracción se somete a electroforesis en gel de poliacrilamida.

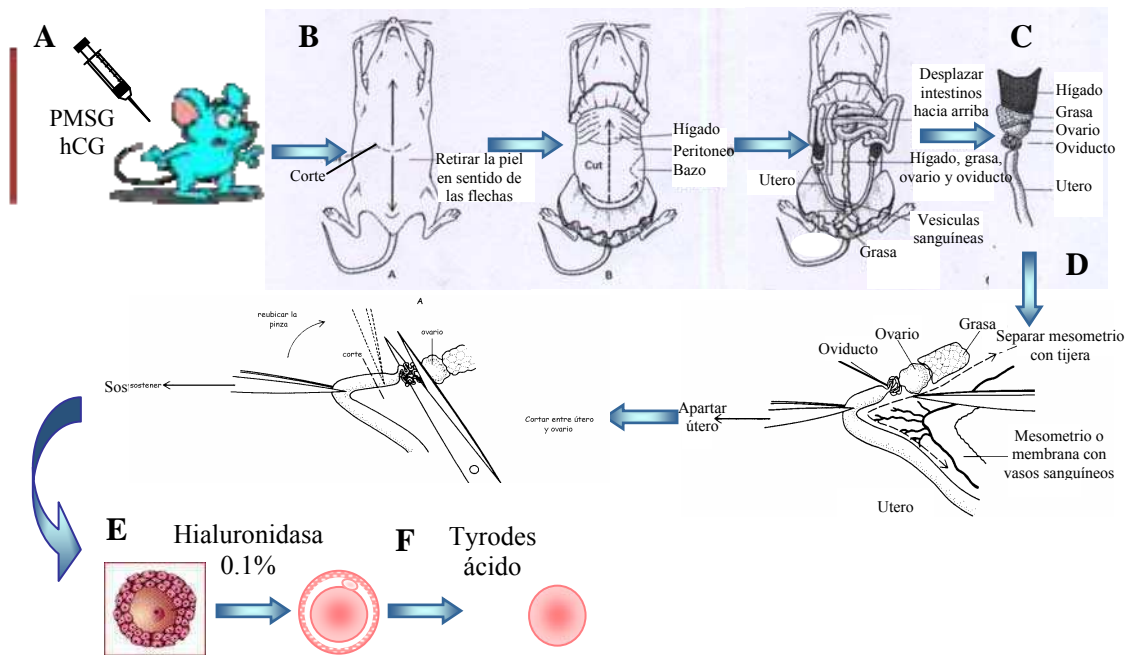
## **9.2 Electroforesis de proteínas nucleares en geles ácidos de poliacrilamida**

Se prepararon geles ácidos de poliacrilamida (poliacrilamida al 15% conteniendo ácido acético glacial 43.2% v/v y urea 10 M) en una cuba vertical Protean III (Bio-Rad, Hercules, CA USA) de acuerdo a una modificación a la técnica descrita por Panym y Chalkley (1969). Con el fin de estabilizar el sistema se realizó una precorrida con buffer de siembra solamente (ácido acético 0.9 N, urea 1 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1 M, sacarosa 15% y Pyronin Y para ver el frente de corrida) a 200 V, 4 °C hasta desaparición del frente, usando como buffer de corrida ácido acético 0.9 N. Una vez estabilizado el gel, se sembraron las muestras de manera tal que la cantidad de proteína sembrada por calle fuera correspondiente a la extracción de proteínas de 100 núcleos o espermatozoides. La corrida electroforética se realizó a 100 V, hasta que el frente de corrida alcanzara el borde inferior del gel. Una vez finalizada la corrida, los geles fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue al 0.2%, ácido acético glacial al 10%, metanol al 30% en agua, durante una hora a temperatura ambiente y desteñidos con ácido acético glacial al 10%, metanol al 30% en agua con agitación constante y cambiando la solución cada vez que fuera necesario hasta lograr que el fondo del gel quedara lo más transparente posible.

## **10. Superovulación y recolección de ovocitos de ratón**

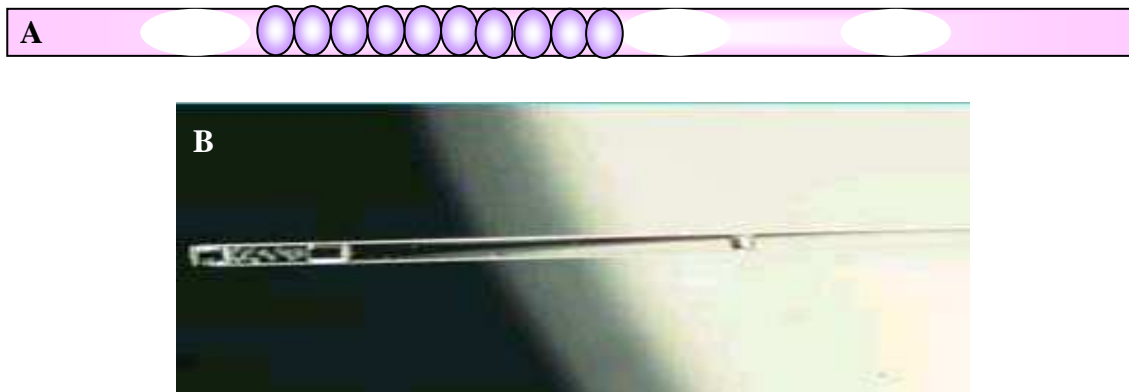
Para evaluar la presencia de heparán sulfato en el ovocito, se utilizaron ovocitos de ratón, por razones éticas y de disponibilidad de muestra. Se utilizaron ratones hembra CF1 de 8 semanas de edad alimentados *ad libitum*, criados en bioterio a una temperatura de  $20 \pm 2$  °C con períodos de 12 horas de luz-oscuridad (Bioterio Central, FCEyN-UBA). El cuidado y manipulación de animales se realizó de acuerdo con las guías

institucionales y a la Guía de Principios Sobre Cuidado y Uso de Animales (publicaciones DHEW, NIH 80-23). Los ratones se superovularon por estimulación con 5 UI de PMSG (Gonadotropina sérica de yegua preñada) (Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina), seguido de 5 UI de hCG (Gonadotropina coriónica humana) (Sigma), 48 horas más tarde. Luego de 12-14 horas post hCG, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical. Los ovocitos se recuperaron del oviducto de acuerdo al siguiente protocolo. Cada oviducto se colocó en una gota de 100  $\mu$ l de PBS. Los complejos cúmulo ovocito de cada oviducto se liberaron pinchando con aguja de tuberculina en la región del ámpula de cada oviducto. Una vez liberados los complejos cúmulo ovocito, se descartaron los oviductos y se juntaron todos los complejos en una misma gota de 300  $\mu$ l de PBS. Las células del cúmulus se removieron por medio de una incubación de 5 a 10 minutos en hialuronidasa (tipo V) al 0.1% en PBS. Los ovocitos desnudos obtenidos de esta manera, se lavaron tres veces por medio de pasajes en gotas de PBS para remover bien la hialuronidasa. En el caso de necesitar ovocitos sin zona pelúcida, los ovocitos se trataron con Tyrodes ácido (pH 2.5) de la siguiente manera: se colocaron 10 ovocitos sobre un portaobjetos con el mínimo posible de PBS y se les agregó una gota de 10  $\mu$ l de Tyrodes ácido desde arriba (Figura 28). Sin quitar la vista de la lupa, se esperó hasta no observar más la presencia de la zona pelúcida y se pasó los ovocitos a una gota limpia de PBS suplementado con 2% de BSA (Figura 28). El agregado de BSA en este paso es fundamental para evitar el pegado de los ovocitos al vidrio. Luego de colocar todos los ovocitos sin zona pelúcida en una misma gota de PBS-BSA se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno en la misma solución para quitar cualquier remanente de Tyrodes ácido.



**Figura 28: Esquema de la técnica de obtención de ovocitos de ratón.** **A:** Se estimula hormonalmente a la hembra y se sacrifica. **B:** Para realizar la disección del animal, se realiza un corte longitudinal por el vientre y se exponen los ovarios (**C**). **D:** Entre el extremo de cada ovario y el útero se encuentra el oviducto con forma de ampolla pequeña. Se retira la grasa que rodea el oviducto y se corta para poder separarlo del ovario. Cada oviducto se coloca en una gota de PBS, se pincha y se extraen de esta manera los complejos cúmulus ovocito. **E:** Los complejos recuperados se colocan en gota de PBS y se agrega hialuronidasa para poder retirar las células que rodean a los ovocitos (células del cúmulus). **F:** En el caso que sea necesario obtener ovocitos sin zona pelúcida se colocan 10 ovocitos por vez en gota de Tyrodes ácido hasta observar la desaparición completa de la zona pelúcida. Por último se lavan los ovocitos en gotas de PBS.





**Figura 29: Manipulación correcta de ovocitos. A:** Los ovocitos se manipulan con pipeta Pasteur de vidrio de la siguiente manera: primero se llena de medio de cultivo, se pueden dejar una o dos burbujas para que sea más fácil la visualización de la zona en donde se encuentran los ovocitos. Luego de la burbuja, se carga la pipeta con no más de 10 ovocitos con la menor cantidad de medio de cultivo posible seguido de otra burbuja. Finalmente se carga la punta de la pipeta con una pequeña cantidad de medio de cultivo. **B:** Fotografía de una pipeta Pasteur que contiene ovocitos en su interior.

## 11. Evaluación de la capacidad descondensante de ovocitos frescos de ratón

### 11.1. Ensayo de descondensación: micrométodo

Se desarrolló un micrométodo de descondensación para poder evaluar la descondensación espermática en volúmenes mucho menores a los utilizados en la técnica estándar (Materiales y Métodos, Sección 6.1)) con el objeto de utilizar ovocitos frescos de ratón en lugar de la mezcla descondensante habitual (heparina/GSH). Esta nueva técnica es una modificación del método estándar descrito anteriormente, combinado con una modificación de la técnica descrita por Maleszewski (1990). Se mezclaron 1  $\mu$ l de heparina (concentración final 46  $\mu$ M), 1  $\mu$ l GSH (concentración final 10 mM) y 1  $\mu$ l de medio HTF conteniendo 20.000 espermatozoides previamente capacitados y se realizó una incubación de 3 horas y media entre portaobjetos y cubreobjetos a 37 °C en cámara húmeda para evitar evaporación. Los controles del

experimento consistieron en incubaciones paralelas sólo con heparina o sólo con GSH. El porcentaje total de descondensación fue evaluado de la manera habitual con microscopio de contraste de fase (Zeiss Standard 16). La comparación de este nuevo micrométodo y el protocolo de descondensación estándar se realizó utilizando alícuotas provenientes de la misma muestra de semen. Se realizaron 9 experimentos independientes y cada una de las condiciones en cada experimento se llevó a cabo por duplicado.

### **11.2. Descondensación en presencia de ovocitos frescos de ratón**

La técnica del micrométodo descrito en el punto anterior se utilizó para evaluar la capacidad descondensante de ovocitos frescos de ratón obtenidos según se detallara en la Sección 10. Se colocaron sobre un portaobjetos 1  $\mu$ l de medio HTF que contenía 20.000 espermatozoides previamente capacitados y 1  $\mu$ l de medio HTF que contenía 30 ovocitos sin zona pelúcida. Luego se agregó 1  $\mu$ l de GSH (concentración final 10 mM) y se colocó un cubreobjetos sobre el preparado presionando fuertemente con el dedo con el fin de romper los ovocitos para poder liberar su contenido a la mezcla de incubación. Se realizó una incubación de 3 horas y media a 37 °C en cámara húmeda tal como se detallara anteriormente (Sección 11.1). Los controles consistieron en incubaciones paralelas de preparados conteniendo espermatozoides más heparina 46  $\mu$ M, GSH 10 mM o ambos. Se realizaron 5 experimentos independientes utilizando alícuotas de la misma muestra de semen para cada uno y se hicieron duplicados de cada condición dentro de un mismo experimento.

### **11.3. Efecto de distintas glicosidasas sobre la capacidad descondensante del ovocito**

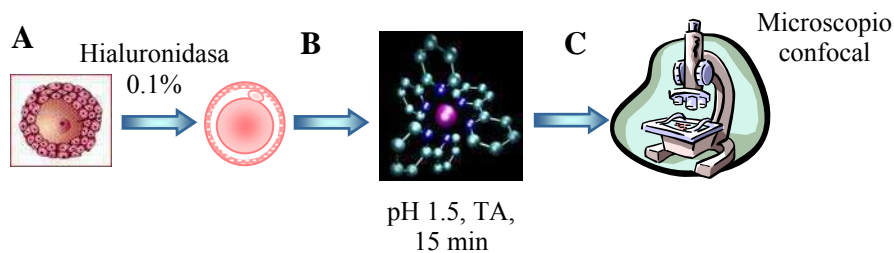
Con el fin de evaluar la posibilidad que la actividad descondensante de ovocitos frescos se debiera a la presencia de heparán sulfato, se descondensaron espermatozoides capacitados con ovocitos frescos de ratón aplicando la técnica del micrométodo (Sección 11.1), con o sin el agregado de distintas glicosidasas. Las enzimas utilizadas fueron las siguientes: heparinasa III (E.C.: 4.2.2.8; 10 mU/ml; Sigma), condroitinasa ABC (E.C.: 4.2.2.4; 100 mUI/ml; Seikagaku Corporation) y hialuronidasa (E.C.: 3.2.1.35; 2 IU/ml; Calbiochem). Cada enzima fue agregada a 1  $\mu$ l de mezcla descondensante de tal manera de alcanzar la concentración final mencionada para la misma en 3  $\mu$ l finales. Se realizaron 5 experimentos independientes y duplicados de cada condición dentro de un mismo experimento.

## **12. Evaluación de la presencia de Heparán sulfato en el ovocito**

### **12.1. Tinción de ovocitos con Rubipy**

Para evaluar la presencia de GAGs sulfatados, se llevó a cabo la tinción de ovocitos maduros con el colorante catiónico Rubipy (Cloruro de tris (2,2'-bipyridin) Rutenio (II)). Ovocitos con zona pelúcida obtenidos según se detallara en la Sección 10 se fijaron en metanol durante 2 minutos y se incubaron durante 5 minutos con Rubipy 1 mg/ml en agua destilada a pH 1.5. En estas condiciones de pH, el colorante se une específicamente a grupos sulfato y no así a grupos carboxilo o fosfato (Rozenberg et al, 2001), pudiendo de esta manera, ser utilizado como indicador de la presencia de macromoléculas sulfatadas tales como HS y otros glicosaminoglicanos sulfatados. Luego de la tinción, los ovocitos se lavaron tres veces en PBS (10 minutos cada lavado), se secaron a temperatura ambiente, se montaron en glicerol 50% en PBS y se

observaron al microscopio confocal (Nikon C1 equipado con un filtro de emisión 570 LP). Como controles negativos se utilizaron ovocitos incubados bajo las mismas condiciones pero en ausencia del colorante. La intensidad de la fluorescencia se cuantificó por medio del programa Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) (Figura 30).



**Figura 30: Marcación de ovocitos con colorante cationico.** **A:** los complejos cúmulo-ovocito recuperados de cada oviducto se colocan en gota de hialuronidasa para retirar las células del cúmulo recuperando así los ovocitos. **B:** ovocitos con zona pelúcida se incuban en presencia del colorante cationico Rubipy. **C:** observación de los resultados al microscopio confocal.

## 12.2. Inmunocitoquímica de ovocitos con anticuerpo anti-HS

Se utilizaron ovocitos con y sin zona pelúcida obtenidos según se detallara anteriormente (Sección 10). Los ovocitos sin zona pelúcida se fijaron y permeabilizaron en una solución de Tween-20 al 0.5% y formaldehído al 2% en PBS durante 60 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizó el primer bloqueo en solución de PBS conteniendo BSA al 0.5%, Tween-20 al 0.1% y suero normal de cabra al 5% durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los ovocitos con zona pelúcida se fijaron en formaldehído al 2% en PBS durante 60 minutos a temperatura ambiente. El primer bloqueo en este caso se hizo en la misma solución que se utilizó para los ovocitos sin zona pelúcida pero sin el contenido de Tween-20 (durante el mismo tiempo).

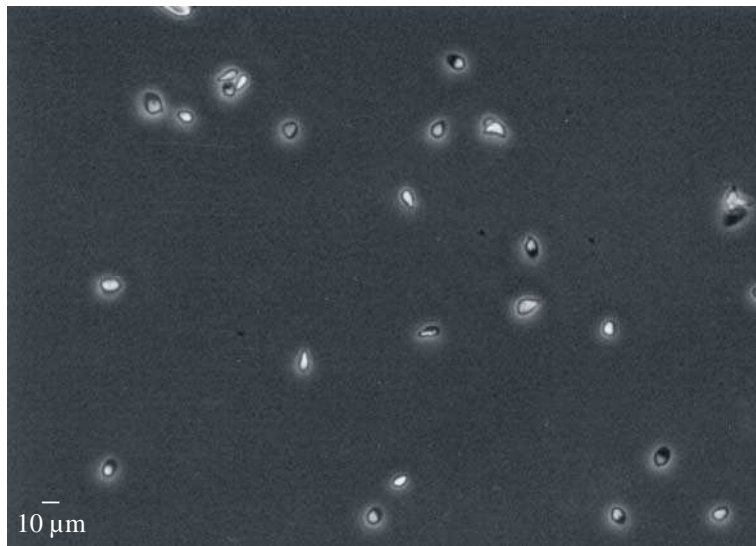
Posteriormente, los ovocitos (con y sin zona pelúcida) se incubaron en presencia del primer anticuerpo (monoclonal) anti-HS (Seikagaku Corporation), diluido 1:20 en PBS-BSA al 0.5% y suero normal de cabra al 5% durante 60 minutos a 37 °C. Como segundo anticuerpo se utilizó un anticuerpo policlonal anti IgM de ratón acoplado a FITC (Chemicon International Inc) diluido 1:100 en PBS-BSA al 0.5% y suero normal de cabra al 5% durante 60 minutos a 37 °C. Los controles negativos no contienen el primer anticuerpo. Los ovocitos se observaron al microscopio confocal. Se cuantificó la intensidad de la fluorescencia utilizando el programa Image J anteriormente mencionado (Sección 11.1).

## Resultados

## 1. ESTUDIO DE LA DESCONDENSACION *IN VITRO* DE NÚCLEOS AISLADOS DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS

### 1.1. Obtención de núcleos aislados de espermatozoides humanos

Con el fin de trabajar en condiciones más cercanas a lo fisiológico y a lo que verdaderamente ocurre *in vivo*, se aislaron núcleos espermáticos de acuerdo con el protocolo descrito en Materiales y Métodos (Sección 4). Tal como muestra la figura 31, en la fracción nuclear obtenida se encontraron cabezas aisladas y no se observó contaminación alguna por colas espermáticas.



**Figura 31:** Núcleos aislados de acuerdo a la técnica detallada en materiales y métodos (sección 4). La fracción de núcleos aislados se encuentra formada solamente por cabezas y no muestra contaminación alguna con colas espermáticas. Aumento: 400 X.

## 1.2. Inmunocitoquímica de espermatozoides y núcleos aislados con anti-acrosina humana.

Para corroborar que el procedimiento utilizado para el aislamiento de núcleos fue verdaderamente efectivo, se realizó una marcación de los núcleos aislados con anticuerpo anti-acrosina humana.

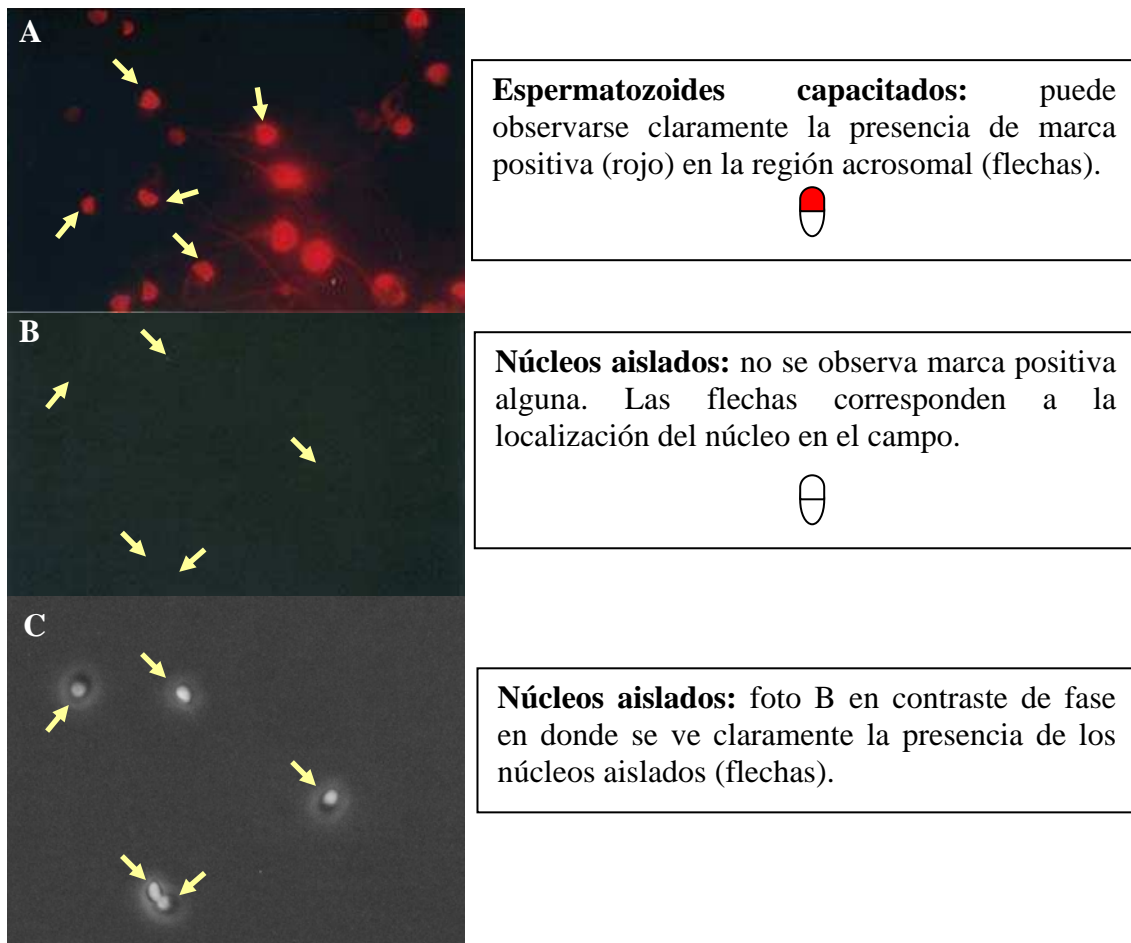


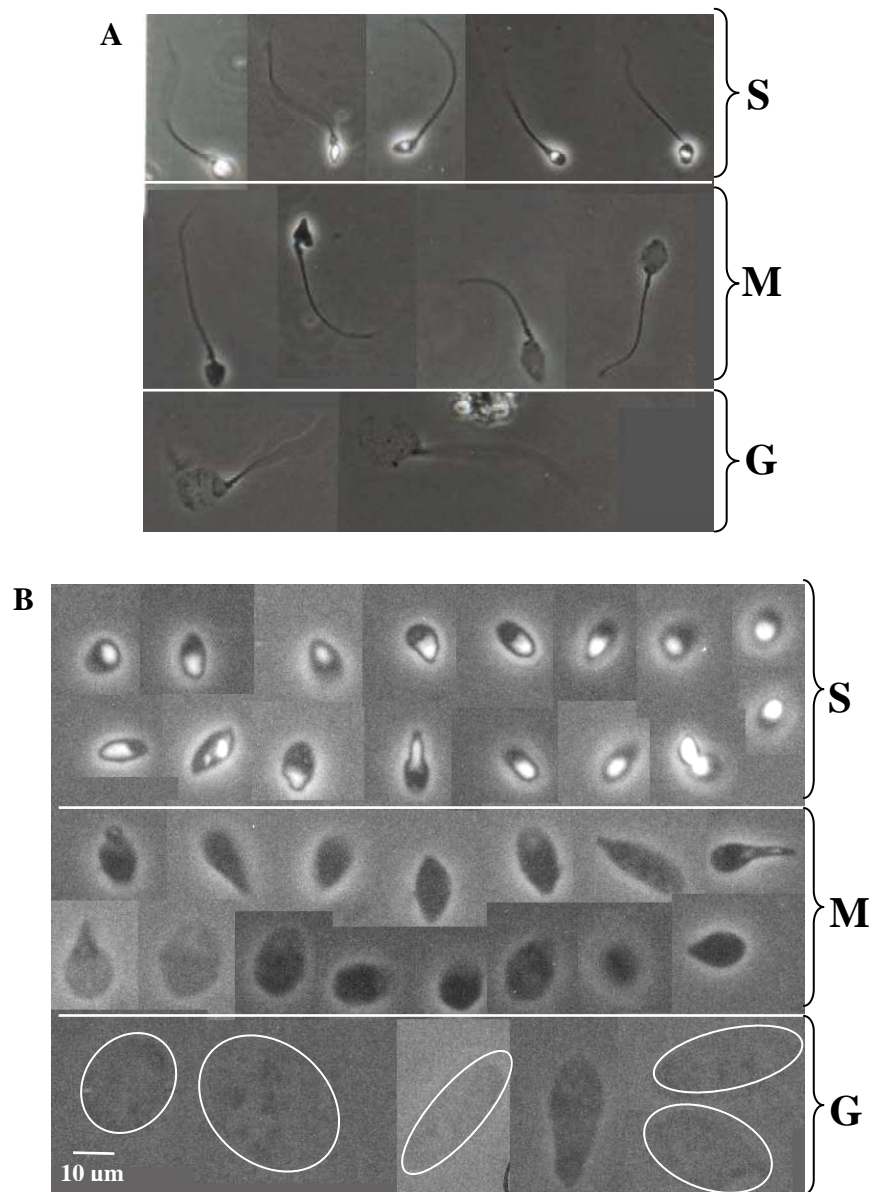
Figura 32: Inmunocitoquímica de espermatozoides enteros (A) y núcleos aislados (B y C) con anticuerpo anti-acrosina humana.



La figura 32 muestra los resultados de inmunofluorescencia de espermatozoides enteros (A), donde se observa claramente la presencia de acrosoma indicada por la marca roja positiva, y núcleos aislados (B), donde se puede observar que el acrosoma fue efectivamente removido durante el proceso. El panel C corresponde al mismo campo observado en B pero con contraste de fase para poder visualizar la presencia de los núcleos.

### **1.3. Descondensación *in vitro* de espermatozoides capacitados, núcleos y cromatina aislada (núcleos desmembrados) en presencia de heparina y GSH**

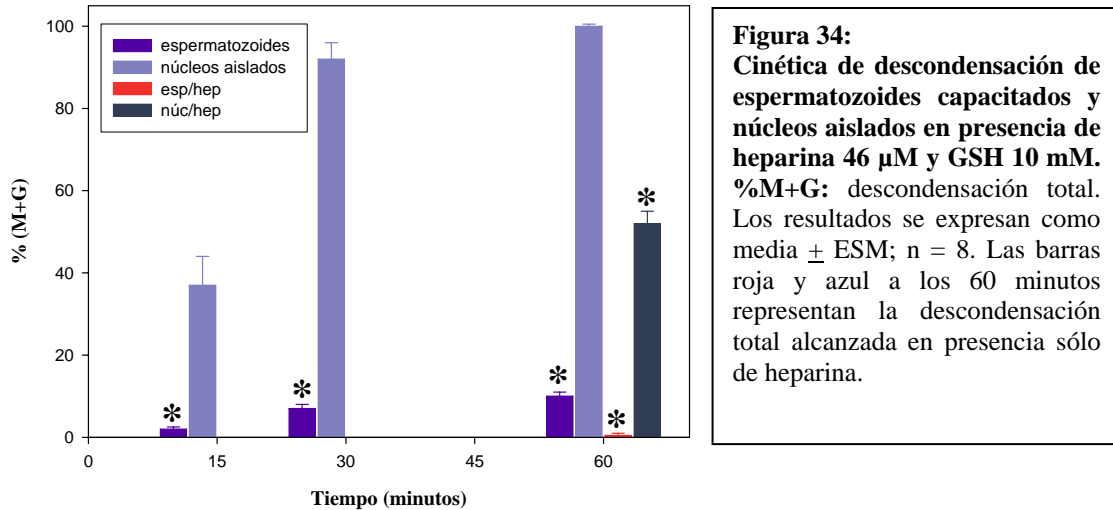
Luego de la observación al microscopio de contraste de fase, se pudieron identificar, tanto para los núcleos aislados como para la cromatina aislada, los mismos estadios de descondensación descritos previamente para espermatozoides enteros (S, M y G) (Figura 33). El estadio S (Sin cambios) presenta una cabeza de tamaño normal, con refringencia característica, el estadio M (Moderadamente descondensados) presenta una cabeza más grande que lo normal, sin refringencia y de aspecto granular. Por último, el estadio G (Groseramente descondensado) presenta una cabeza muy aumentada de tamaño, con aspecto bien granular y que prácticamente no se ve. En el caso de los espermatozoides enteros, este estadio es fácil de observar gracias a la presencia de las colas espermáticas, pero como en los núcleos o en la cromatina aislada no hay colas, la observación se hizo muy dificultosa. No se muestran fotografías de la cromatina aislada; su aspecto al microscopio óptico es semejante al de los núcleos aislados, si bien es notoria la aglutinación presente.



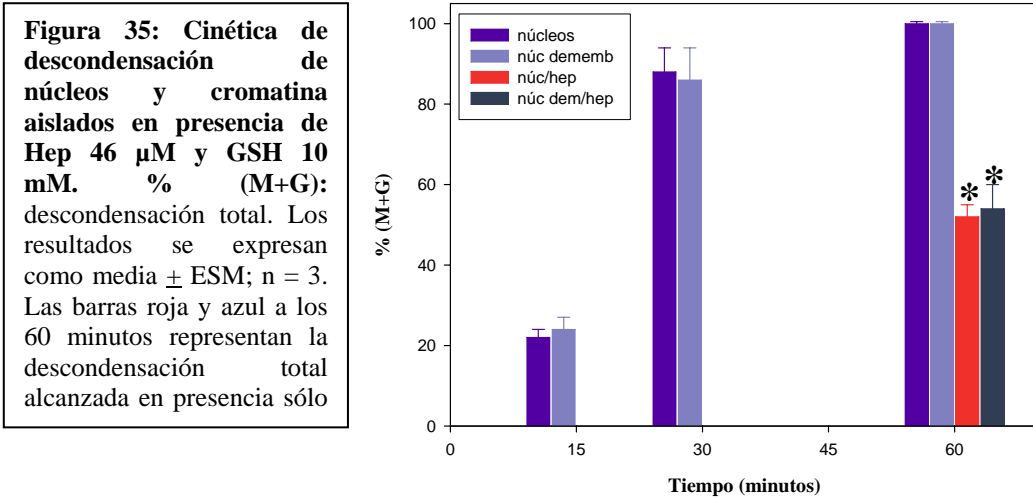
**Figura 33: Estadios de descondensación observados al microscopio de contraste de fase. Panel A:** espermatozoides enteros. **Panel B:** núcleos aislados. Los estadios que se diferencian son: S (Sin cambios), M (Moderadamente descondensados) y G (Grosadamente descondensados). El reborde blanco en el panel B indica la ubicación de los núcleos en estadio G de descondensación. Aumento: 400 X.

La cinética de descondensación de espermatozoides capacitados y núcleos aislados se puede observar claramente en la figura 34. La descondensación total alcanzada por los núcleos aislados fue significativamente mayor que la descondensación total alcanzada por los espermatozoides capacitados a cada uno de los tiempos evaluados ( $n=8$ , test de Student para muestras apareadas,  $p<0.05$ ). Al contrario de lo ocurrido con espermatozoides capacitados, para los cuales el porcentaje de descondensación máximo alcanzado a los 60 minutos de incubación fue de  $10 \pm 1\%$  ( $n=8$ ), los núcleos aislados alcanzaron un porcentaje de descondensación total de  $92 \pm 4\%$  ( $n=8$ ) a los 30 minutos de incubación. Sorpresivamente, los núcleos aislados pudieron ser descondensados en presencia de heparina sola. Sin embargo, el porcentaje de descondensación máximo alcanzado en dichas condiciones ( $50 \pm 3\%$ ;  $n=8$ ) fue significativamente menor que el valor alcanzado en presencia de heparina y GSH ( $100 \pm 0.5\%$ ;  $n=8$ ; test de Student para muestras apareadas,  $p<0.05$ ). No se observó descondensación alguna en presencia sólo de GSH en ninguna de las muestras.

Por otro lado, se comparó la cinética de descondensación de los núcleos y de la cromatina aislada (Figura 35). La descondensación total alcanzada en ambas condiciones fue la misma a cada uno de los tiempos evaluados, llegando al 100% a los 60 minutos de incubación (Núcleos vs. núcleos demembrados no significativo ( $p>0,05$ ) para cada tiempo, ANOVA para muestras apareadas + Test de Tukey,  $n=3$ ). De manera semejante, se observó el mismo porcentaje de descondensación en presencia sólo de heparina.



**Figura 34:**  
**Cinética de descondensación de espermatozoides capacitados y núcleos aislados en presencia de heparina 46 μM y GSH 10 mM.**  
 %M+G: descondensación total. Los resultados se expresan como media ± ESM; n = 8. Las barras roja y azul a los 60 minutos representan la descondensación total alcanzada en presencia sólo de heparina.



**Figura 35: Cinética de descondensación de núcleos y cromatina aislados en presencia de Hep 46 μM y GSH 10 mM.**  
 % (M+G): descondensación total. Los resultados se expresan como media ± ESM; n = 3. Las barras roja y azul a los 60 minutos representan la descondensación total alcanzada en presencia sólo

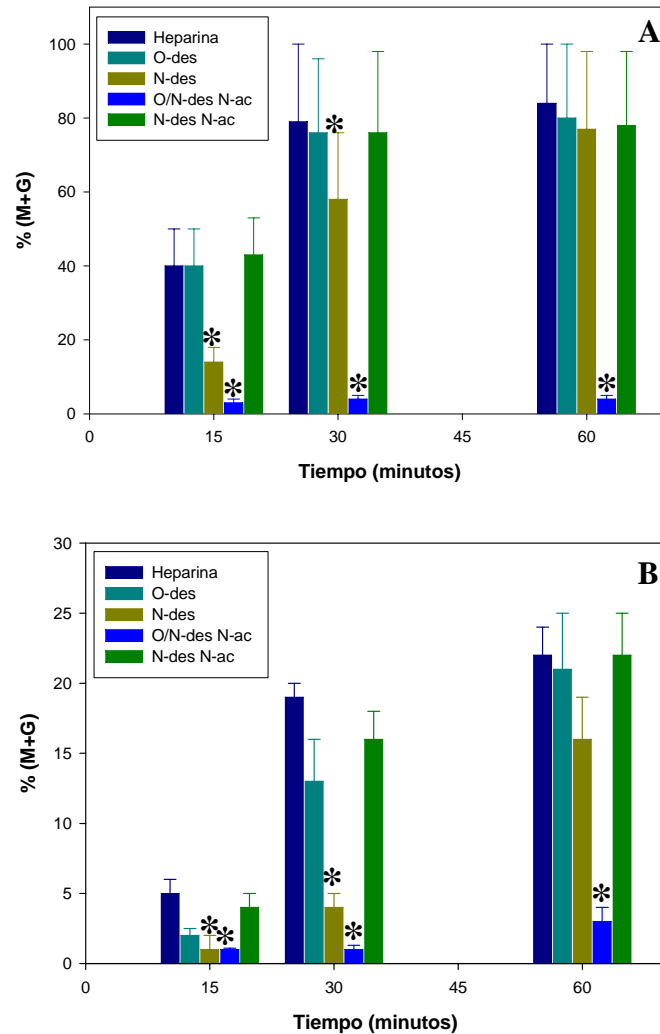
Debido a que no se observaron diferencias significativas entre los niveles de descondensación alcanzados por los núcleos aislados y la cromatina, dada la dificultad presentada para poder observar la cromatina aislada y considerando que en realidad, *in vivo*, el espermatozoide que ingresó recientemente al ooplasma conserva su membrana nuclear, los experimentos siguientes fueron realizados utilizando núcleos aislados.

#### **1.4. Sulfatación de la heparina y actividad descondensante**

Para analizar la relación existente entre la estructura molecular de la heparina y su actividad descondensante *in vitro* en núcleos aislados, se utilizaron las mismas cuatro heparinas químicamente modificadas mediante desulfatación o acetilación parcial que se usaron para evaluar descondensación en espermatozoides enteros (Introducción, página 46), en presencia de GSH 10 mM. Tal como señaláramos en la Introducción (página 48, Figura19), tanto la O- como la N-desulfatación y la N-acetilación alteran la carga neta del disacárido y la localización de los grupos cargados positiva o negativamente, alterando la actividad biológica.

La figura 36 muestra la cinética de descondensación de núcleos aislados en presencia de heparina y sus cuatro derivados desulfatados y puede verse claramente que la actividad descondensante de la heparina se vio fuertemente afectada por la sulfatación de la molécula. Tanto la heparina, como la O-des y la N-des N-ac mostraron actividad descondensante similar a cada uno de los tiempos evaluados (ANOVA,  $p > 0.05$ ;  $n = 7$ ). Si bien la N-des mostró actividad descondensante, ésta se vio retrasada en el tiempo, ya que los niveles de descondensación alcanzados antes de los 30 minutos fueron significativamente menores (ANOVA + Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ ;  $n = 7$ ) alcanzando niveles similares de descondensación recién a los 60 minutos de incubación. Por último, la O/N-des N-ac no mostró actividad descondensante alguna en ninguno de los tiempos evaluados.

Tal como se muestra en la figura 36 (panel B), este comportamiento refleja perfectamente el comportamiento ya observado al estudiar el efecto de la sulfatación de la heparina sobre la actividad descondensante de la misma en espermatozoides enteros, (Romanato y col, 2003; Introducción, página 48).

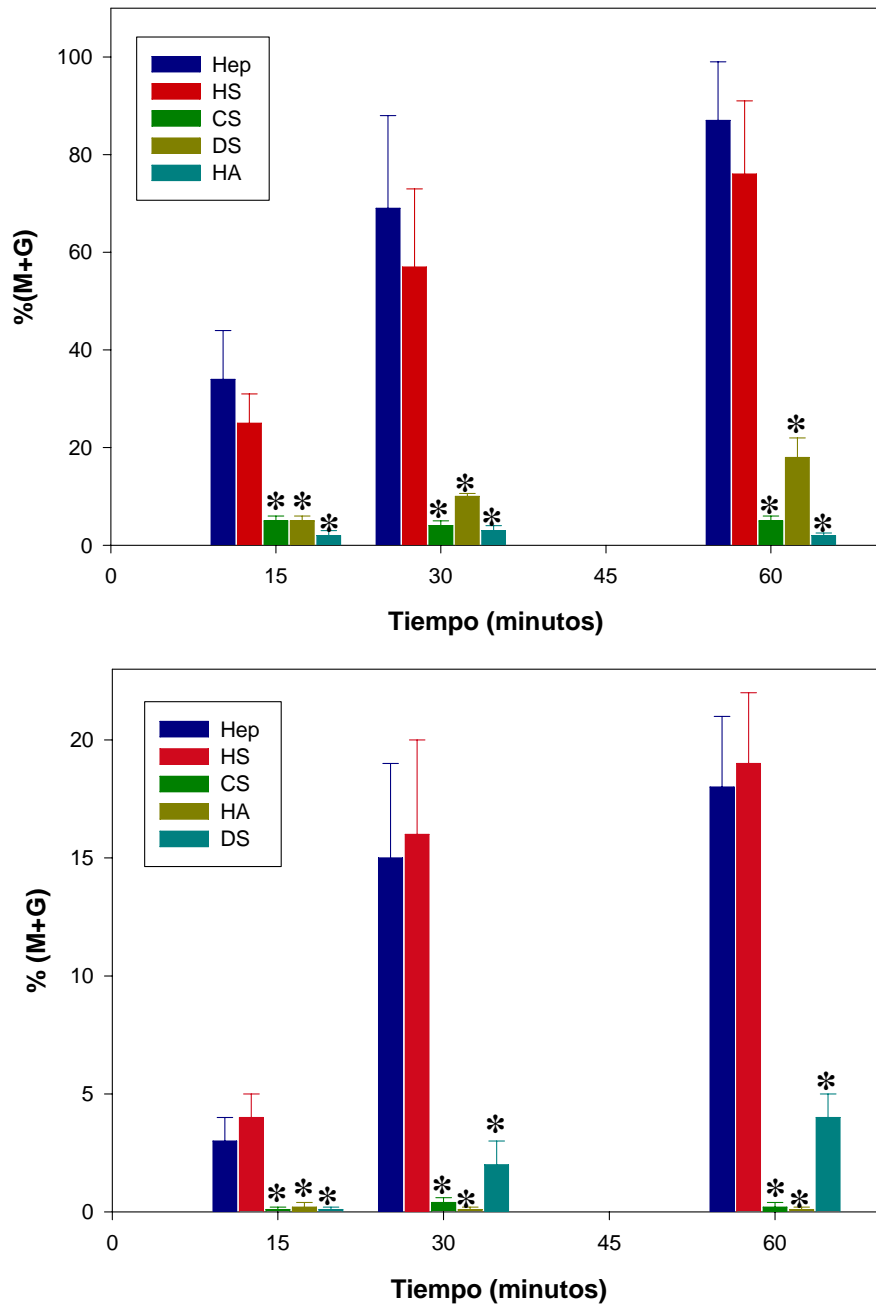


**Figura 36: Cinética de descondensación de núcleos aislados (A) y espermatozoides capacitados (B) en presencia de heparina 46  $\mu$ M o equivalente (heparinas químicamente modificadas) y GSH 10 mM. N-des: heparina parcialmente N-desulfatada; O-des: parcialmente O-desulfatada; N-des N-ac: parcialmente N-desulfatada N-acetilada; O/N-des N-ac: parcialmente O/N desulfatada N-acetilada. %M+G: descondensación total.\*  $p < 0.05$  con respecto a heparina (ANOVA + Student-Newman-Keuls,  $n = 4$ ). Los resultados se expresan como media  $\pm$  ESM.**

### **1.5. Actividad descondensante de diferentes glicosaminoglicanos (GAGs)**

Para determinar cuál podría ser el agente descondensante *in vivo*, se evaluó la actividad descondensante *in vitro* de diferentes GAGs que, a diferencia de la heparina, están presentes en el complejo cúmulus-ovocito, sobre núcleos aislados de espermatozoides humanos. En la figura 37 se muestra la cinética de descondensación correspondiente, obtenida en presencia de GSH 10 mM. Puede verse claramente, que la actividad descondensante de la heparina y del heparán sulfato fue similar a cada uno de los tiempos evaluados (ANOVA + Tukey-Kramer,  $p > 0.05$ ;  $n=7$ ), mientras que, tanto el ácido hialurónico como el condroitín sulfato no mostraron actividad descondensante alguna (ANOVA + Tukey-Kramer,  $p < 0.01$ ;  $n=7$ ). Si bien, el dermatán sulfato pareciera tener algo de actividad a los 60 minutos de incubación, la misma no fue significativamente diferente a la observada tanto para el condroitín sulfato como para el ácido hialurónico ( $p > 0.05$ ) y sí significativamente menor ( $p < 0.05$ ) que la de la heparina o heparán sulfato.

Tal como sucediera con las heparinas químicamente modificadas, los diferentes GAGs manifestaron en núcleos aislados, un comportamiento similar al observado previamente en espermatozoides capacitados (Introducción, página 48, figura 21) (Figura 37, panel B).



**Figura 37: Cinética de descondensación de núcleos aislados y espermatozoides capacitados en presencia de GSH 10 mM y de diferentes GAGs. A:** núcleos aislados; **B:** espermatozoides capacitados. **HS:** heparán sulfato, **CS:** condroitín sulfato, **DS:** dermatán sulfato, **AH:** ácido hialurónico, **Hep:** heparina. (ANOVA+Tukey, \* $p < 0.05$  con respecto a heparina,  $n=7$ ). Los resultados se expresan como media  $\pm$  ESM.

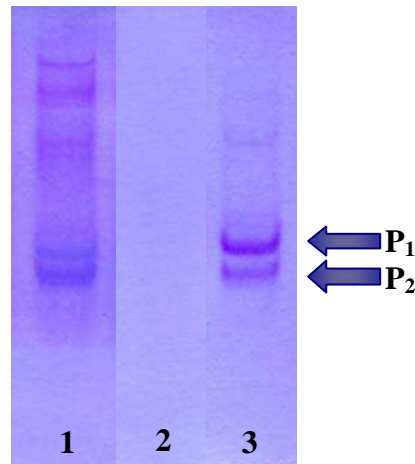


## **1.6. Los GAGs como aceptores de protaminas *in vitro***

Con el objeto de evaluar la capacidad de distintos GAGs (particularmente del heparán sulfato) de funcionar como aceptores de protaminas *in vitro*, se diseñó un experimento por medio del cual fuese posible observar efectivamente el desplazamiento de las protaminas espermáticas por acción de los mismos. Para ello se recurrió a la electroforesis de proteínas nucleares espermáticas en geles ácidos de poliacrilamida.

### **1.6.1. Electroforesis de proteínas nucleares en geles ácidos de poliacrilamida**

Se extrajeron proteínas básicas de espermatozoides capacitados y espermatozoides capacitados y descondensados en presencia de heparina y GSH de acuerdo con el protocolo descrito en Materiales y Métodos (Sección 9.1) y los extractos se analizaron mediante electroforesis en geles ácidos de poliacrilamida (Materiales y Métodos, Sección 9.2). La figura 38 muestra el perfil proteico correspondiente a un espermatozoide capacitado (calle 1), un espermatozoide capacitado e incubado con heparina y GSH (calle 2), y un espermatozoide capacitado e incubado con GSH (sólo) y se señala la posición de las bandas de las protaminas P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> (Montag y col, 1992). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto claramente que la descondensación espermática en presencia de heparina y GSH está acompañada de la remoción de P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>.

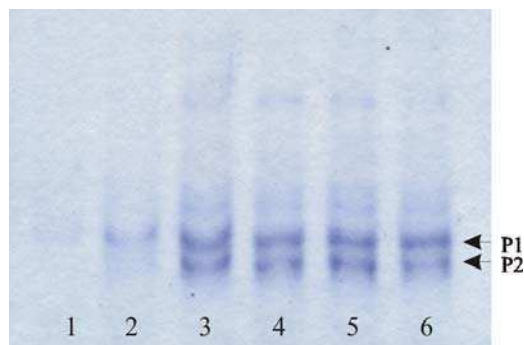


**Figura 38: Electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos proteicos provenientes de espermatozoides capacitados. Calle 1:** extracto correspondiente a espermatozoides capacitados sin descondensar (perfil proteico total); **calle 2:** extracto correspondiente a espermatozoides capacitados y descondensados en presencia de heparina y GSH; **calle 3:** extracto correspondiente a espermatozoides capacitados y descondensados en presencia de GSH sólo (control negativo). Las flechas señalan las bandas electroforéticas correspondientes a las protaminas 1 y 2 ( $P_1$  y  $P_2$ ). Esta figura es representativa de 5 experimentos realizados con muestras de semen diferentes. En cada calle se sembró la proteína extraída de  $1 \times 10^6$  espermatozoides.

### 1.6.2. Electroforesis de proteínas aisladas de núcleos espermáticos descondensados con diferentes GAGs

Para evaluar la capacidad de distintos GAGs de funcionar como aceptores de protaminas *in vitro*, se realizó una electroforesis en geles ácidos de poliacrilamida de proteínas básicas extraídas de núcleos espermáticos aislados e incubados en presencia de GSH más cada uno de los GAGs a analizar. La figura 39 muestra los resultados obtenidos. Las bandas correspondientes a las protaminas 1 y 2 (Montag y col, 1992), se pueden observar claramente en las calles 3-6 que contienen extractos proteicos de núcleos aislados e incubados en presencia de GSH sólo (control), GSH más condroitín sulfato, GSH más dermatán sulfato o GSH más ácido hialurónico, respectivamente. Sin embargo, estas bandas están ausentes en las calles 1 y 2, que contienen extractos

proteicos de núcleos aislados e incubados en presencia de heparina más GSH o heparán sulfato más GSH, respectivamente. El gel que se muestra en la figura es representativo de 5 experimentos independientes, realizados con diferentes muestras y que arrojaron resultados semejantes.



**Figura 39: Electroforesis en gel de poliacrilamida de núcleos aislados e incubados en presencia de GSH y diferentes GAGs. Calle 1:** núcleos descondensados en presencia de heparina y GSH. **Calle 2:** núcleos descondensados en presencia de heparán sulfato y GSH. **Calle 3:** núcleos descondensados en presencia de GSH sólo (control negativo del experimento). **Calles 4, 5 y 6:** núcleos descondensados en presencia de condroitín sulfato, dermatán sulfato y ácido hialurónico respectivamente. Las flechas indican las bandas electroforéticas correspondientes a P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>. Esta figura es representativa de 5 experimentos realizados con muestras de semen diferentes.

## **2. ESTUDIO DE LA PRESENCIA Y ACTIVIDAD DESCONDENSANTE DEL HEPARAN SULFATO EN EL OVOCITO**

Tal como se señalara anteriormente (Materiales y Métodos, sección 10), para estudiar la presencia de heparán sulfato en el ovocito y su posible actividad descondensante, se utilizaron ovocitos de ratón, por razones éticas y de disponibilidad de muestra.

### **2.1. Localización de heparán sulfato en el ovocito**

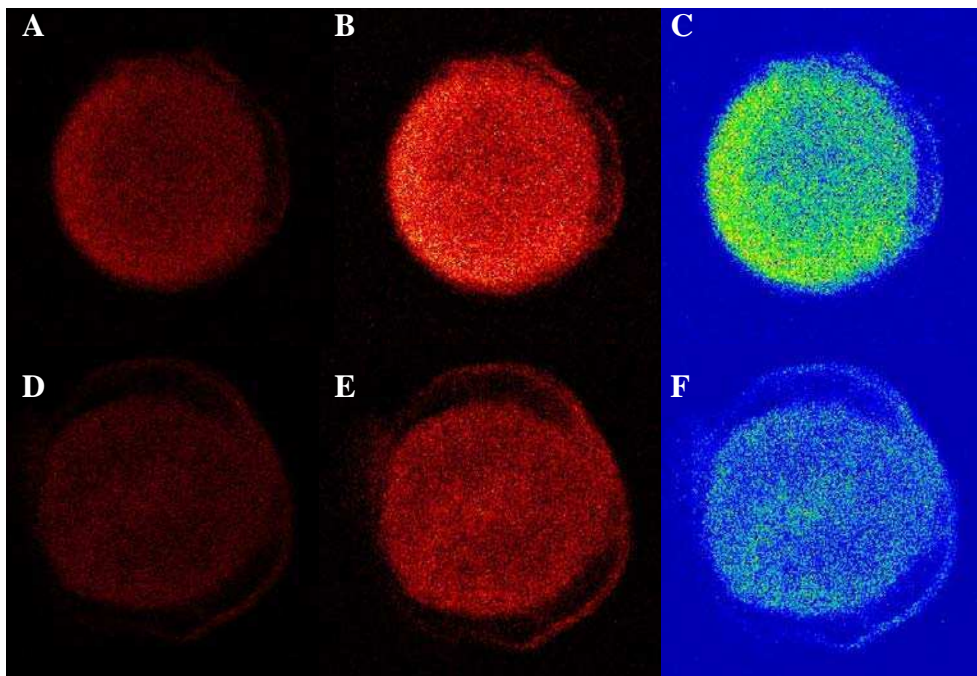
Para poder determinar la presencia y la localización del heparán sulfato en el ovocito se han utilizado dos metodologías diferentes. La primera, menos específica, fue la utilización de un colorante catiónico (Rubipy) capaz de reconocer grupos sulfato. La segunda, más específica y contundente, se basó en la utilización de un anticuerpo monoclonal. En las secciones siguientes se detallarán los resultados obtenidos.

#### **2.1.1. Marcación histoquímica con Rubipy**

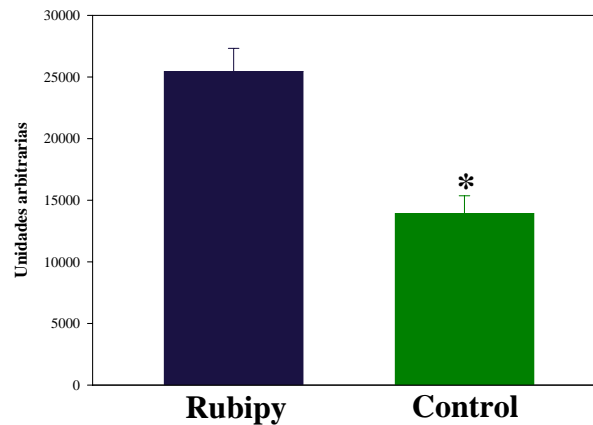
Para evaluar la presencia de GAGs sulfatados, se tiñeron ovocitos intactos (con zona pelúcida), con el colorante catiónico Rubipy a pH 1.5. La observación al microscopio confocal mostró una fluorescencia de color rojo a nivel citoplasmático en todos los ovocitos tratados (Figura 40, panel A), la cual fue marcadamente más fuerte que la auto fluorescencia observada en aquellos ovocitos que no fueron incubados en presencia del colorante (Figura 40, panel D). Para poder visualizar mejor la diferencia de marca, se expandió la escala de color (Figura 40, paneles B y C para Rubipy; paneles E y F para control). Se evaluaron 60 ovocitos teñidos y 40 ovocitos control en 4 experimentos diferentes. La cuantificación de la fluorescencia reveló que la intensidad de la marca fue

significativamente mayor en ovocitos incubados en presencia de Rubipy ( $25.433 \pm 1885$  unidades arbitrarias) que en los ovocitos control ( $13.913 \pm 1449$  unidades arbitrarias, test de Student para muestras no apareadas,  $p = 0.0167$ ) (Figura 41).

Estos resultados pusieron de manifiesto entonces, la presencia de GAGs sulfatados en el ovocito.



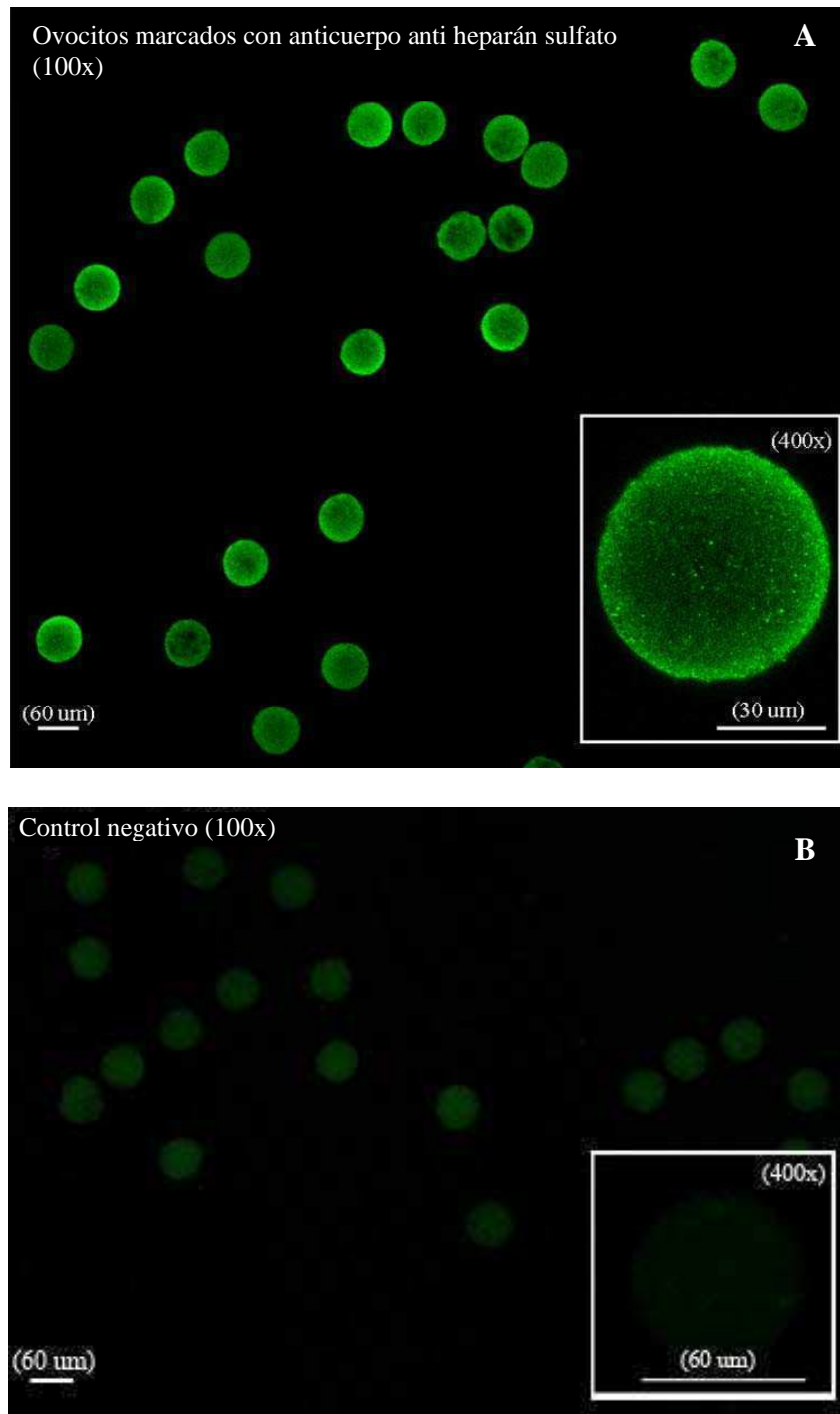
**Figura 40: Microscopía confocal de ovocitos de ratón teñidos con Rubipy.** **A:** ovocitos incubados en presencia de Rubipy 1 mg/ml en agua destilada a pH 1.5. **B y C:** imágenes correspondientes al mismo ovocito que A pero con la escala de color expandida para poder observar mejor las diferencias con el control negativo. **D:** ovocitos incubados en presencia de agua destilada solamente a pH 1.5 (control negativo). **E y F:** imágenes correspondientes al mismo ovocito que D pero con escala de color expandida. La intensidad de fluorescencia fue significativamente mayor en ovocitos con Rubipy que en ovocitos control ( $p < 0.05$ , test de Student para muestras no apareadas). La foto es representativa de 60 ovocitos teñidos y 40 ovocitos control en 4 experimentos diferentes.



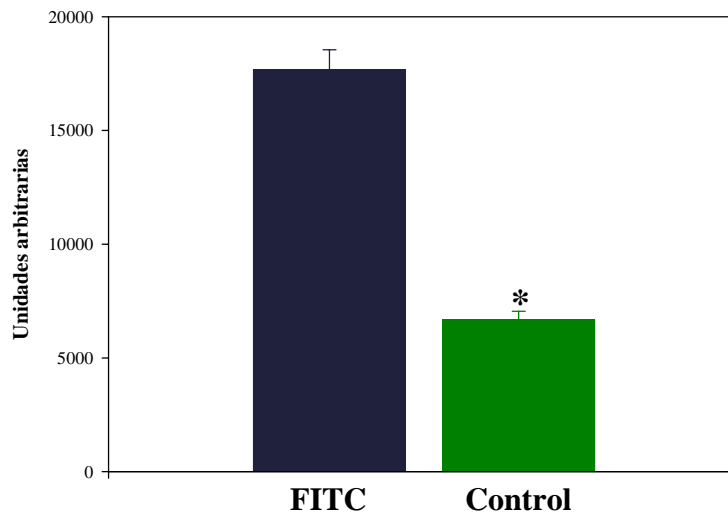
**Figura 41: Cuantificación de la marca obtenida con Rubipy.** La barra azul representa la cuantificación de la marca obtenida en aquellos ovocitos incubados en presencia de Rubipy. La barra verde representa la cuantificación de la marca obtenida en aquellos ovocitos incubados en ausencia del colorante (test de Student para muestras no apareadas,  $p=0.0167$ ).

### 2.1.2. Inmunocitoquímica de ovocitos con anticuerpo anti HS

Para poder evaluar específicamente la presencia de heparán sulfato en el ovocito, se llevó a cabo una inmunofluorescencia indirecta en ovocitos de ratón utilizando un anticuerpo monoclonal anti-heparán sulfato. El análisis por medio de microscopía confocal mostró una intensa marca fluorescente citoplasmática en aquellos ovocitos incubados en presencia del anticuerpo específico, mientras que no se observó prácticamente marca en aquellos ovocitos incubados en ausencia de dicho anticuerpo (Figura 42). Se evaluaron 150 ovocitos inmunomarcados y 120 ovocitos control (sin el primer anticuerpo) en 4 experimentos diferentes, y la cuantificación de la marca fluorescente demostró que la intensidad de la fluorescencia era 3 veces mayor en los ovocitos inmunomarcados ( $17.667 \pm 883$  unidades arbitrarias) que en los ovocitos control ( $6.668 \pm 378$  unidades arbitrarias; test de Student para muestras no apareadas,  $p < 0.0001$ ) (Figura 43).



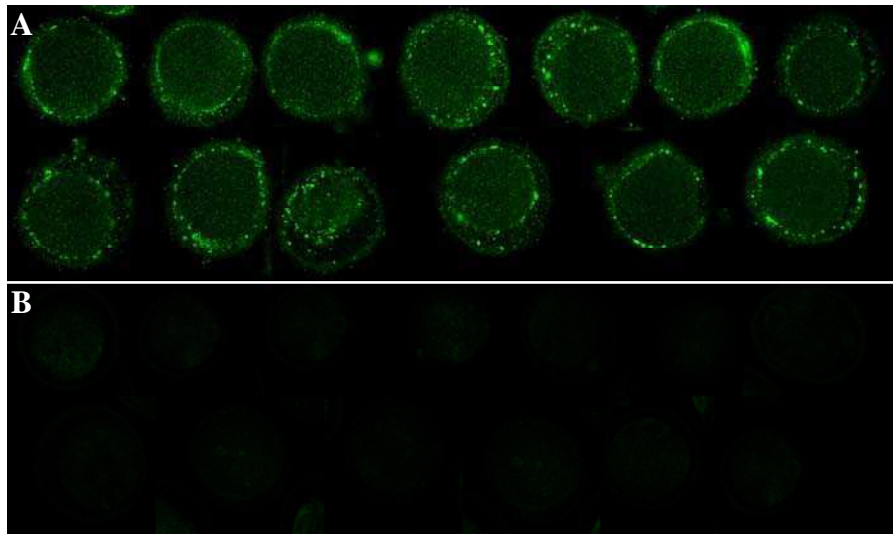
**Figura 42: Inmunocitoquímica de ovocitos de ratón utilizando un anticuerpo monoclonal anti-heparán sulfato.** Ovocitos sin zona pelúcida y permeabilizados fueron incubados en presencia (**A**) o en ausencia (**B**: control negativo) del anticuerpo monoclonal anti-heparán sulfato seguido de un segundo anticuerpo anti-IgM de ratón conjugado a FITC. Las imágenes son representativas de 270 ovocitos observados en 4 experimentos diferentes. La intensidad de la fluorescencia fue significativamente mayor (test de Student,  $p < 0.05$ ) en los ovocitos inmunomarcados que en los control.



**Figura 43: Cuantificación de la marca obtenida con anticuerpo anti-heparán sulfato.** La barra azul representa la cuantificación de la marca obtenida en aquellos ovocitos incubados en presencia del anticuerpo específico anti-heparán sulfato. La barra verde representa la cuantificación de la marca obtenida en aquellos ovocitos incubados en ausencia del anticuerpo (test de Student para muestras no apareadas,  $p < 0.0001$ ).

Habiendo encontrado heparán sulfato en el citoplasma del ovocito, se planteó la posibilidad de que el mismo también estuviera presente en la zona pelúcida. En consecuencia, se llevó a cabo inmunocitoquímica de ovocitos con zona pelúcida y sin permeabilizar. En la figura 44 se muestran las imágenes obtenidas al microscopio confocal, donde puede observarse claramente la presencia de marca fluorescente en el espacio perivitelino en los ovocitos incubados en presencia del primer anticuerpo (Figura 44 **A**), mientras que no se observó marca en los ovocitos control (sin primer anticuerpo) (Figura 44 **B**).





**Figura 44: Inmunocitoquímica de ovocitos con zona pelúcida.** Los ovocitos se incubaron en presencia de un anticuerpo monoclonal anti-heparán sulfato y un segundo anticuerpo marcado con FITC (panel **A**). Puede verse localización de marca específica en el espacio perivitelino. El control se realizó omitiendo el primer anticuerpo (panel **B**). La foto es representativa de 450 ovocitos observados en 6 experimentos diferentes.

Es decir, el HS no sólo estaría presente en el ooplasma sino también en el espacio perivitelino.

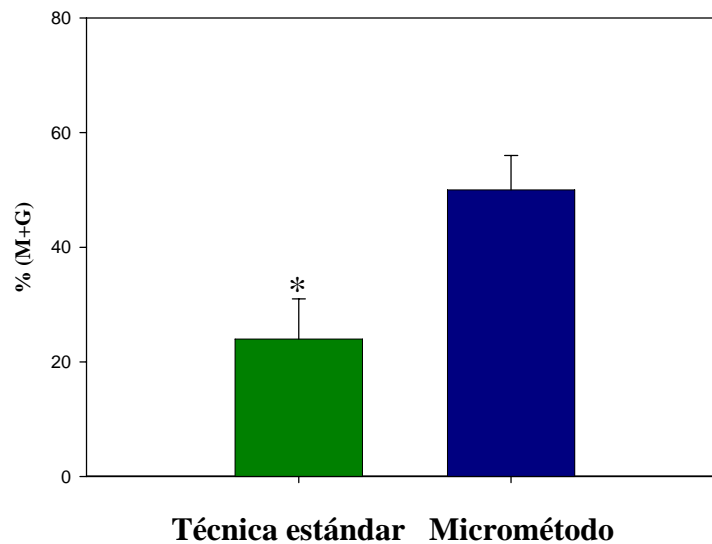
## **2.2. Descondensación de espermatozoides en presencia de ovocitos frescos de ratón**

### **2.2.1. Ensayo de descondensación: micrométodo**

Para poder evaluar la capacidad descondensante de ovocitos frescos de ratón, se desarrolló un ensayo de descondensación tal como se detallara en Materiales y Métodos (Sección 11.1). La figura 45 muestra los resultados obtenidos al descondensar espermatozoides capacitados procedentes de la misma muestra de semen utilizando ambas metodologías.

Con la técnica del micrométodo (entre portaobjetos y cubreobjetos), el porcentaje de descondensación fue significativamente mayor ( $49 \pm 5\%$ ) que con el ensayo estándar en

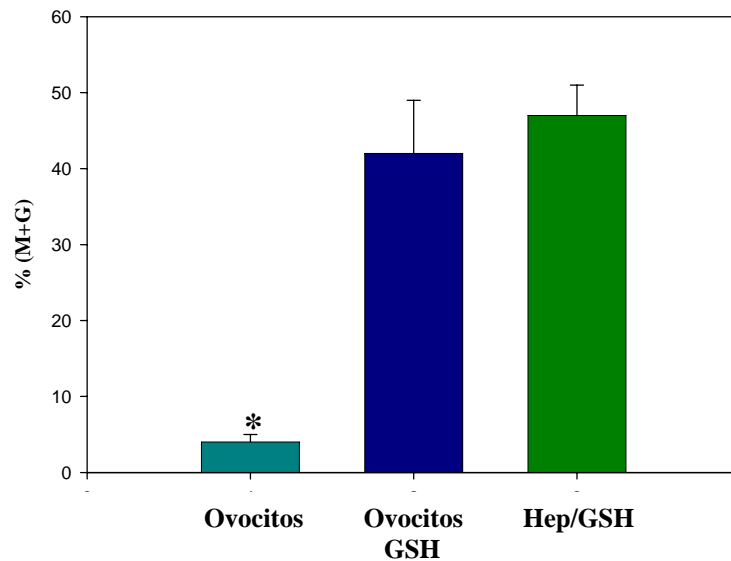
tubo de ensayo ( $24 \pm 6\%$ ,  $n = 9$ , test de Student para muestras apareadas,  $p < 0.007$ ). Los espermatozoides incubados en presencia sólo de heparina o sólo de GSH no mostraron descondensación alguna con cualquiera de los dos métodos.



**Figura 45: Comparación entre el ensayo estándar de descondensación y el micrométodo desarrollado.** En ambos casos, se descondensaron espermatozoides capacitados en presencia de heparina  $46 \mu\text{M}$  y GSH  $10 \text{ mM}$  (concentraciones finales), a  $37^\circ\text{C}$  y durante 60 minutos (estándar) o 210 minutos (micrométodo). %M + G: porcentaje de descondensación total. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ESM;  $n = 9$ ; \*  $p < 0.05$  vs. método estándar.

### 2.2.2. Descondensación en presencia de ovocitos

Se evaluó la capacidad descondensante de ovocitos frescos de ratón utilizando el micrométodo de descondensación y ovocitos con zona pelúcida. Tal como se observa en la figura 46, la descondensación alcanzada fue prácticamente nula cuando se incubaron espermatozoides humanos capacitados en presencia de ovocitos frescos solamente ( $4 \pm 1\%$ ), pero el agregado de GSH  $10 \text{ mM}$  produjo niveles de descondensación ( $42 \pm 7\%$ ) similares a los alcanzados en presencia de la mezcla descondensante clásica de heparina y GSH ( $47 \pm 4\%$ ), ( $n = 9$ , test de Student para muestras apareadas,  $p = 0.558$ ).

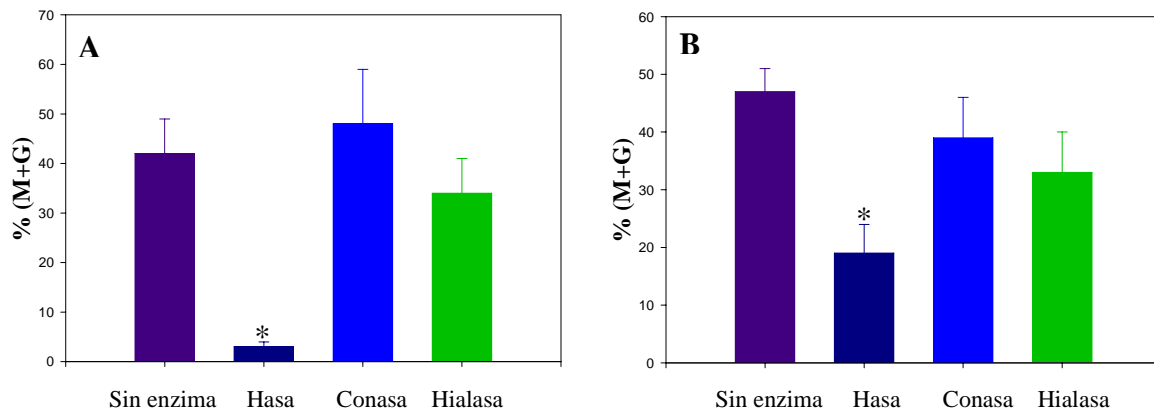


**Figura 46: Actividad descondensante *in vitro* de ovocitos de ratón.** Se descondensaron espermatozoides humanos capacitados en presencia de ovocitos frescos de ratón con zona pelúcida, ovocitos frescos de ratón con zona pelúcida + GSH 10 mM o heparina 46  $\mu$ M + GSH 10 mM a 37 °C, durante 210 minutos, utilizando el micrométodo entre portaobjetos y cubreobjetos. %M + G: descondensación total alcanzada. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ESM; n = 9.

### 2.2.3. Efecto de distintas glicosidasas sobre la capacidad descondensante del ovocito

Para averiguar si efectivamente la capacidad descondensante observada con los ovocitos frescos se debía a la presencia de heparán sulfato en el ooplasma, se descondensaron espermatozoides humanos capacitados en presencia de ovocitos de ratón con zona pelúcida con o sin el agregado de diferentes glicosidasas (Figura 47A). El porcentaje de descondensación máximo alcanzado a los 60 minutos de incubación disminuyó significativamente (ANOVA + Dunett,  $p = 0.0159$ ,  $n = 4$ ) con el agregado de heparinasa:  $3 \pm 1$  vs.  $42 \pm 7\%$  (control), mientras que ni el agregado de condroitinasa ABC ni el agregado de hialuronidasa tuvo efecto sobre los niveles de descondensación alcanzados:  $48 \pm 11\%$  para condroitinasa ABC y  $34 \pm 7\%$  para hialuronidasa (Figura

47A). La especificidad de las enzimas se evaluó descondensando espermatozoides con la mezcla estándar (heparina y GSH) con o sin el agregado de cada enzima (Figura 47B). Nuevamente se observó que el agregado de heparinasa provocó un descenso significativo de los niveles de descondensación ( $19 \pm 5\%$  vs.  $47 \pm 4\%$ ;  $n = 4$ , ANOVA + Dunnett;  $p = 0.0092$ ), mientras que el agregado de condroitinasa ABC o hialuronidasa no afectó significativamente dichos niveles ( $39 \pm 7\%$  y  $33 \pm 7\%$  respectivamente).



**Figura 47: Efecto de diferentes glicosidasas sobre la descondensación inducida por ovocitos de ratón. A:** Utilizando el micrométodo, se descondensaron espermatozoides humanos capacitados en presencia de ovocitos frescos de ratón y GSH 10 mM con o sin el agregado de glicosidasas específicas: heparinasa III (Hasa), condroitinasa ABC (Conasa) y hialuronidasa (Hialasa), a 37 °C durante 210 min. %M+G: porcentaje de descondensación total. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ESM ( $n = 4$ ). \* $p < 0.05$  vs. control (sin enzima). **B:** Espermatozoides humanos capacitados descondensados con heparina y GSH en presencia de cada una de las enzimas utilizadas, para corroborar la especificidad de las mismas.

Discusión

La función de la gameta masculina en el proceso de fertilización no culmina con la penetración al ooplasma. El espermatozoide, una vez ingresado al ovocito sufre una serie de cambios, la mayoría de ellos a nivel de su núcleo, que culmina con la transformación del mismo en el pronúcleo masculino. El primer cambio visible que se produce en el espermatozoide luego de ingresar al ooplasma es, justamente, la descondensación de su cromatina (Jager, 1990). Este proceso implica, para muchas especies incluyendo la humana, la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas que, según se ha demostrado ampliamente, ocurriría gracias a la acción del glutatión (GSH) presente en el ooplasma (Liu y col, 1992). Dicha tiorreducción constituiría el paso limitante en el proceso de descondensación nuclear (Perreault, 1990) y sería condición necesaria pero no suficiente para que ocurra la descondensación nuclear del espermatozoide *in vivo* (Perreault y col, 1984; Maeda y col, 1998). Al parecer, se necesitaría una molécula adicional, capaz de remover las protaminas unidas al ADN, permitiendo de esa manera que sean reemplazadas por histonas ovocitarias. Si bien se ha demostrado que la nucleoplasmina cumple con este rol en los anfibios (Philpott y col, 1991), y que la proteína p22 hace lo mismo en *Drosophila melanogaster* (Kawasaki y col, 1994), el aceptor de protaminas en mamíferos aún no ha sido identificado.

Resultados previos de nuestro laboratorio, estudiando la descondensación de espermatozoides humanos capacitados *in vitro* en presencia de heparina y GSH (Romanato y col, 2003), llevaron a proponer al heparán sulfato como posible aceptor de protaminas *in vivo*. En el presente trabajo, se ha profundizado en el estudio de la capacidad de éste y otros glicosaminoglicanos de promover la descondensación del núcleo espermático humano *in vitro* y se ha investigado la posible presencia del heparán sulfato en el ovocito de mamífero y su participación en el proceso de descondensación *in vivo*.

**Comportamiento de núcleos aislados de espermatozoides humanos frente a la descondensación con diferentes GAGs y GSH *in vitro*.**

Los experimentos que originariamente llevaron a proponer al HS como aceptor de protaminas en el proceso de descondensación *in vivo* se habían llevado a cabo *in vitro* utilizando espermatozoides humanos capacitados (Romanato et al, 2003). Sin embargo, en el momento en que ocurre la descondensación *in vivo*, el espermatozoide no sólo se ha capacitado durante su ascenso por el tracto genital femenino, sino que también ha sufrido la reacción acrosomal y se ha producido la fusión con la membrana plasmática del ovocito, de modo tal que el núcleo espermático se encuentra desnudo en el ooplasma. Es así que, en la primera parte de este trabajo se quiso evaluar la actividad descondensante de la heparina y demás glicosaminoglicanos sobre núcleos espermáticos aislados, con el fin de acercarse a las condiciones reales *in vivo*.

Se desarrolló un esquema de aislamiento y purificación de núcleos a partir de espermatozoides seminales que permitió obtener una fracción nuclear pura no contaminada con colas espermáticas. La efectividad de la técnica se controló por medio de inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo anti acrosina humana que puso de manifiesto que los núcleos aislados no presentaban acrosoma.

Los núcleos aislados pudieron ser descondensados eficazmente *in vitro* en presencia de heparina y GSH y al estudiar el patrón de descondensación de los mismos se pudieron identificar los tres estadios de descondensación ya definidos previamente (Romanato y col., 2003) para espermatozoides enteros: sin cambio (S), moderadamente descondensados (M) y groseramente descondensados (G). En forma semejante, Delgado y col. (2001), lograron descondensar satisfactoriamente nucleones de toro (estructura cromatínica altamente organizada que permanece luego de permeabilizar las membranas acrosomal, plasmática y nuclear del espermatozoide) en presencia de heparina y GSH.

Al evaluar la cinética de descondensación de núcleos aislados y compararla con la de espermatozoides enteros capacitados se observó que mientras que el nivel máximo de descondensación alcanzado por espermatozoides capacitados rara vez superaba el 20%, el de los núcleos aislados siempre llegaba al 100%, sugiriendo que la membrana plasmática del espermatozoide es una barrera poderosa contra la descondensación inducida por heparina y GSH. Efectivamente, datos previos de nuestro laboratorio (Romanato y col, 2003), habían llevado a concluir que sólo aquellos espermatozoides cuyas membranas hubieran sido alteradas durante la capacitación son susceptibles a ser descondensados en presencia de heparina y GSH. En forma semejante, Reyes y colaboradores (2002) han planteado que es necesario que la membrana plasmática del espermatozoide se encuentre permeabilizada para que la internalización de los compuestos inductores de la descondensación nuclear sea posible. Según estos autores, la heparina se uniría a la membrana plasmática de la misma manera que lo hace una hormona a su receptor, para luego desencadenar un efecto desestabilizador en la membrana celular.

Sorprendentemente, se observó que los núcleos aislados pudieron descondensarse *in vitro* en presencia de heparina solamente, aunque los niveles alcanzados fueron significativamente inferiores a los obtenidos en presencia de heparina y tiorreductor. Este fenómeno no se observó en espermatozoides capacitados, sobre los cuales la heparina por si sola fue incapaz de promover la descondensación espermática, en ausencia de GSH. Sin embargo, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Delgado y col. (2001), quienes lograron descondensar nucleones de toro en presencia de heparina y GSH o heparina solamente, alcanzando un 95% de descondensación total en ambos casos. Si ya se ha demostrado que el GSH del ovocito es necesario para la



descondensación del núcleo del espermatozoide en los mamíferos, ¿cómo podría explicarse esta paradoja?

Se ha propuesto que el espermatozoide humano posee un mecanismo intrínseco de tiorreducción para lograr la descondensación nuclear (Kvist, 1982). Dicho mecanismo podría depender de la presencia de tioles libres en las protaminas espermáticas, los cuales serían capaces de cambiar puentes -S-S- desde fibras intercromosomales a intracromosomales favoreciendo de esa manera la descondensación. Los tioles libres estarían normalmente estabilizados por la unión reversible de iones zinc; recordemos aquí que la protamina P2 tiene la capacidad de formar estructuras del tipo “dedo de Zn” (Bench y col, 2000; Pradeepa y col, 2007). Como consecuencia de la metodología utilizada para obtener núcleos aislados y en ausencia de fluidos del tracto reproductor masculino o femenino que contengan zinc (Kvist, 1980), los núcleos utilizados en los ensayos de descondensación podrían estar deplecionados de zinc, lo cual llevaría a que comenzara la tiorreducción autocatalítica y, eventualmente, la descondensación nuclear en presencia de heparina solamente, sin necesidad de agregar un tiorreductor exógeno.

Habiendo establecido que los núcleos aislados respondían satisfactoriamente a la descondensación *in vitro* en presencia de heparina y GSH, se intentó avanzar un paso más allá descondensando núcleos aislados y posteriormente desmembrados, es decir, cromatina aislada, tal como se la encontraría *in vivo* luego de la desaparición del envoltorio nuclear y previo al comienzo de la descondensación propiamente dicha (Tesarik y Kopečný, 1989). Los núcleos aislados y la cromatina aislada presentaron los mismos niveles de descondensación máxima y una cinética de descondensación semejante. Debido a esta semejanza, y dado que el manipuleo y la observación al microscopio de la cromatina aislada resultó mucho más compleja desde el punto de

vista práctico (tal como se detallara en la sección 1.3 de Resultados), se tomó la decisión de continuar el trabajo utilizando los núcleos aislados. Aunque se haya propuesto que *in vivo* la desaparición del envoltorio nuclear antecede a la descondensación propiamente dicha, el espermatozoide que recién ha ingresado al ooplasma conserva aún su membrana nuclear.

Resultados previos de nuestro laboratorio habían puesto de manifiesto que la sulfatación de la heparina es importante para su actividad descondensante en espermatozoides capacitados humanos *in vitro* (Romanato y col, 2003), tal como sucede con la mayoría de las actividades biológicas conocidas de la heparina en distintos sistemas (Jackson col, 1991; Bertolesi y col, 1997). En este trabajo evaluamos la influencia de la sulfatación de la heparina sobre su actividad descondensante en núcleos aislados utilizando las mismas heparinas parcialmente O- y N- desulfatadas utilizadas previamente con espermatozoides enteros. Tal como se viera al comparar la cinética de descondensación de núcleos aislados y espermatozoides enteros, el porcentaje de descondensación alcanzado con núcleos aislados en presencia de las heparinas modificadas fue significativamente superior al obtenido con espermatozoides enteros. Ya hemos discutido que el porcentaje de descondensación máximo alcanzado por los espermatozoides capacitados es bajo debido a que la membrana plasmática actuaría como barrera impidiendo el acceso de los agentes descondensantes al interior del núcleo. Una vez que la barrera es removida, el 100% de los núcleos aislados sufre descondensación. Sin embargo la capacidad descondensante de las distintas heparinas sobre núcleos aislados siguió el mismo patrón que el observado en espermatozoides enteros. Es decir, los núcleos aislados reaccionaron a cada heparina químicamente modificada de la misma manera que lo hicieron los espermatozoides enteros, excepto

por el nivel máximo de descondensación alcanzado. Es así que la heparina O/N-des N-ac, que es la más desulfatada, no presentó actividad descondensante, al igual que ha ocurrido en otros sistemas biológicos en los que se la ha utilizado (Bertolesi y col, 1994; Bertolesi y col, 1995; Bertolesi y col, 1997). Luego, tres heparinas presentaron actividad descondensante similar pese a su carga neta diferente: la heparina (carga neta -4), la heparina N-des N-ac (carga neta -3) y heparina O-des (carga neta-2) mientras que la heparina N-des que tiene carga neta -2 (igual que la heparina O-des) presentó una actividad descondensante retrasada en el tiempo. Estos resultados pusieron de manifiesto, tal como había sucedido con espermatozoides enteros, que la actividad descondensante de la heparina sobre núcleos aislados depende no sólo de la presencia de una fuerte carga neta negativa en la molécula, sino también de la localización de las cargas en la unidad disacáridica que, indudablemente, determinará la conformación adoptada por el glicosaminoglicano. Es decir, la actividad descondensante de la heparina no estaría vinculada a un simple fenómeno de atracción electrostática entre macromoléculas de cargas opuestas, sino que existiría un componente estructural asociado a dicha interacción. A este respecto, evidencias en la bibliografía muestran claramente que no todos los polímeros cargados negativamente tienen la capacidad de descondensar espermatozoides humanos *in vitro* en presencia de GSH (Jager y col, 1990).

En suma, los resultados hasta aquí obtenidos al comparar el comportamiento de espermatozoides enteros y núcleos aislados frente a la descondensación con heparina y GSH *in vitro* muestran que la actividad descondensante de la heparina sobre espermatozoides enteros es un reflejo de su actividad descondensante sobre núcleos espermáticos aislados. En otras palabras, la descondensación de espermatozoides

capacitados pone en evidencia la interacción directa de los agentes descondensantes con el núcleo en aquellos espermatozoides en los cuales la membrana plasmática se encuentra alterada como consecuencia del proceso de capacitación espermática. De esta manera, la descondensación de espermatozoides capacitados *in vitro* podría ser un buen modelo para estudiar la descondensación del núcleo del espermatozoide *in vivo*. Esto, incluso, podría tener importantes implicancias como herramienta de diagnóstico en el estudio de la infertilidad masculina, a través del desarrollo de un ensayo de funcionalidad espermática capaz de evaluar la capacidad del espermatozoide de descondensarse ante la exposición al estímulo adecuado.

Como ya se mencionara en la introducción, no existe heparina en el complejo cúmulus-ovocito, ya que la única célula del organismo capaz de sintetizarla es el mastocito. En consecuencia, el paso siguiente en este estudio fue buscar una molécula que, en virtud de su presencia en el complejo cúmulus-ovocito, pudiera ser el agente descondensante *in vivo*. El candidato óptimo fue, sin lugar a dudas, el heparán sulfato: otro glicosaminoglicano, análogo estructural de la heparina y que posee acciones biológicas semejantes a la misma en los diferentes sistemas en que se lo ha estudiado (Bellin y col, 1986; Jackson y col, 1991; Eriksen y col, 1997; Bertolesi y col, 1994). Se evaluó entonces la actividad descondensante *in vitro* sobre núcleos aislados de espermatozoides humanos de éste y otros GAGs cuya presencia en el complejo cúmulus-ovocito estuviera documentada en la bibliografía: condroitín sulfato, dermatán sulfato y ácido hialurónico (Yanagishita y col, 1979; Reyes y col, 1984; Bellin y col, 1986; Thérien y col, 2005). Una vez más, tal como ocurriera con las heparinas parcialmente desulfatadas, el efecto de los diferentes GAGs sobre la descondensación de núcleos aislados fue un fiel reflejo de lo ocurrido en la descondensación de espermatozoides

enteros capacitados. Es decir, el heparán sulfato presentó una actividad descondensante sobre núcleos aislados *in vitro* semejante a la de la heparina, condroitín sulfato y ácido hialurónico no mostraron actividad descondensante alguna, y dermatán sulfato presentó una actividad descondensante leve, significativamente inferior a la de heparán sulfato/heparina. Esta pequeña actividad descondensante del dermatán sulfato no resulta tan sorprendente a la luz de observaciones de otros autores (Lyon y col, 1998) que encontraron que los receptores para heparán sulfato presentes en la membrana de los hepatocitos de ratón, podían unir parcialmente dermatán sulfato. Indudablemente, esto sugeriría que ambos glicosaminoglicanos tendrían alguna característica estructural común, pero éste hecho no invalida que los resultados obtenidos al evaluar la actividad descondensante de diferentes GAGs refuercen nuestra hipótesis, la cual plantea que el heparán sulfato (en presencia de GSH) podría ser el agente descondensante de espermatozoides humanos *in vivo*.

Si el heparán sulfato fuera de hecho el agente responsable de la descondensación espermática en humanos *in vivo*, su papel en dicho proceso sería el de agente aceptor de protaminas para permitir el reemplazo de las mismas por histonas ovocitarias. Los resultados obtenidos al llevar a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos proteicos de núcleos espermáticos, previamente incubados en presencia de GSH y de diferentes GAGs, claramente respaldan esta idea. La ausencia de las bandas electroforéticas correspondientes a las protaminas P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> en los extractos obtenidos de núcleos previamente incubados con heparina o heparán sulfato y GSH, demostró que dichas proteínas fueron removidas de la cromatina espermática durante la incubación. En contraposición, ambas bandas estuvieron presentes en los extractos proteicos provenientes de núcleos incubados en presencia de GSH sólo o con el agregado de los

GAGs que previamente habían resultado inactivos como agentes descondensantes, demostrando que P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> siguieron asociadas a la cromatina del espermatozoide luego de la incubación.

### **Presencia del heparán sulfato en el ovocito y funcionalidad del mismo como agente descondensante**

Los resultados hasta aquí comentados no dejaron duda acerca de la capacidad del heparán sulfato de funcionar como aceptor de protaminas durante la descondensación del núcleo espermático humano *in vitro* en presencia de GSH. Para dar credibilidad a la hipótesis planteada acerca del funcionamiento del heparán sulfato como agente descondensante también *in vivo*, se hacía necesario verificar la presencia de este glicosaminoglicano en el ovocito.

Si bien este proyecto tiene por objeto ahondar en el proceso de descondensación del espermatozoide humano, se utilizaron para esta parte del estudio ovocitos de ratón en lugar de ovocitos humanos debido principalmente a cuestiones éticas y también de disponibilidad. El uso de ovocitos de otra especie no planteó un problema conceptual dado que hay amplias evidencias en la literatura que sugieren que el aceptor de protaminas en el ovocito no es específico de especie. Los espermatozoides humanos pueden descondensarse satisfactoriamente *in vitro* usando extractos de ovocitos de diferentes especies (Delgado y col, 1982; Maleszewski, 1990; Shimada y col, 2000) o luego de su inyección en ovocitos de otras especies (Perreault y col, 1988)

La primer estrategia utilizada para demostrar la presencia de heparán sulfato en el ovocito fue una técnica histoquímica sencilla por medio de la cual es posible identificar la presencia de residuos sulfato en la célula (Rozenberg y col, 2001). Dicha técnica se

basa en la tinción de las células con el colorante catiónico Rubipy a pH 1.5; en estas condiciones el único anión mayoritario en la célula que se encuentra como tal es el grupo sulfato ya que los carboxilos de los aminoácidos se ionizan entre pH 2 y 4 y el ácido carbónico se ioniza a pH 6 y, por lo tanto, a pH 1.5 se encuentran protonados. De hecho, la tinción con Rubipy se utiliza comúnmente para detectar heparina en geles o en mastocitos (Rozenberg y col, 2001). Los residuos sulfato en la célula se encuentran principalmente formando parte de la estructura molecular de los GAGs y, en consecuencia, la marca fluorescente observada en el ooplasma de los ovocitos expuestos al colorante fue tomada como un indicador positivo de la presencia de heparán sulfato. Los resultados obtenidos, sin duda, no descartaban la posibilidad de la presencia de otros GAGs sulfatados en el ooplasma, como podrían ser el condroitín sulfato y el dermatán sulfato. Sin embargo, esto no resultaba preocupante a los efectos de convalidar nuestra hipótesis de trabajo, ya que resultados previos de nuestro laboratorio (Romanato y col, 2003) y los ya descritos en este trabajo de tesis habían demostrado que dichos GAGs eran incapaces de descondensar espermatozoides humanos *in vitro*.

En una instancia posterior, la inmunocitoquímica de ovocitos sin zona pelúcida con un anticuerpo específico anti heparán sulfato, confirmó inequívocamente los resultados obtenidos a través de la tinción con Rubipy, demostrando la presencia de dicho GAG en el ooplasma.

El análisis adicional de algunos ovocitos con zona pelúcida reveló que si bien el heparán sulfato no estaba presente en la zona misma, se lo podía encontrar en el espacio perivitelino, con una distribución zonal focalizada y no homogénea. Estos resultados son muy interesantes pues plantean una alternativa a la idea hasta ahora propuesta de que el espermatozoide tendría su primer encuentro con el heparán sulfato al entrar al

ooplasma: que el espermatozoide lo capte en su tránsito hacia el interior del ovocito y lo internalice para luego conjuntamente con el GSH presente en el ovocito, lograr la descondensación del núcleo espermático. Esta nueva hipótesis estaría avalada por resultados previos de nuestro laboratorio (datos no publicados), obtenidos al utilizar heparina-FITC para visualizar la interacción entre espermatozoides capacitados y heparina, que permitieron observar marca fluorescente en la región post acrosomal. Si el heparán sulfato se uniera al espermatozoide en el momento en que el espermatozoide atraviesa las cubiertas del ovocito (zona pelúcida, espacio perivitelino, membrana plasmática), su asociación a la región post acrosomal sería necesaria ya sea para que no desapareciera al ocurrir la reacción acrosomal si la asociación fuera anterior al proceso excitotico o para que pudiera unirse al espermatozoide si fuera posterior al mismo.

Habiendo establecido fehacientemente que hay heparán sulfato en el ooplasma, cabe preguntar su origen. Por un lado, este glicosaminoglicano podría ser un producto de síntesis de las células foliculares que, luego, al ser transportado hacia el interior del ovocito, queda retenido en el espacio perivitelino. Es bien sabido que las células de la granulosa se encuentran en íntimo contacto y permanente interacción con el ovocito (Gosden y col, 1995) y su capacidad de sintetizar proteoglicanos de heparán sulfato, como así también de internalizar las cadenas de heparán sulfato de su superficie se encuentra ampliamente documentada (Yanagishita et al, 1992a; Yanagishita et al, 1992b). El tráfico de proteínas desde las células de la granulosa hacia el interior del ovocito es un fenómeno conocido desde hace mucho tiempo (Dandekar y col, 1991) y podría muy bien hacerse extensivo a otras macromoléculas como los glicosaminoglicanos. Alternativamente, el heparán sulfato podría muy bien ser un producto de síntesis del propio ovocito, externalizado e incorporado en forma de



proteoglicano (sindecan, en sus varias formas) a la membrana del ovocito, hacia el espacio perivitelino. Por el momento, no hay evidencias experimentales que puedan inclinar la balanza hacia una u otra hipótesis.

Una vez que se demostró que el heparán sulfato se encontraba presente en el ooplasma, fue importante corroborar que el mismo estaba efectivamente desempeñando algún rol en el proceso de descondensación nuclear del espermatozoide humano. Para lograrlo, se estudió el efecto de diferentes glicosidasas sobre la capacidad descondensante de ovocitos frescos de ratón *in vitro*.

Con este propósito, fue necesario desarrollar una metodología especial para evaluar la descondensación del espermatozoide: un micrométodo llevado a cabo sobre un portaobjetos en lugar de un tubo de ensayo, que se estandarizó utilizando la mezcla clásica de descondensación de heparina y GSH utilizada de rutina en nuestro laboratorio (Romanato y col, 2003). En las condiciones finales del experimento, el porcentaje de descondensación espermática fue significativamente mayor con el micrométodo que con la técnica de descondensación estándar, probablemente debido a la presencia de un gran número de espermatozoides muertos al final del período de incubación. De hecho, ya se ha comentado en este trabajo que resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que el porcentaje de descondensación observado en espermatozoides humanos capacitados correlacionaba con el porcentaje de células positivas a Eosina Y, sugiriendo que sería necesario que la membrana plasmática se encuentre dañada para que ocurra la descondensación (Romanato y col, 2003). De todos modos, esta discrepancia en el máximo nivel de descondensación alcanzada entre la técnica estándar y el micrométodo, no interfería con nuestro objetivo de lograr un sistema experimental confiable y

reproducibile que permitiera evaluar la descondensación espermática en pequeña escala, utilizando volúmenes muy pequeños.

Con esta metodología, los espermatozoides capacitados se descondensaron satisfactoriamente en presencia de ovocitos frescos y con el agregado de GSH, alcanzando niveles de descondensación similares a los obtenidos con heparina y GSH. Vale la pena comentar aquí que si bien la falta de descondensación cuando se incubaron espermatozoides capacitados con ovocitos frescos en ausencia de GSH fue sorprendente en un primer momento, se interpretó como consecuencia lógica de una rápida oxidación del GSH ovocitario sumada a la escasez de un sistema de regeneración de GSH funcional luego de la destrucción de la estructura ovocitaria al aplastar ovocitos con un cubreobjetos para realizar el experimento.

Los niveles máximos de descondensación espermática alcanzados con este sistema en presencia de ovocitos frescos fueron cercanos al 50%. Existen amplias evidencias en la literatura acerca de la capacidad limitada del ooplasma para posibilitar la formación del pronúcleo y el reordenamiento cromosómico luego de la fertilización (Witkowska, 1981; Clarke y Masui, 1987; Wakayama y Yanagimachi, 1998). Interesantemente, publicaciones anteriores de Hirao y Yanagimachi (1979), mostraron que ovocitos de hámster sin zona pelúcida fueron capaces de descondensar al menos 50 espermatozoides luego de una fertilización *in vitro*. Nuestros resultados indican que, bajo nuestras condiciones experimentales y en presencia de ovocitos aplastados manualmente, un ovocito posee la capacidad de descondensar un número sustancialmente mayor de espermatozoides.

Tal como se mencionara en un párrafo anterior, el micrométodo de descondensación se desarrolló con el objeto de evaluar la capacidad de ovocitos frescos de ratón de descondensar espermatozoides humanos *in vitro* en presencia de diferentes glicosidasas.

Esta capacidad se redujo significativamente ante el agregado de heparinasa III, que hidroliza específicamente heparina y heparán sulfato, pero no se modificó en presencia de otras glicosidasas (condroitinasa y hialuronidasa) que hidrolizan a los restantes glicosaminoglicanos, indicando que la descondensación observada en presencia de los ovocitos se podría efectivamente atribuir a la presencia de heparán sulfato.

En resumen, los resultados presentados en este trabajo demuestran por primera vez la presencia de heparán sulfato en ovocitos de mamífero y proveen evidencias que sugieren que este glicosaminoglicano es necesario para la descondensación satisfactoria de la cromatina del espermatozoide *in vitro*, respaldando nuestra hipótesis de trabajo que propone que el heparán sulfato estaría funcionando como aceptor de protaminas durante el proceso de descondensación *in vivo*.

Por un lado, estas evidencias contribuyen a profundizar en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el complejo proceso reproductivo, hecho que a su vez favorece el desarrollo de nuevos ensayos de funcionalidad de gametas en el estudio de parejas infértiles, con miras al mejoramiento permanente de la calidad de la atención médica que se puede brindar a quienes sufren esta patología que afectará alguna vez a por lo menos 1 de cada 10 parejas en edad reproductiva.

Y por otro, tal como sucede cada vez que se plantea una hipótesis y se trata de corroborarla, este trabajo ha abierto una nueva caja de Pandora y nos ha inundado de otras preguntas que esperan respuesta...

- ¿Por qué hay heparán sulfato en el espacio perivitelino?
- En caso que sea internalizado al ovocito, ¿de qué manera lo hace?

- ¿Son capaces las células de la granulosa de sintetizar heparán sulfato y sus proteoglicanos?
- ¿Cómo se encuentra el heparán sulfato? ¿Libre? ¿Unido a proteínas?
- ¿Es el espermatozoide capaz de unirse al heparán sulfato durante su paso por el espacio perivitelino? En caso de que así sea, ¿con qué objeto?

Hacia estos rumbos se dirigirán nuestros esfuerzos en el futuro próximo.

## Bibliografía

**Agarwal A** y Allamaneni SS. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol.* 2004; 56(3): 235-245.

**Amann RP**, Katz DF y Wang C. ¿Qué es el semen? ¿Cómo contribuye el espermograma a evaluar la capacidad reproductiva del varón? En *Manual de Andrología* (Robaire B, Pryor JL y Trasler JM. Eds). 1994: pág. 25. American Society of Andrology.

**Auger J**, Schoevaert D, Negulesco I y Dadoune JP. The nuclear status of human sperm cells by TEM image cytometry: nuclear shape and chromatin texture in semen samples from fertile and infertile men. *J. Androl.* 1993; 14 (6): 456-463.

**Austin CR.** Fertilization. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall; 1965.

**Bach O**, Glander HJ, Scholz G y Schwarz J. Electrophoretic patterns of spermatozoal nucleoproteins (NP) in fertile men and infertility patients and comparison with NP of somatic cells. *Andrología.* 1990; 22(3): 217-224.

**Balhorn R.** A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell. Biol.* 1982; 93 (2): 298-305

**Balhorn R**, Weston S, Thomas C y Wyrobek AJ. DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Exp. Cell. Res.* 1984; 150(2): 298-308.

**Balhorn R**, Reed S y Tanphaichitr N. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia.* 1988; 44(1): 52-55.

**Ball GD**, Bellin ME, Ax RL y First NL. Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocyte complexes: morphology and chemistry. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1982; 28 (1): 113-122.

**Bedford JM**, Cooper GW. Membrane fusion events in fertilization of vertebrate eggs. En: Poste G, Nicolson GL, eds. Membrane Surface Reviews (membrane Fusion), Vol. 5. Amsterdam: North-Holland; 1978: 65-125.

**Bellin ME**, y Ax RL. Chondroitin sulfate: an indicator of atresia in bovine follicles. Endocrinology. 1984; 114 (2): 428-434.

**Bellin ME**, Ax RL, Laufer N y col. Glycosaminoglycans in follicular fluid from women undergoing in vitro fertilization and their relationship to cumulus expansion, fertilization, and development. Fertil. Steril. 1986; 45 (2): 244-248.

**Bellvé AR**, Anderson E y Hanley Bowdoin L. Synthesis and amino acid composition of basic proteins in mammalian sperm nuclei. Dev. Biol. 1975; 47(2): 349-365.

**Bellvé AR** y O'Brien DA. The mammalian spermatozoon: structural and temporal assembly. En Mechanisms of Mammalian Fertilization. (J. F. Hartman. ed.). Academic Press, New York. 1983; pp 55-137

**Belokopytova IA**, Kostyleva EI, Tomilin AN y Vorob'ev VI. Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. Mol. Reprod. Dev. 1993; 34: 53-57

**Bench G**, Corzett MH, Kramer CE, Grant PG y Ballhorn R. Zinc is sufficiently abundant within mammalian sperm nuclei to bind stoichiometrically with protamine 2. Mol. Reprod. Dev. 2000; 56(4): 512-519.

**Bendet IJ** y Bearden J Jr. Birefringence of spermatozoa. II. Form birefringence of bull sperm. J. Cell. Biol. 1972; 55 (2): 501-510.

**Bertolesi GE**, Lauría de Cidre S y Eiján AM. Growth inhibition in vitro of murine mammary adenocarcinoma cells by heparin and chemically modified heparins. Tumour Biol. 1994; 15(5): 275-283.

**Bertolesi GE**, Lauría de Cidre S, Sacerdote de Lustig E y Eiján AM. Heparin receptors in two murine mammary adenocarcinomas with different metastatic ability: relationship with growth inhibition. *Cancer Lett.* 1995; 90(2): 123-131.

**Bertolesi GE**, Farias EF, Alonso DF, Bal de Kier Joffé E, Lauría de Cidre S y Eiján AM. Insight into the profibrinolytic activity of heparin: effects on the activation of plasminogen mediated by urokinase. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 1997; 8 (7): 403-410.

**Blanchard Y**, Lescoat D y Le Lannou D. Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-headed human spermatozoa. *Andrologia.* 1990; 22(6): 549-555.

**Brackett BG** y Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 1975; 12: 260-274.

**Burns KH**, Viveiros MM, Ren Y, Wang P, DeMayo FJ y col. Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science.* 2003; 300: 633-636.

**Chargaff E** y Olson KB. Studies on the chemistry of blood coagulation. VI. Studies on the action of heparin and other coagulants. The influence of protamina on the anticoagulant effect in vivo. *J. Biol. Chem.* 1938; 122: 153-167.

**Chenoweth PJ.** Influence of the male on embryo quality. *Theriogenology.* 2007; 68(3): 308-315.

**Chevallier Ph**, Mauro N, Feneux D, Jouannet P y David G. Anomalous protein complement of sperm nuclei in some infertile men. *The Lancet.* 1987. Octubre, 3.

**Cho C**, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB y Eddy EM. Haploinsufficiency of protamine 1 or 2 causes infertility in mice. *Nat. Genet.* 2001; 28 (1): 82-86.



- Clarke HJ** y Masui Y. Dose-dependent relationship between oocyte cytoplasmic volume and transformation of sperm nuclei to metaphase chromosomes. *J. Cell. Biol.* 1987; 104: 831-840.
- Corzett M**, Kramer C, Blacher R, Mazrimas JA, Balhorn R. Analysis of hamster protamines: primary sequence and species distribution. *Mol. Reprod. Dev.* 1999; 54(3): 273-282.
- Corzett M**, Mazrimas J y Balhorn R. Protamine 1: Protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol. Reprod. Dev.* 2002; 61: 519-527.
- Curry MR** y Watson PF. Gametes: The spermatozoon. En: Grudzinskas JG y Yovich JL eds. *Sperm structure and function*. Cambridge: University Press, 1995: (3); 45-69.
- Dandekar PV**, Martin MC y Glass RH. Maturation of immature oocytes by coculture with granulosa cells. *Fertil. Steril.* 1991; 55(1): 95-99.
- Delgado NM**, Reyes R, Huacuja L, Merchant H y Rosado A. Heparin binding sites in the human spermatozoa membrane. *Arch. Androl.* 1982; 8 (2): 87-95.
- Delgado NM**, Reyes R, Huacuja L, Carranco A, Merchant H y Rosado A. Decondensation of human sperm nuclei by glycosaminoglycan-sulfate from sea urchin egg. *J. Exp. Zool.* 1982; 224(3): 457-460.
- Delgado NM**, Sanchez-Vazquez ML, Reyes R y Merchant-Larios H. Nucleons, I: A model for studying the mechanism of sperm nucleus swelling in vitro. *Arch. Androl.* 1999; 43 (1): 85-95.
- Delgado NM**, Flores-Alonso JC, Rodriguez-Hernandez HM, Merchant-Larios H y Reyes R. Heparin and glutathione II: correlation between decondensation of bull sperm cells and its nucleons. *Arch. Androl.* 2001; 47 (1): 47-58.
- Dooher GB** y Bennett D. Fine structural observations on the development of the sperm head in the mouse. *Am. J. Anat.* 1973; 136(3): 339-361.

**Drobnis EZ**, Yudin AI, Cherr GN, Katz DF. Hamster sperm penetration of the zona pellucida: kinematic analysis and mechanical implications. *Dev. Biol.* 1988; 130: 311-323.

**Eriksen GV**, Malmstrom A y Uldbjerg N. Human follicular fluid proteoglycans in relation to in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 1997; 68 (5): 791-798.

**Farhi J**, Ben-Haroush A, Dresler H, Pinkas H, Sapir O y Fisch B. Male factor infertility, low fertilisation rate following ICSI and low number of high-quality embryos are associated with high order recurrent implantation failure in young IVF patients. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 2008; 87(1): 76-80.

**Fedarko NS** y Conrad HE. A unique heparan sulfate in the nuclei of hepatocytes: structural changes with the growth state of the cells. *J. Cell. Biol.* 1986; 102 (2): 587-599.

**Feyerabend TB**, Li JP, Lindahl U y Rodewald HR. Heparan sulfate C5-epimerase is essential for heparin biosynthesis in mast cells. *Nat. Chem. Biol.* 2006; 2(4): 195-196.

**Foresta C**, Zorzi M, Rossato M y Varotto A. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int. J. Androl.* 1992; 15 (4): 330-337.

**Frehlick LJ**, Eirin-Lopez JM y Ausió J. New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *BioEssays.* 2007; 29: 49-59.

**Funahashi H**, Bando N, Nakahira S, Oh SH y Tsuboi S. Changes in intracellular content of glutathione and thiols associated with gamma-glutamyl cycle during sperm penetration and pronuclear formation in rat oocytes. *Zygote.* 1999; 7(4): 301-305.

**Gatewood JM**, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM y Schmid CW. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science*. 1987; 236 (4804): 962-964.

**Gebauer H**, Lindner HR y Amsterdam A. Synthesis of heparin-like glycosaminoglycans in rat ovarian slices. *Biol. Reprod.* 1978; 18 (3): 350-358.

**Goldberg RB**, Geremia R y Bruce WR. Histone synthesis and replacement of during spermatogenesis in the mouse. *Differentiation*. 1977; 7(3): 167-180.

**Gopalkrishnan K**, Hinduja IN y Kumar TC. In vitro decondensation of nuclear chromatin of human spermatozoa: assessing fertilizing potential. *Arch. Androl.* 1991; 27(1): 43-50.

**Gosden RG** y Bownes M. Molecular and cellular aspects of oocyte development. En: *Gametes - The Oocyte*. JL Yovich y JG Grudzinskas editores. Cambridge University press, 1995. pp 23-53

**Hanger-Mcwhirter A**, Lindahl U y Li J. Biosynthesis of heparin/heparan sulfate: mechanism of epimerization of glucuronyl C-5. *Biochem. J.* 2000; 347(1): 69-75.

**Handrow RR**, Boehm SK, Lenz RW, Robinson JA y Ax RL. Specific binding of the glycosaminoglycan 3H-heparin to bull, monkey, and rabbit spermatozoa in vitro. *J. Androl.* 1984; 5 (2): 51-63.

**Hirao Y** y Yanagimachi R. Development of pronuclei in polyspermic eggs of the golden hamster: is there any limit to the number of sperm heads that are capable of developing into male pronuclei? *Zool. Mag. (Tokyo)* 1979; 88: 24-33.

**Hiscock DR**, Yanagishita M, Hascall VC. Nuclear localization of glycosaminoglycans in rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem.* 1994; 269(6):4539-46.

**Honda A**, Siruntawineti J y Baba T. Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. *Hum. Reprod.* 2002; 8(5): 405-412.

**Iguchi N**, Yang S, Lamb DJ y Hecht NB. An SNP in protamine 1: a possible genetic cause of male infertility? *J. Med. Genet.* 2006; 46: 382- 384.

**Jackson RL**, Busch SJ y Cardin AD. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol. Rev.* 1991; 71 (2): 481-539.

**Jaffe LF**. Sources of calcium in egg activation: a review and hypothesis. *Dev. Biol.* 1983; 99(2): 265-276.

**Jager S**. Sperm nuclear stability and male infertility. *Arch. Androl.* 1990; 25 (3): 253-259.

**Jager S**, Wijchman J y Kremer J. Studies on the decondensation of human, mouse and bull sperm nuclei by heparin and other polyanions. *J. Exp. Zool.* 1990; 256(3): 315-322.

**Kawasaki K**, Philpott A, Avilion AA, Berrios M y Fisher PA. Chromatin decondensation in *Drosophila* embryo extracts. *J. Biol. Chem.* 1994; 269 (13): 10169-10176.

**Kim E**, Yamashita M, Kimura M, Honda A, Kashiwabara S y Baba T. Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int. J. Dev. Biol.* 2008; 52: 677-682.

**Koehler JK**. Human sperm head ultrastructure: a freeze-etching study. *J. Ultrastruct. Res.* 1972; 39 (5): 520-539.

**Kramer JA** y Krawetz SA. RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome. *Mol. Hum. Reprod.* 1997; 3 (6): 473-478.

**Krohne G** y Franke WW. A major soluble acidic protein located in nuclei of diverse vertebrate species. *Exp. Cell. Res.* 1980; 129(1): 167-189.

**Kvist U.** Importance of spermatozoal zinc as temporary inhibitor of sperm nuclear chromatin decondensation ability in man. *Acta Physiol Scand.* 1980; 109: 79-84.

**Kvist U.** Spermatozoal thiol-disulphide interaction: a possible event underlying physiological sperm nuclear chromatin decondensation. *Acta Physiol. Scand.* 1982; 115: 503-505.

**Kvist U,** Kjellberg S, Björndahl L, Hammar M y Roomans GM. Zinc in sperm chromatin and chromatin stability in fertile men and men in barren unions. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 1988; 22(1): 1-6.

**Lalich RA,** Vedantham S, McCormick N, Wagner C y Prins GS. Relationship between heparin binding characteristics and ability of human spermatozoa to penetrate hamster ova. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 86 (1): 297-302.

**Laskey RA,** Honda BM, Mills AD y Finch JT. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature.* 1978; 275(5679): 416-420.

**Lassalle B** y Testart J. Relationship between fertilizing ability of frozen human spermatozoa and capacity for heparin binding and nuclear decondensation. *J. Reprod. Fertil.* 1992; 95 (2): 313-324.

**Lindahl U** y Kjellen L. Heparin or heparan sulfate-what is the difference? *Thromb. Haemost.* 1991; 66 (1): 44-48.

**Liu DY,** Elton RA, Johnston WI y Baker HW. Spermatozoal nuclear chromatin decondensation in vitro: a test for sperm immaturity. Comparison with results of human in vitro fertilisation. *Clin. Reprod Fertil.* 1987; 5(4): 191-201.

**Liu DY** y Baker HW. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertil. Steril.* 1992; 58 (6): 1178-1184.

**Lyon M**, Deakin JA, Rahmoune H, Fernig DG, Nakamura T y Gallagher JT. Hepatocyte growth factor/scatter factor binds with high affinity to dermatan sulfate. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(1): 271-278.

**Maeda Y**, Yanagimachi H, Tateno H, Usui N y Yanagimachi R. Decondensation of the mouse sperm nucleus within the interphase nucleus. *Zygote*, 1998; 6: 39-45.

**Maleszewski M**. Decondensation of Mouse sperm chromatin in cell-free extracts: a micromethod. *Mol. Reprod. Devel*, 1990; 27: 244-248.

**Marushige Y** y Marushige K. Enzymatic unpacking of bul sperm chromatin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1975; 403(1): 180-191.

**Marushige Y** y Marushige K. Dispersion of mammalian sperm chromatin during fertilization: an in vitro study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1978; 519(1): 1-22.

**Matsumoto A**. Espermatogénesis. En: Hadashi E, Rock J, Rosenwaks Z (eds). *Reproductive Endocrinology, Surgery ad Technology*, Philadelphia-New Cork. Lippincott-Raven, 1996; pp 359-384.

**Meister A** y Anderson ME. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 1989; 52: 711-760.

**Meseguer M**, Martinez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohí J y Garrido N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study the male infertility prognostic factor. *Fertil. Steril.* 2008; 89(5): 1191-1199.

**Mills AD**, Laskey RA, Black P y De Robertis EM. An acidic protein which assembles nucleosomes in vitro is the most abundant protein in *Xenopus* oocyte nuclei. *J. Mol. Biol.* 1980; 139(3): 561-568.

**Montag M**, Tok V, Liow SL, Bongson A y Nicolle JC. In vitro decondensation of mammalian sperm and subsequent formation of pronuclei-like structures for micromanipulation. *Mol. Reprod. Dev.* 1992; 33(3): 338-346.

**Moore HDM**, Bedford JM. The interaction of mammalian gametes in the female. En: Hartmann JF, ed. *Mechanism and Control of Animal Fertilization*. New York: Academic Press; 1983: 453-497.

**Mortimer D**, Shu M y Tan R. Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in semen analysis. *Hum. Reprod.* 1986; 4: 166.

**Ohsumi K** y Katagiri C. Characterization of the ooplasmic factor inducing decondensation of and protamine removal from toad sperm nuclei: involvement of nucleoplasmin. *Dev. Biol.* 1991; 148: 295-305.

**OMS** (1999). *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*, 4<sup>th</sup> edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

**Palermo GD**, Colombero LT y Rosenwaks Zev. The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development. *Rev. Reprod.* 1997; 2: 19-27.

**Panyim S** y Chalkley R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Biochem. Biophys.* 1969; 130 (1): 337-346.

**Perreault SD** y Zirkin BR. Mechanisms of sperm nuclear decondensation in mammalian oocytes. *J. Cell. Biol.* 1983; 97: 26A.

**Perreault SD**, Wolff RA y Zirkin BR. The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation *in vivo*. *Dev. Biol.* 1984; 101: 160-167.

**Perreault SD**, Naish SJ y Zirkin BR. The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content. *Biol. Reprod.* 1987; 36: 239-244.

**Perreault SD**, Barbee RR, Elstein KH, Zucker RM y Keefer CL. Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm micro-injection and in vitro by flow cytometry. *Biol. Reprod* 1988; 39: 157-67.

**Perreault SD** y Barbee RR. Sperm nuclear stability is related to the type of protamine present: evidence from three hamster and two primate species. *Biol. Reprod.* 1988; 38 (suppl 1): 142.

**Perreault SD**. Regulation of sperm nuclear reactivation during fertilization. En Bavister BD, Cumming SJ, Roldan ERS (eds). *Fertilization in Mammals*. Norwell: Serono Symposia, 1990; 285-296.

**Philpott A**, Leno GH y Laskey RA. Sperm decondensation in *Xenopus* egg cytoplasm is mediated by nucleoplasmin. *Cell.* 1991; 65 (4): 569-578.

**Philpott A** y Leno GH. Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Cell.* 1992; 69: 759-767.

**Philpott A**, Krude T y Laskey RA. Nuclear chaperones. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2000; 11: 7-14

**Piko L**. Gamete structure and sperm entry in mammals. En Melz CB, Monroy A Eds. *Fertilization*, Vol. 2. New Cork: Academyc Press; 1979: 325-403.

**Pradeepa MM** y Rao MR. Chromatin remodeling during mammalian spermatogenesis: role of testis specific histone variants and transition proteins. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 2007; 63: 1-10.

**Prado A**, Ramos I, Frehlick LJ, Muga A y Ausió J. Nucleoplasmin: a nuclear chaperone. *Biochem. Cell. Biol.* 2004; 82: 437-445.



**Reyes R**, Carranco A, Hernandez O, Rosado A, Merchant H, y Delgado NM. Glycosaminoglycan sulfate as acrosomal reaction-inducing factor of follicular fluid. Arch. Androl. 1984; 12 (2-3): 203-209.

**Reyes R**, Rosado A, Hernandez O y Delgado NM. Heparin and glutathione: physiological decondensing agents of human sperm nuclei. Gamete Res. 1989; 23 (1): 39-47.

**Reyes R**, Flores-Alonso JC, Rodriguez-Hernandez HM, Merchant-Larios HM y Delgado NM. Nucleons II: cryopreservation and metabolic activity. Arch. Androl. 2001; 47 (1): 23-29.

**Reyes R**, Martinez JC, Delgado NM y Merchant-Larios H. Heparin-glutathione III: study with fluorescent probes as indicators of membrane status of bull sperm. Arch. Androl. 2002; 48(3): 209-219.

**Romanato M**, Cameo MS, Bertolesi G y col. Heparan sulphate: a putative decondensing agent for human spermatozoa in vivo. Hum. Reprod. 2003; 18 (9): 1868-1873.

**Roosen-Runge EC**. The process of spermatogenesis in mammals. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 1962; 37: 343-377.

**Rosemberg RD**, Shworak, N. W.; Liu, J; Schwartz, J. J. y Zhang, L. J. Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. J. Clin. Invest. 1997; 99: 2062-2070

**Rozenberg GI**, Espada J, de Cidre LL, Eiján AM, Calvo JC y Bertolesi GE. Heparan sulfate, heparin and heparinase activity detection on polyacrylamide gel electrophoresis using the fluorochrome tris(2,2'-bipyridine) ruthenium (II). Electrophoresis. 2001; 22: 3-11.

**Salustri, A.;** Yanagishita, M. y Hascall, V. C. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *J. Biol. Chem.* 1989; 264 (23): 13840-13847.

**Sánchez-Vázquez ML,** Flores-Alonso JC, Merchant-Larios H y Reyes R. Presence and release of bovine sperm histone H1 during chromatin decondensation by heparin-glutathione. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2008; 54(6): 221-230.

**Shamsi MB,** Kumar R y Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J. Med. Res.* 2008; 127: 115-123.

**Shimada A,** Kikuchi K, Noguchi J, Akama K, Nakano M y Kaneko H. Protamine dissociation before decondensation of sperm nuclei during in vitro fertilization of pig oocytes. *J. Reprod Fertil.* 2000; 120: 247-256.

**Sun QY** y Schatten H. Centrosome inheritance after fertilization and nuclear transfer in mammals. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007; 591: 58-71.

**Szollosi D.** Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster eggs. *Anat. Rec.* 1967; 159(4): 431-446.

**Tanphaichitr N,** Sobhon P, Taluppeth N y Chalermisarachai P. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp. Cell. Res.* 1978; 117 (2): 347-356.

**Tesarik, J.** y Kopečný, V. Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Res.* 1989; 24 (2): 135-149.

**Thérien I,** Bergeron A, Bousquet D y Manjunath P. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* 2005; 71(1): 97-106.

**Turner PR**, Jaffe LA y Fein A. Regulation of cortical vesicle exocytosis in sea urchin eggs by inositol 1,4,5-triphosphate and GTP-binding protein. *J. Cell. Biol.* 1986; 102(1): 70-76.

**Usui N** y Yanagimachi R. Behavior of hamster nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. *J. Ultr. Res.* 1976; 57: 276-288.

**Virji N**; Phillips DM; Dunbar BS. Identification of extracellular proteins in the rat cumulus oophorus. *Mol. Reprod. Dev.* 1990; 25: 339-344

**Wakayama T** y Yanagimachi R. Fertilisability and developmental ability of Mouse oocytes with reduced amounts of cytoplasm. *Zygote.* 1998; 6: 341-346.

**Ward WS** y Coffey D. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol. Reprod.* 1991; 44: 569-574

**Warrant RW** y Kim SH. Alpha-Helix-double helix interaction shown in the structure of a protamine transfer RNA complex and a nucleoprotamine model. *Nature (Lond)* 1978; 271: 130-135

**Wassarman PM** y Litscher ES. Mammalian fertilization is dependent on multiple membrane fusion events. *Methods Mol. Biol.* 2008; 475: 99-113.

**Wiesel, S.** y Schultz, G. A. Factors which may affect removal of protamine from sperm DNA during fertilization in the rabbit. *Gamete Res.* 1981; 4: 25-34.

**Witkowska A.** Pronuclear development and the first cleavage division in polyspermic mouse eggs. *J. Reprod. Fertil.* 1981; 62: 493-498.

**Yanagimachi R.** Mechanisms of fertilization in mammals. En: Mastroianni L, Biggers JD, eds. *Fertilization and Embryonic Development In Vitro.* New York: Plenum Press, 1981: 81-187.

- Yanagimachi R.** Sperm-egg fusion. En: Duzgunes N, Broonner F, eds. *Current topics in membranes and transport*. San Diego: Academic Press; 1988a 32: 3-43.
- Yanagimachi R.** Mammalian fertilization. En: Knobil E, Nelly J y col., eds. *The Physiology of Reproduction*, vol 1. New York: Raven Press, 1988b: 135-185.
- Yanagimachi R.** Mammalian fertilization. En *The Physiology of Reproduction* 2<sup>nd</sup> Edn. 1994; 189-317. Eds. E Knobil y JD Neill. Raven Press Ltd, New York.
- Yanagishita M.**; Rodbard, D. y Hascall, V. C. Isolation and characterization of proteoglycans from porcine ovarian follicular fluid. *J. Biol. Chem.* 1979; 254(3): 911-920.
- Yanagishita M.** y Hascall, V. C. Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 1992a; 267 (14): 9451-9454.
- Yanagishita M.** Metabolism of plasma membrane-associated heparan sulfate proteoglycans. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1992b; 313: 113-120.
- Yebra, L.**; Balleca, J. L.; Vanrell, J. A.; Bassas, L. y Oliva, R. Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J. Biol. Chem.* 1993; 268 (14): 10553-10557
- Yoshida M,** Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M y Pursel VG. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol. Reprod.* 1993; 49(1): 89-94.
- Zahn A,** Furlong LI, Biancotti JC, Ghiringhelli PD, Marín-Briggiler CI y Vazquez-Levin MH. Evaluation of the proacrosin/acrosin system and its mechanism of activation in human sperm extracts. *J. Reprod. Immunol.* 2002; 54: 43-63.
- Zirkin BR** y Chang TS. Involvement of endogenous proteolytic activity in thiol-induced release of DNA template restrictions in rabbit sperm nuclei. *Biol. Reprod.* 1977; 17(1): 131-137.

**Zirkin BR**, Soucek DA y Chang TS. Sperm nuclear packing and regulation during spermatogenesis and fertilization. Johns Hopkins Med. J. 1982; 151(3): 101-112.