Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

La descondensación de la cromatina de espermatozoides de mamíferos: estudio de su mecanismo molecular y su posible utilidad como bioindicador del efecto de disruptores endócrinos

Sánchez, Melisa Celeste

2016-03-18

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

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

Cita tipo APA:
Sánchez, Melisa Celeste. (2016-03-18). La descondensación de la cromatina de espermatozoides de mamíferos: estudio de su mecanismo molecular y su posible utilidad como bioindicador del efecto de disruptores endócrinos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Sánchez, Melisa Celeste. "La descondensación de la cromatina de espermatozoides de mamíferos: estudio de su mecanismo molecular y su posible utilidad como bioindicador del efecto de disruptores endócrinos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-18.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

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

La descondensación de la cromatina de espermatozoides de mamíferos: estudio de su mecanismo molecular y su posible utilidad como bioindicador del efecto de disruptores endócrinos.

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

Melisa Celeste Sánchez

Director de tesis: Dr. Juan Carlos Calvo
Director asistente: Dra. Vanina Andrea Fontana
Consejero de estudios: Dra. Cecilia Varone.

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

Buenos Aires, marzo 2016.

A mis padres…

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a la **Universidad de Buenos Aires**, por formarme gratuitamente y ser mi casa de estudios. Al **IBYME**, por permitirme realizar mi doctorado en un agradable lugar de trabajo, prácticamente mi segunda casa; y a la **fundación Honorio Bigand**. Finalmente a **CONICET**, por las becas otorgadas.

Quiero expresar mi máximo agradecimiento a los jefes, **Juan Carlos** y **Lucre Calvo**. Fundadores de un laboratorio cuyas bases y valores son más fuertes que cualquier afirmación científica. Gracias por enseñarme que ninguna persona es mejor que otra, que practicar la ayuda al prójimo es fundamental porque todos remamos en el mismo bote y si no lo hacemos juntos, estamos solos. Gracias por permitirme crecer sin ningún tipo de egoísmos, indiscriminadamente y enseñarme a amar lo que hice durante estos años. Mucho más que padres científicos…me adoptaron, me escucharon y guiaron durante estos años de crecimiento. Como dice Julio Cortázar: "*las palabras no alcanzan cuando lo que hay que decir desborda el alma*".

Como consecuencia de semejantes cimientos construidos por JC y Lucre, conocí también a **Vani Fontana** en Exactas, quien me ayudó a dar los primeros pasos en este camino desconocido de la ciencia, quien con mucha paciencia y cariño me tendió la mano para que comenzara esta aventura. Gracias por abrirme las puertas hacia el conocimiento y a tu corazón cuando era apenas una niña. Algunos años después conocí en el IByME a **Marin** y **Vani Julianelli**, ambas tan experimentadas y tan dispuestas a ayudarme… se convirtieron en amigas, de esas que te escuchan día a día y nunca se aburren de compartir y dar siempre un buen consejo. Gracias por aceptarme, ayudarme y enseñarme que los compañeros de trabajo también pueden convertirse en grandes amigos. Marin gracias por sacarme "las papas del fuego" cada vez que lo necesité; siempre estando al pie del cañón, ya sea en el laboratorio o corrigiendo mis presentaciones, y esta tesis… ¡hasta altas horas de la madrugada!

Varios años más tarde…llegó **Camilita Galotto**, el solcito del laboratorio. Quien en muy poco tiempo conquistó mi corazón y me enseño que lo bueno solo puede atraer cosas buenas. Es la persona más servicial y caritativa que tuve el honor de conocer. "*El alma que* anda en amor*, ni cansa, ni se cansa, ni descansa*" dicen…esa es Camilita. ¡Te adoro!

Gracias al resto de la familia laboral que formaron Juan Carlos y Lucre, **Sabri**, **Paula**; **Yam** con sus carcajadas que siempre me parecerán graciosas y me sacaran una sonrisa, a **Maite** dulce y dedicada, la que sabe hacer todo lo que el resto no. Todas excelentes personas, siempre con ganas de dar lo mejor de sí mismas.

Durante los primeros años conocí a **Barbi**, tan pequeña y tan dulce. Se convirtió en una gran amiga. Nuestro lazo superó el contexto del instituto, generosa, amable y linda; por dentro y por fuera. ¡Gracias por ser parte de mi vida Bar!

No menos importantes son los jefes de mi querido pasillo, **Aleja Chasseing** e **Isabel Lüthy,** ellas le dan su cuota de personalidad y humanidad. Siempre enseñando y compartiendo pequeños momentos con los jóvenes e inexpertos becarios, como si nunca olvidaran que ellas también lo fueron. Siempre poniéndose a la altura del otro a pesar de su grandeza. ¡Gracias por ser una gran contención y hacer que nuestro pasillo sea especialmente lindo! No puedo dejar de agradecer tampoco a **Luciano Vellón**, quién a pesar de conocerlo hace muy poco tiempo, no dudó en ayudarme cuando lo necesité.

Este tan querido pasillo me dio también una de las cosas más lindas de la vida…mis AMIGOS. Es difícil expresar lo que siento por ellos, mezcla de raros y extremadamente humanos, son quienes hacen que ir al Instituto no sea un trabajo. **Leandro Martínez** o Leito…quien nunca perderá el niño que lleva en su interior, tal como le dijo el Zorro al Principito: "*Si realmente deseas un amigo, ¡domestícame! Serás para mí único en el mundo. Seré para ti único en el mundo*." Así era Leo antes, semejante a cien mil otros. Al hacerlo mi amigo, ahora es único en el mundo. Gracias por entenderme, mirar mi alma y ser mi compañero de infinitas charlas de existencialismo y metafísica, ¡te adoro! La dulce **Lupita** a quien recurriría una y mil veces para pedir un consejo, siempre teniendo la palabra justa, sin prejuicios ni segundas intenciones. Gracias por haber sido tan leal y sincera conmigo, y sobre todo por permitirme entrar a tu vida. **Eze**…poco a poco aprendí que lo tuyo son las acciones más que las palabras...para vos un simple "gracias", como me pediste. Gracias, gracias y gracias a mi amiga **Ari Bruzzone** por ser y estar**,** simple y práctica, de esas personas que irradian alegría y amor espontáneamente. Extraño tu risa alegrando al pasillo y nuestras charlas de espiritualidad y yoga, pero la distancia no es un problema cuando dos personas están conectadas, ¡adorarte es poco! Finalmente, le agradezco a **David,** un apasionado de su trabajo y generoso con quien sea se crucé en su camino, en quién podría confiar con los ojos cerrados. Gracias a todos por las incontables risas, carcajadas y secadas de lágrimas en las meriendas y almuerzos…no hubiese podido pedir mejores compañeros de pasillo.

Sorprendentemente, la aventura no terminaba allí, sino que en el resto del instituto también encontré increíbles personitas que se convirtieron en amigos. Gracias a las chicas Vázquez, **Maru Rosso**, **Lu Saucedo** y **Majito**…siempre dispuestas para la diversión y alguna charla pasillera que nos permita ponernos al día y distraernos de nuestros deberes. Cálidas y buenas, se convirtieron en otro pilar del grupo y de mis días de trabajo. ¡Gracias por sacarme siempre una sonrisa y el infaltable abrazo de todos los días! Dos pisos más arriba, las chicas Buffone: **Lis**, **Guille**, **Flor** y **Ani**… ¡gracias por ser mucho más que mis colegas reproductólogas! Cada una aportó su granito de arena cuando lo necesité, independientemente de lo ocupadas que estuvieran nunca faltaron las charlas de trabajo o personales. **Mariano Buffone:** gracias porque en tu laboratorio, siempre hubo un lugarcito y un tiempito para prestarme atención y ayudarme. **Flor** gracias por ser la motivadora de la mayoría de las reuniones del grupo, siempre divertida y proponiendo el crecimiento ante todo, ningún apodo podría ser mejor que "campanita" para vos. **Ani**, una amiga incondicional con un corazón gigante, de esas que se ponen el problema del otro al hombro sin pedir nada a cambio…miles de gracias.

A **Cristian A Sedó** y a **Felicitas**, a **Elisa Cebral**, a **Fabi Lo Nostro**, a **Gaby Chaufan**, a **Daniel Salamone** y **Naty Canel**; ya **Enrique Luque** y **equipo**, al grupo de **Patricio Morales** en Chile. A todos, gracias por querer colaborar con nosotros, hacer que esta tesis sea posible y sobre todo por compartir sus conocimientos conmigo. Cris gracias por demostrarme lo que es la dedicación al trabajo y además tener un corazón gigante, me despertaste más que admiración; nuestra relación superó los días compartidos en CEGyR. Fabi gracias por el empuje y la buena onda, siempre con la mejor energía y muchas ganas de ayudarme a pesar de estar repleta de obligaciones.

Gracias a **Cecilia Varone** por los momentos compartidos tanto en el QB 76 como afuera, por escucharme cada vez que lo necesité. A la entusiasta y sensible **Aye**, siempre preocupada por el prójimo, gracias por tus abrazos en el momento justo. A **Male**, divertida y generosa, gracias por los hermosos días que compartimos en Europa, donde nos conocimos más y aprendí a quererte. A la genia de mi amiga **July**, siempre escuchándome, entendiéndome y aportando su experiencia… ¿ya te dije que te quiero hasta el cielo y sos muy importante para mí? A **Fede Ibarbalz**, a quién también conocí en ese laboratorio entre experimento y experimento, junto conmigo la nueva adquisición. Con el correr de los días y los años te convertiste en un amigo,

de esos que dicen presente en las buenas y en las malas. Gracias. Te voy a extrañar en esta nueva etapa que comienza, pero me hace feliz que hayas encontrado tu camino.

A mis amigas de la facu: **Anita**, **Marisa**, **Paulita y Verito**. Las cuatro sumamente especiales para mí. Anita, inteligente y sensible a la vez, gracias por nuestras incontables salidas, desayunos y charlas. Marisa, comprensiva y pacífica, con un cierto sexto sentido que me hizo sentirla un poco mi cómplice todos estos años. Paulita o "éxotica", a quién nunca le alcanza el tiempo, y sin embargo, es incondicional, siempre presente cuando se la necesita. A **Verito**, a quien admiro muchísimo por seguir sus sueños y quien se hace sentir presente a pesar de la distancia. Son mis hermanas del alma, con quienes reí a carcajadas miles de veces, pero sobre todo, quienes lloraron a la par mía en los momentos difíciles. Eternamente agradecida, las elegiría de nuevo una y mil veces.

A mi leal amiga **Vani Lotorto**, nos conocimos siendo pequeñas y se convirtió en ese tipo de amigas que aunque no ves muy seguido, sabes que están preocupadas por vos y a quien podría recurrir en cualquier momento. Gracias porque no necesitamos explicar mucho para saber cómo estamos.

A los amigos de la vida: **Naty**, **Corne**, **Pelu** y **Nacho**, quienes me aceptaron sin dudarlo apenas nos conocimos. Estoy convencida que tuve que hacer ese viaje a Colombia para que formen parte de mi vida, para que sean la familia que se elige. Son quienes me enseñan día a día la diferencia entre lo urgente y lo importante, quienes son el ejemplo de perseguir los sueños que uno tiene. Hay una leyenda que dice que existe un hilo rojo directo al corazón, que conecta a las personas que están destinadas a encontrarse…creo que eso fue lo que pasó con nosotros, porque desde que nos conocimos somos inseparables. Gracias por ser incondicionales.

A mis hermanos y hermanas, ellos que sin entender mucho qué es lo que hago me apoyaron siempre. En especial a **Vero** con quién tengo una conexión que supera los lazos entre hermanas, quien me entiende y en quien me puedo apoyar. Un poco hermana y un poco mamá, quien me da motivos para seguir. Gracias por hacerme tía, por dejarme disfrutar de **Igna**, la luz de mis ojos y el motorcito que impulsa esta familia cada día. Gracias a **Andre**, quien a pesar de las diferencias soportó mi estrés durante todos estos años de carrera y de doctorado. Gracias. Los adoro familia.

A mi **papá** y mi **mamá**, con la gran necesidad de compartir este momento con ustedes y la tristeza de que no estén físicamente… con todo el amor que una persona puede sentir. Escribir gracias me parece vacío comparado con lo que les debo, y lo que me gustaría decirles personalmente. Mis pilares, ahora los ángeles que me guían y protegen desde el cielo, no tengo ninguna duda de que son responsables de todo lo que conseguí y en lo que me convertí. Gracias por apoyarme sin cuestionamientos, por creer ciegamente en mí y sobre todo…por hacerme sentir tan amada. Papá gracias por enseñarme lo que es la fortaleza y el valor del trabajo; mamá gracias por transmitirme tu sensibilidad y amor incondicional, compañera y protectora en todo sentido. Confío en que me están acompañando en este momento y lo seguirán haciendo. Gracias por nunca soltarme la mano desde donde sea que estén…LOS AMO.

"*A veces para siempre es solo un instante*"… gracias por llenar estos años de maravillosos pequeños instantes.

Mel.

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

Dermatan sulfate synergizes with heparin in murine sperm chromatin decondensation: a new role for an old friend? Sánchez M., Alvarez Sedo C., Julianelli V., Romanato M., Calvo L., Fontana V.A. and Calvo JC. **Systems Biology in Reproductive Medicine**. 59(2): 82-90, 2013.

También fueron comunicados en los siguientes congresos nacionales e internacionales:

1. *Noviembre 2015*

Capacidad espermática fecundante luego del consumo murino semi-crónico de alcohol. Sánchez M., Fontana, V., Sobarzo C., Calvo, JC., Cebral, E.
LX Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Investigación clínica (SAIC).
Resumen publicado en: MEDICINA – Vol. 73 – (Supl. III), pg. 99, 2015.

2. *13 – 16 de septiembre 2015.*

Toxic effects of endosulfan based insecticides on mammalian sperm: evaluation of in vitro chromatin decondensation and DNA fragmentation. Sánchez M. C., Alvarez Sedó C., Romanato M., Lo Nostro F., Calvo L, Calvo J. C., Fontana V.
51ST CONGRESS OF THE EUROPEAN SOCIETIES OF TOXICOLOGY, EUROTOX. *Porto, Portugal.*
Resumen publicado en TOXICOLOGY LETTERS 238(2):S107 · Septiembre 2015

3. *1-3 de diciembre 2014*

Efecto in vivo de disruptores endócrinos (endosulfán y etanol) sobre la descondensación de la cromatina de espermatozoides de roedores. Sánchez MC[1], Romanato M[1], Milesi M[4], Alarcón R[4], Cebral E[2], Lo Nostro F[3], Luque E[4], Fontana V[1, 5], and Calvo JC[1, 5].
XVI JORNADAS DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE BIOLOGÍA "IMPACTO ANTRÓPICO SOBRE LA FISIOLOGÍA DE LOS ORGANISMOS". Teatro municipal Brazzola, Chascomús, Argentina.
Modalidad: Poster. Resumen en prensa en la revista Biocell.

4. *20 -23 de noviembre 2013*

El endosulfán afecta la descondensación de la cromatina del núcleo espermático de ratón. Sánchez, Melisa C; Lo Nostro, Fabiana; Romanato, Marina; Julianelli, Vanina ; Calvo, Lucrecia ; Calvo, Juan Carlos ; Fontana, Vanina.
LVIII REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL Sociedad Argentina de Investigación Clínica. REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL 2013 Sociedad Argentina de Fisiología. XLV REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Hotel 13 de julio, Mar del Plata.
Modalidad: Poster. Resumen publicado en Medicina. MEDICINA – Vol. 73 – (Supl. III), 2013, pág. 99.

5. *12-14 de noviembre 2013*

El endosulfán afecta la descondensación de la cromatina del núcleo espermático de ratón. Sánchez MC, Lo Nostro F, Romanato M, Julianelli V, Calvo L, Calvo JC, Fontana V.
MAGNO CONGRESO INTERNACIONAL DE ENDOCRINOLOGÍA, DIABETES Y REPRODUCCIÓN (ALAD-SMNE-ALIRH). Cancún, México.
Modalidad: presentación oral.

6. *6-7 de junio 2013*

Dermatan sulfate synergizes with heparin in murine sperm chromatin decondensation: a new role for an old friend? Sánchez M., Alvarez Sedo C., Julianelli V., Romanato M., Calvo L., Fontana V.A. and Calvo JC.
JORNADAS DE ANDROLOGÍA. SALUD MASCULINA, UNA VISÍON INTEGRAL. AVANCES Y CASOS CLÍNICOS. Sanatorio Trinidad Mitre, Larrea 140. CABA. Buenos Aires, Argentina.

7. *19-21 de abril 2012*

Dermatan sulfate synergizes with heparin in murine sperm chromatin decondensation: a new role for an old friend? Sánchez M., Alvarez Sedo C., Julianelli V., Romanato M., Calvo L., Fontana V.A. and Calvo JC.
"VI CONGRESO ARGENTINO DE ANDROLOGÍA- SOCIEDAD ARGENTINA DE ANDROLOGÍA (SAA), V CONGRESO ASOCIACIÓN IBEROAMERICANA DE SOCIEDADES DE ANDROLOGÍA (ANDRO)". Hotel Sheraton Libertador. CABA

8. *16-19 noviembre del 2011*

Evidencia de sinergismo en la descondensación de la cromatina de espermatozoides murinos: efectos del dermatán sulfato y la heparina. Sánchez M, Fontana V, Romanato M, Julianelli V, Piñeiro De Calvo L, Calvo JC.
"REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA" (SAIC)
Hotel Intersur "13 de julio", Ciudad de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
Modalidad: oral. Resumen publicado MEDICINA – Vol. 71 – (Supl. III), 2011, pág. 124.

9. *12 -14 de octubre del 2011*

Evidencia de una condensación diferencial en la cromatina de espermatozoides murinos, usando dermatán sulfato como agente descondensante. Sánchez MC, Fontana VA, Romanato M, Julianelli V, Calvo LP, Calvo JC.
"XXII REUNION BIENAL DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE INVESTIGADORES EN REPRODUCCIÓN HUMANA" Hotel Continental, Ciudad de Panamá, Panamá.
Modalidad: oral.

10. *31 de agosto - 3 de septiembre del 2011*

Evidencia de una condensación diferencial en la cromatina de espermatozoides murinos, usando dermatán sulfato como agente descondensante. Sánchez MC, Fontana VA, Romanato M, Julianelli V, Calvo LP, Calvo JC.
"XXII REUNIÓN ANUAL SOCIEDAD CHILENA DE REPRODUCCION Y DESARROLLO" Hotel San Martín, Viña del mar, Chile.
Modalidad: póster.

11. *1- 3 de diciembre del 2010*

Diferencias en la descondensación de cromatina de espermatozoides murinos y humanos. Sánchez M, Romanato M, Julianelli V, Calvo JC y Fontana VA. Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA. Argentina.
"XII JORNADAS ANUALES DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE BIOLOGÍA".
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME). Vuelta de Obligado 2490. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.
Modalidad: oral. Resumen publicado en Biocell. BIOCELL. ISSN 0327-9545, 35(1), 2011: A85

RESUMEN

LA DESCONDENSACIÓN DE LA CROMATINA DE ESPERMATOZOIDES DE MAMÍFEROS: ESTUDIO DE SU MECANISMO MOLECULAR Y SU POSIBLE UTILIDAD COMO BIOINDICADOR DEL EFECTO DE DISRUPTORES ENDOCRINOS.

A diferencia de las células somáticas, el espermatozoide posee su cromatina empaquetada principalmente por protaminas en lugar de histonas. Las cisteínas presentes en las protaminas forman puentes disulfuro intra e intercatenarios, lo que le proporciona al núcleo espermático gran estabilidad y resistencia para poder atravesar el tracto masculino, el femenino y llegar con su ADN intacto hasta el sitio de fecundación. Luego que el espermatozoide penetra el oocito es imprescindible que se produzca la descondensación de su cromatina para que se reemplacen las protaminas espermáticas por histonas oocitarias. La descondensación de la cromatina involucra dos eventos: se deben reducir los puentes disulfuro (tiorreducción) y removerse las protaminas. Las moléculas involucradas en estos procesos serían el glutatión reducido (GSH) y el heparán sulfato (HS) oocitarios. Cuando este proceso de condensación de la cromatina, que ocurre durante la espermatogénesis para mantener la integridad del espermatozoide, se ve afectado por diversas causas, puede resultar en fallas de la descondensación que se evidencian una vez que el oocito es penetrado. Por otro lado, es sabido que la exposición a tóxicos ambientales puede provocar efectos deletéreos sobre la calidad de los espermatozoides y la fertilidad masculina. Las técnicas de reproducción asistida han podido resolver problemas de motilidad, defectos espermáticos, concentración de gametas muy reducida en el fluido seminal (oligozoospermia) pero todavía no pueden solucionar los defectos de la descondensación del núcleo espermático dentro del oocito. Esto pone en evidencia la importancia del proceso de descondensación, que no puede ser reemplazado por las técnicas de reproducción asistida, y permite pensar en utilizarlo como un posible indicador del efecto de disruptores endocrinos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Los objetivos de esta tesis fueron (1) avanzar en el estudio del mecanismo de la descondensación de la cromatina de espermatozoides, así como también en su (2) rol como posible bioindicador de efectos deletéreos causados por tóxicos ambientales o ingeridos, tales como el alcohol y el plaguicida endosulfán. En primer lugar, fue posible caracterizar el sistema de descondensación *in vitro* en el modelo de ratón al coincubar los espermatozoides con distintos glicosaminoglicanos y GSH, determinándose de esta manera las moléculas candidatas a ser posibles agentes descondensantes, las concentraciones y tiempos óptimos de incubación. Como consecuencia de esto, fue posible detectar un efecto sinérgico existente entre la heparina (utilizada como equivalente molecular del heparán sulfato) y el dermatán sulfato, los únicos glicosaminoglicanos estudiados con potencial capacidad descondensante. El efecto de estos dos glicosaminoglicanos también fue evaluado mediante la técnica de microscopia electrónica de transmisión, la cual puso en evidencia los cambios sufridos por los espermatozoides durante el proceso de descondensación. Una vez caracterizado el sistema, se logró evidenciar el aumento de la descondensación *in vitro* que ocurre cuando se incuban los espermatozoides con endosulfán o etanol, como también luego de la ingesta de etanol. Además, fue posible evaluar el efecto del plaguicida sobre la fragmentación del ADN, así como también si existe alguna correlación entre la misma y la descondensación de la cromatina. Los efectos del etanol observados *in vitro* fueron confirmados en experimentos *in vivo,* en los cuales se intoxicaron ratones macho para realizar experimentos de fecundación *in vitro*. Estos son los primeros resultados obtenidos descondensando *in vitro* en presencia de heparina y GSH, espermatozoides previamente incubados con endosulfán o etanol, que ponen de manifiesto que este ensayo podría utilizarse como centinela para evaluar posibles efectos de tóxicos ambientales o ingeridos.

Palabras claves: Descondensación de la cromatina espermática, heparán sulfato, heparina, dermatán sulfato, espermatozoide, endosulfán, etanol.

ABSTRACT

DECONDENSATION OF MAMMALIAN SPERM CHROMATIN: STUDY OF ITS MOLECULAR MECHANISM AND ITS POSSIBLE USE AS A BIOMARKER OF THE EFFECT OF ENDOCRINE DISRUPTORS.

In contrast to somatic cells, sperm has its DNA packed mainly by protamines rather than histones. The presence of cystein in protamines allows for the formation of intra and interchain disulfide bonds, giving great stability and resistance to the sperm nucleus, enabling it to travel through the male and female reproductive tracts and reach the site of fertilization with its DNA intact. An essential step, once the sperm enters the oocyte, is the decondensation of its chromatin by replacing sperm protamines by oocyte histones. Chromatin decondensation involves two events: disulfide bridges should be reduced (thio-reduction) and the protamines removed. The molecules involved in these processes *in vivo* would be reduced Glutathione (GSH) and heparan sulfate (HS) present in the oocyte. When this process of chromatin condensation, which occurs during spermatogenesis to maintain the integrity of sperm, is affected by various causes, decondensation failure may result following oocyte penetration at fertilization. It is also well known that exposure to a toxic environment can cause deletereous effects on sperm quality and male fertility. Assisted reproduction techniques have been successful in solving problems of motility, various sperm defects, very low concentration of gametes in seminal fluid (oligozoospermy) but still cannot solve the shortcomings of the decondensation of the sperm nucleus within the oocyte. This highlights the importance of the decondensation process, which cannot be replaced by assisted reproduction techniques and led us to think of its possible use as a bioindicator of the effect of endocrine disruptors, both *in vivo* and *in vitro*. The objectives of this thesis were (1) to advance in the study of the mechanism of sperm chromatin decondensation as well as (2) its role as a possible bioindicator of environmental toxicity caused by toxic agents, such as alcohol and the pesticide endosulfán. First, it was possible to characterize the process of decondensation *in vitro* in the mouse by incubating sperm with different glycosaminoglycans and GSH, which led us to identify molecules which could behave as putative decondensing agents, concentrations and optimal incubation times. Subsequently, it was possible to detect a synergistic effect between heparin (as a substitute for heparan sulfate) and dermatan sulfate, the only glycosaminoglycans studied with potential to decondense the sperm nucleus *in vitro*. The effect of these two glycosaminoglycans was also evaluated on sperm morphology and ultrastructure through transmission electron microscopy, which allowed us to visualize the changes suffered by sperm during the decondensation process. Once the system was characterized, we were able to demonstrate the increase in *in vitro* decondensation that occurs when sperm are incubated with endosulfán or ethanol, as well as after ethanol ingestion. In addition, it was possible to assess the effect of this pesticide on DNA fragmentation as well as its possible correlation to chromatin decondensation. The alcohol effects observed *in vitro* were confirmed with in *vivo* experiments in which male mice were intoxicated and their sperm subsequently used to perform *in vitro* fertilization. These are, to our knowledge, the first results obtained decondensing *in vitro* in the presence of heparin and GSH, sperm previously incubated with endosulfán or ethanol, suggesting that the sperm decondensation assay could be used as sentinel to evaluate possible effects of environmental or ingested toxic agents.

Key words: Sperm chromatin decondensation, heparan sulfate, heparin, dermatan sulfate, spermatozoa, endosulfan, ethanol.

INDICE

AGRADECIMIENTOS 3

RESUMEN 9

ABSTRACT 10

ABREVIATURAS 15

INTRODUCCIÓN 18

Espermatogénesis 19

La gameta masculina: el espermatozoide 24

El espermatozoide en el tracto reproductor femenino 32

Fecundación 38

Descondensación de la cromatina 39

Agentes tóxicos ambientales o ingeridos 50

Endosulfán 55

Etanol 60

HIPOTESIS Y OBJETIVOS 66

Hipótesis 67

Objetivo principal 67

Objetivos específicos 67

MATERIALES Y MÉTODOS 69

1. ANIMALES 70

2. RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES Y CAPACITACIÓN 70

3. PARÁMETROS EVALUADOS EN LA MUESTRA DE ESPERMATOZOIDES 71

3.1 Concentración 71

3.2 Motilidad 72

4. DESCONDENSACIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA 72

4.1 Descondensación en presencia de heparina y GSH 72

4.2 Evaluación del efecto de diferentes GAGs sobre la cromatina espermática 73

4.3 Evaluación del uso secuencial del agente reductor de puentes disulfuro (GSH) y del agente descondensante (GAG) en la descondensación de espermatozoides murinos capacitados 73

4.4 Cinética de la descondensación de la cromatina en presencia de heparina y GSH 74

4.5 Curvas dosis – respuesta de los glicosaminoglicanos heparina y dermatán sulfato 74

4.6 Análisis in silico de las protaminas murinas P1 y P2 y de los glicosaminoglicanos dermatán sulfato y heparina 75

4.7 Evaluación del efecto sinérgico entre heparina y dermatán sulfato en la descondensación nuclear espermática ... 75

4.8 Evaluación de la ultraestructura de espermatozoides mediante microscopía electrónica de transmisión. ... 76

5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ENDOSULFÁN ... 76

Evaluación del efecto in vitro del endosulfán en espermatozoides murinos ... 77

5.1 Evaluación del endosulfán sobre la motilidad ... 77

5.2 Curva dosis – respuesta de endosulfán sobre la descondensación in vitro ... 77

5.3 Evaluación de la fragmentación del ADN mediante la técnica de TUNEL ... 78

5.4 Evaluación del estado de tiorreducción de los espermatozoides ... 79

5.5 Evaluación del efecto in vitro del endosulfán sobre el estado redox de los espermatozoides. ... 80

Evaluación del efecto in vitro del endosulfán en espermatozoides humanos ... 82

5.6 Obtención de muestras de espermatozoides humanos ... 82

5.7 Procesamiento de las muestras de semen, obtención de fracción altamente mótil y capacitación espermática ... 82

5.8 Evaluación del efecto del endosulfán sobre la viabilidad y la motilidad espermática.. 83

5.9 Evaluación del efecto in vitro del endosulfán sobre la descondensación de la cromatina de espermatozoides humanos. ... 84

6. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CONSUMO DE ETANOL SOBRE ESPERMATOZOIDES MURINOS ... 84

6.1 Intoxicación de los ratones con etanol (in vivo) ... 84

6.2 Evaluación del efecto del etanol sobre la morfología de espermatozoides murinos.... 84

6.3 Evaluación del efecto del etanol sobre la motilidad y la hiperactivación de espermatozoides murinos. ... 85

6.4 Evaluación del efecto del etanol sobre la reacción acrosomal de espermatozoides murinos ... 85

6.5 Descondensación in vitro de espermatozoides provenientes de ratones intoxicados con etanol. ... 86

6.6 Fertilización in vitro (FIV) ... 86

6.7 Evaluación del efecto del etanol sobre el estado redox de los espermatozoides ... 88

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ... 88

RESULTADOS ... 89

Capítulo I: Estudio del proceso de descondensación de la cromatina en espermatozoides murinos ... 90

1. DESCONDENSACIÓN DE ESPERMATOZOIDES MURINOS ... 90

1.1 Descondensación estándar con heparina y GSH ... 90

1.2 Evaluación de la capacidad descondensante de diferentes GAGs sobre la cromatina de espermatozoides murinos 91

1.3 Evaluación del posible efecto cooperativo entre tiorreductor (GSH) y aceptor de protaminas (GAG) en la descondensación in vitro de espermatozoides murinos..... 92

1.4 Cinética de descondensación en presencia de heparina o dermatán sulfato, y GSH.... 93

1.5 Curvas dosis-respuesta de heparina y dermatán sulfato como agentes descondensantes in vitro de espermatozoides murinos 94

1.6 Efecto sinérgico entre heparina y dermatán sulfato sobre la descondensación in vitro de espermatozoides murinos..... 95

1.7 Análisis in silico de las características estructurales de las protaminas y los glicosaminoglicanos (heparina y dermatán sulfato) 97

1.8 Efecto de los agentes descondensantes sobre la integridad de la membrana plasmática y el núcleo del espermatozoide murino. 102

Capítulo II -Estudio del efecto de tóxicos sobre diversos parámetros de la funcionalidad espermática, con especial énfasis en la descondensación cromatínica. 105

2. ENDOSULFÁN 105

Efecto del endosulfán sobre los espermatozoides murinos 105

2.1 Efecto del endosulfán in vitro sobre la motilidad de espermatozoides murinos. 105

2.2 Efecto del endosulfán sobre la descondensación in vitro de espermatozoides murinos capacitados 106

2.3 Efecto in vitro del endosulfán sobre la fragmentación del ADN de espermatozoides murinos capacitados y descondensados en presencia de heparina y GSH. 107

2.4 Correlación entre la descondensación de la cromatina espermática y la fragmentación del ADN..... 111

2.5 Evaluación del estado redox de los grupos tiol de la cromatina espermática en presencia de endosulfán puro por marcación con monobromobimane. 112

2.6 Estrés oxidativo..... 114

Efecto del endosulfán sobre los espermatozoides humanos 115

2.7 Efecto in vitro del endosulfán de sobre la viabilidad y motilidad 116

2.8 Efecto del endosulfán sobre la descondensación in vitro de espermatozoides 116

3. ETANOL..... 117

3.1 Efecto del consumo de etanol sobre los parámetros seminales de espermatozoides murinos..... 117

3.2 Efecto del consumo de etanol sobre la descondensación in vitro de la cromatina de espermatozoides murinos 120

3.3 Efecto del consumo del etanol sobre la dinámica de la descondensación nuclear post-fertilización in vitro..... 121

3.4 Estrés oxidativo 124

DISCUSIÓN *126*

Descripción y estudio del proceso de descondensación en espermatozoides murinos..... *129*

Posible utilización del análisis de la descondensación de la cromatina espermática murina u otros parámetros de la fisiología espermática, como indicadores del efecto de tóxicos reproductivos ambientales o ingeridos. *136*

Endosulfán *138*

Etanol *141*

CONCLUSION *145*

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA *147*

ANEXO *172*

ABREVIATURAS

AC	*adenilato ciclasa*
ADN	*ácido desoxirribonucleico*
ADP/AMP	*adenosin difosfato/monofosfato*
AH	*ácido hialurónico*
AI	*endosulfán puro/ ingrediente activo*
AMPc	*adenosin monofosfato cíclico*
ARN	*ácido ribonucleico*
ATP	*adenosin trifosfato*
AX	*Axonema*
BSA	*albúmina sérica bovina*
BSO	*L-butionina-S, R- sulfoximina*
CAT	*cloranfenicol acetil transferasa*
CCO	*complejo cumulo oóforo*
CD	*cabeza descondensada*
CDNB	*Dinitrobenceno*
COP	*contaminante orgánico persistente*
CP	*cuerpo polar*
CpG	*citosina fosfato guanina*
CS	*condroitín sulfato*
DAG	*Diacilglicerol*
DMSO	*Dimetilsulfóxido*
Dpc	*días post apareo*
Dpp	*días post parto*
DC	*centríolo distal*
DS	*dermatán sulfato*
DTT	*1,4-ditiotreitol*
EDTA	*etilen-diamina-tetra-acético*
EP	*espacio perivitelino*
et al.	*y otros*
FIV	*fecundación in vitro*
FSH	*hormona folículo estimulante*
G	*espermatozoide groseramente descondensado*
GABA	*ácido γ-aminobutírico*
GAGs	*Glicosaminoglicanos*
GCS	*γ-glutamilcisteinasintetasa*
GR	*glutatión reductasa*
GSH-PX	*glutatión peroxidasa*
GSSG/GSSH	*glutatión oxidado*
GST	*glutatión S transferasa*
H	*heparina*
HA	*ácido hialurónico*

HIV	*virus inmunodeficiencia humano*
HPV	*virus papiloma humano*
HS	*heparán sulfato*
HTF	*fluído tubario humano*
IAM	*membrana acrosomal interna*
ICSI	*inyección intracitoplasmática de espermatozoide*
IP3	*inositol 1,4,5-trifosfato*
Kb	*kilo bases*
kDa	*kilo Dalton*
LH	*hormona luteinizante*
M	*espermatozoide moderadamente descondensado*
MAR	*sitios de anclaje a la matriz*
mBBr	*monobromobimane*
M	*mitocondria*
MDA	*malondialdehído*
MII	*metafase II*
MM	*materiales y métodos*
NA	*naranja de acridina*
NAD	*nicotinamida adenina dinucleótido*
NADP	*nicotinamida adenina dinucleótido fosfato*
NBT	*nitroazul de tetrazolio*
NIH	*Instituto Nacional de la Salud*
NOX5	*NADPH oxidasa*
OAM	*membrana acrosomal externa*
OMS	*Organización Mundial de la Salud*
P1	*protamina 1*
P2	*protamina 2*
PBS	*buffer fosfato salino*
PC	*centríolo proximal*
PGC	*célula madre primordial*
pH	*potencial de hidrogeniones*
PIP2	*fosfatidilinositol 4,5 bifosfato*
PKA	*proteín quinasa A*
PKC	*proteín quinasa C*
PLC	*fosfolipasa C*
PNf	*pronúcleo materno*
PNm	*pronúcleo paterno*
RA	*reacción acrosomal*
RL	*radicales libres*
ROS	*especies reactivas de oxigeno*
S	*espermatozoide sin cambios*
SDS	*dodecil sulfato de sodio*
SENASA	*Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria*

SH-	*sulfhidrilo libre*
SOD	*superóxido dimutasa*
S-S/SS	*puentes disulfuro*
SSC	*célula madre de espermatogonia*
TBARs	*ácido tiobarbitúrico*
TdT	*desoxinucleotidil transferasa terminal*
TP1 y TP2	*proteínas de transición 1 y 2*
Trx	*Tiorredoxinas*
UA	*unidades arbitrarias*
VG	*vesícula germinal*
ZP	*zona pelúcida*

*"**Wagner**: esto sube, centellea, se conglomera; en un momento estará hecho. Un gran proyecto siempre parece al principio obra de un demente, pero riámonos del azar, un cerebro que puede pensar bien, creará con el tiempo un pensador (Observando entusiasmado la redoma). Una suave fuerza hace que resuene el vidrio; se enturbia, se aclara, por lo tanto, tiene que surgir. Ya veo un hombrecito moviéndose graciosamente. ¿Qué más queremos?, ¿que más nos exige el mundo? El misterio ha sido develado y está a plena luz. Prestad oídos a este sonido, se va a convertir en voz, se va a hacer lenguaje."* Fragmento extraído de Fausto, obra de Johann Wolfgang von Goethe.

Goethe popularizó el término homúnculo al denominar *homunculus* al pequeño ser que creó el antiguo alumno de Fausto, Wagner, mediante operaciones quirúrgicas. El término homúnculo (del latín *homunculus*, ''hombrecillo'', a veces escrito *homonculus*) es el diminutivo del doble de un humano, el cual fue posteriormente usado en la discusión de la concepción y el nacimiento. En 1694, Nicolaas Hartsoeker descubrió "animaculi (animáculos)" en el esperma de humanos y otros animales. La escasa resolución de aquellos primeros microscopios hizo parecer que la cabeza del espermatozoide fuera un hombre completo en miniatura. A raíz de esto, se desataron las teorías que afirmaban que el esperma era de hecho un «hombre pequeño» (*homúnculo*) que se ponía dentro de una mujer para que creciese hasta ser un niño. Actualmente, gracias a los avances de la ciencia, se sabe que los dos modos de existir como hombre o como mujer se presentan como complementarios el uno del otro, y por lo tanto, en la reproducción sexual es necesaria la unión de las gametas de ambos sexos para generar un nuevo ser. La fecundación es un proceso complejo que consta de distintas etapas, cada una de las cuales debe suceder de manera precisa para que la formación del embrión sea exitosa. Estudiar con detalle cada etapa, así como también los diversos factores que pueden afectarla, es de crucial importancia para aportar conocimiento y soluciones a esta intrincada cascada de eventos que culminarán nada menos que con la formación de un nuevo individuo.

Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso por medio del cual las células germinales diploides del macho, sufren una reducción cromosómica hasta desarrollarse como gametas haploides. Para que este proceso ocurra en mamíferos, es necesario a partir de un "*pool*" de células madre, un período de amplificación del número de células (mitosis), un período de reducción cromosómica (meiosis) y un período de transformación morfológica de las células haploides en espermatozoides (espermiogénesis) (Griswold 2016). Durante la implantación temprana del embrión, la línea germinal en mamíferos es guardada como reservorio aparte de las células somáticas (Urimoto & Aitou 2015). En el ratón, las células germinales primordiales (PGCs, del inglés "primordial germ cells") migran a los pliegues genitales alrededor del día 11 post *coitum* (dpc) y se

mueven hacia los testículos entre 12,5 y 13,5 dpc (Figura 1). En las gónadas, las PGCs mantienen la mitosis hasta que entran al ciclo celular G0/G1 el día 14,4 dpc. Desde el día 11,5 hasta el 13,5 dpc, las PGCs sufren la desmetilación completa de su genoma. Luego de esto, se re-establece la metilación entre los días 14,5 dpc hasta 2 días post parto (dpp), momento en el cual las pro-espermatogonias sufren arresto mitótico. Luego del nacimiento, las proespermatogonias se convertirán en células madre espermatogonia (SSCs, del inglés spermatogonial stem cells). Una proporción de SSCs se diferenciará en espermatogonia e iniciará la primera ronda de meiosis y espermiogénesis (Aravin & Bourc 2008; Luo et al. 2015). Durante estas primeras etapas de desarrollo embrionario, los defectos en la regulación genética conducen a una variedad de deficiencias en la constitución de la línea germinal, afectando la embriogénesis, la descendencia y la herencia de anormalidades epigenéticas (Heard 2012).

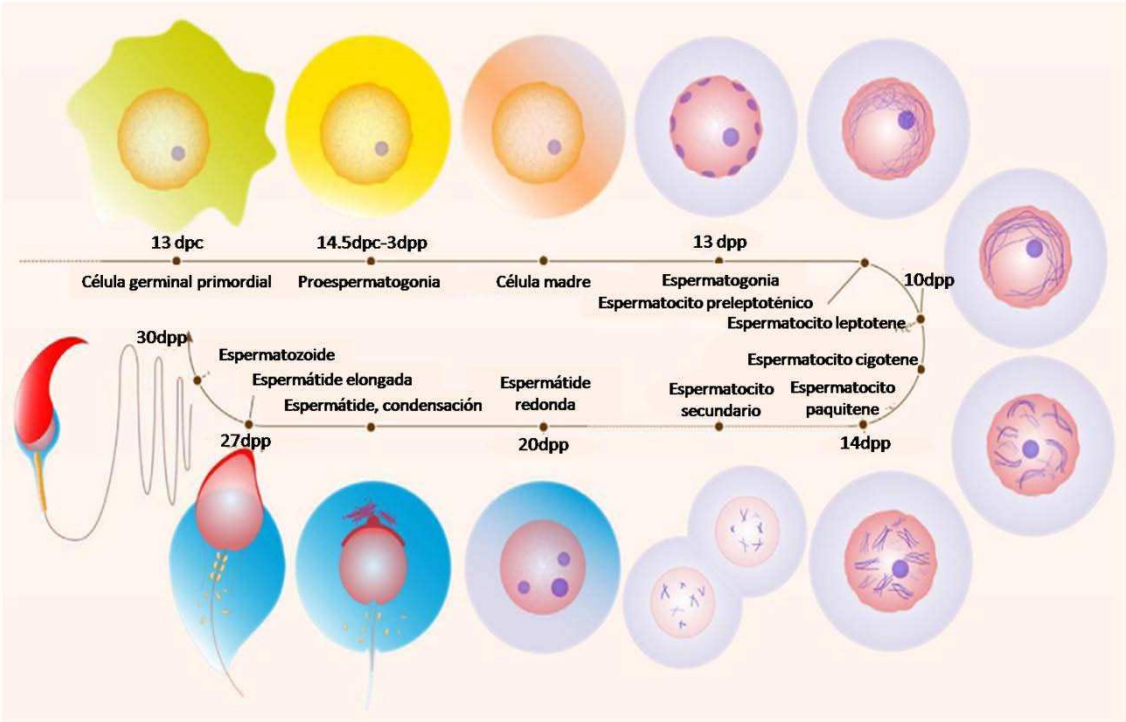


***Figura 1. Esquema de la espermatogénesis en el ratón**. Alrededor de los 13 días después del apareo (dpc) las células primordiales germinales (PGCs) de ratón migran hacia el testículo. Allí, sufrirán mitosis hasta los 14,5 días, momento en que se producirá el arresto de la mitosis. Luego de los 3 días posteriores al parto (dpp), se forman las células madre espermatogonias (SSCs). Algunas de estas se desarrollan en espermatogonias y pasan a la meiosis. Las espermátidas redondas se generan alrededor de los 20 dpp y comienza la espermiogénesis. Durante la espermiogénesis, el núcleo de las espermátidas se condensa junto con la formación del acrosoma y el flagelo. Finalmente, luego de que la mayoría del material del citoplasma es eliminado, las espermátidas se desarrollan a espermatozoides. Modificado de (Luo et al. 2015).*

En el testículo y alcanzada la pubertad, algunas células madre continúan multiplicándose mitóticamente, mientras que otras se diferencian a espermatocitos primarios para luego sufrir meiosis y convertirse en espermatocitos secundarios. Por

cada espermatocito secundario que entra a meiosis II se obtienen dos espermátides, que madurarán hasta formar espermatozoides (Figura 2). Durante estas divisiones, ocurren dos eventos clave que tienen importantes consecuencias genéticas: uno es el intercambio recíproco de ADN entre cromosomas homólogos, y el otro es la segregación de cromosomas, lo que produce la diversidad genética necesaria para la supervivencia de las especies (Chan et al. 2004).

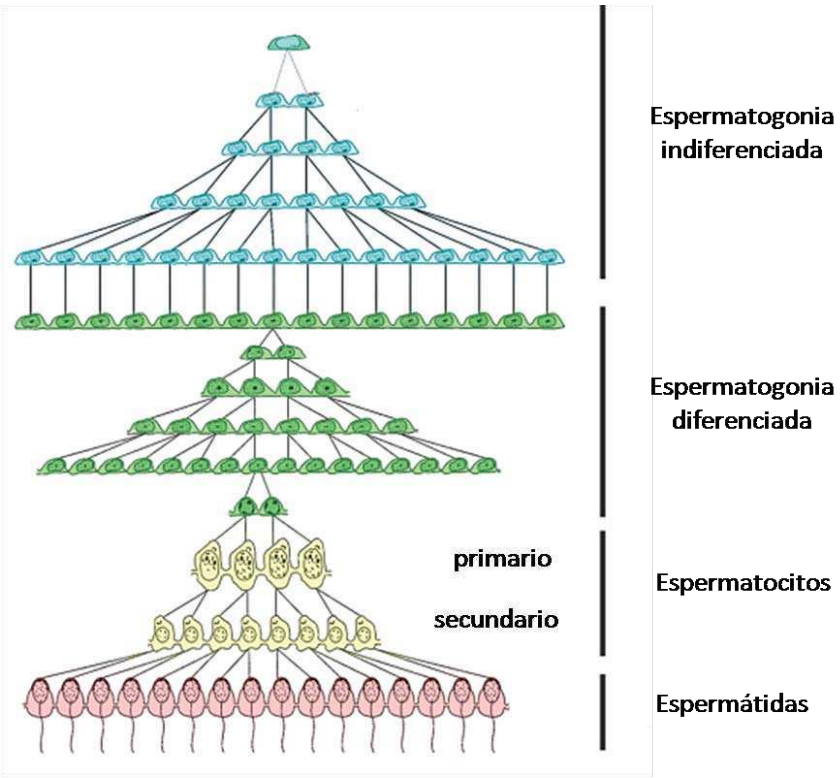


Figura 2. Proceso de diferenciación espermatogénica en el testículo de ratón. *Las células germinales dan lugar a células madre de las espermatogonias, a partir de las cuales surgen las células que se diferenciarán a espermatocitos primarios tras su mitosis. Las espermatogonias, entonces, a través de repetidos ciclos de mitosis producen nuevas espermatogonias y mantienen así la reserva celular. Otro pool de espermatogonias se divide por mitosis produciendo más células de su tipo; y cada una de estas se convertirá en espermatocitos primarios que se dividirán meioticamente para dar espermatocitos secundarios y, eventualmente, espermatozoides. Modificado de (Yoshida 2008).*

La espermiogénesis es un proceso realmente destacado en el que se producen cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que se inicia con una célula simple (espermátida) y culmina con la formación de un espermatozoide altamente diferenciado (Figura 3). Durante este proceso, la espermátida desarrolla el citoesqueleto básico del espermatozoide, la cromatina del núcleo se condensa, las cisternas del aparato de Golgi se fusionan para formar el acrosoma que migra al núcleo repartiéndose por la superficie nuclear formando el sistema acrosomal y los dos centríolos migran en dirección opuesta al acrosoma en formación. Uno se alinea radialmente formando el axonema en la futura cola y el otro se localiza en ángulo recto y forma la pieza conectora que une la cola al núcleo. El axonema de la cola se

alarga y las mitocondrias se dividen. La síntesis de ARN y proteínas es máxima durante la meiosis y disminuye abruptamente hasta niveles indetectables durante la espermiogénesis (Bustos Obregon et al. 1975).

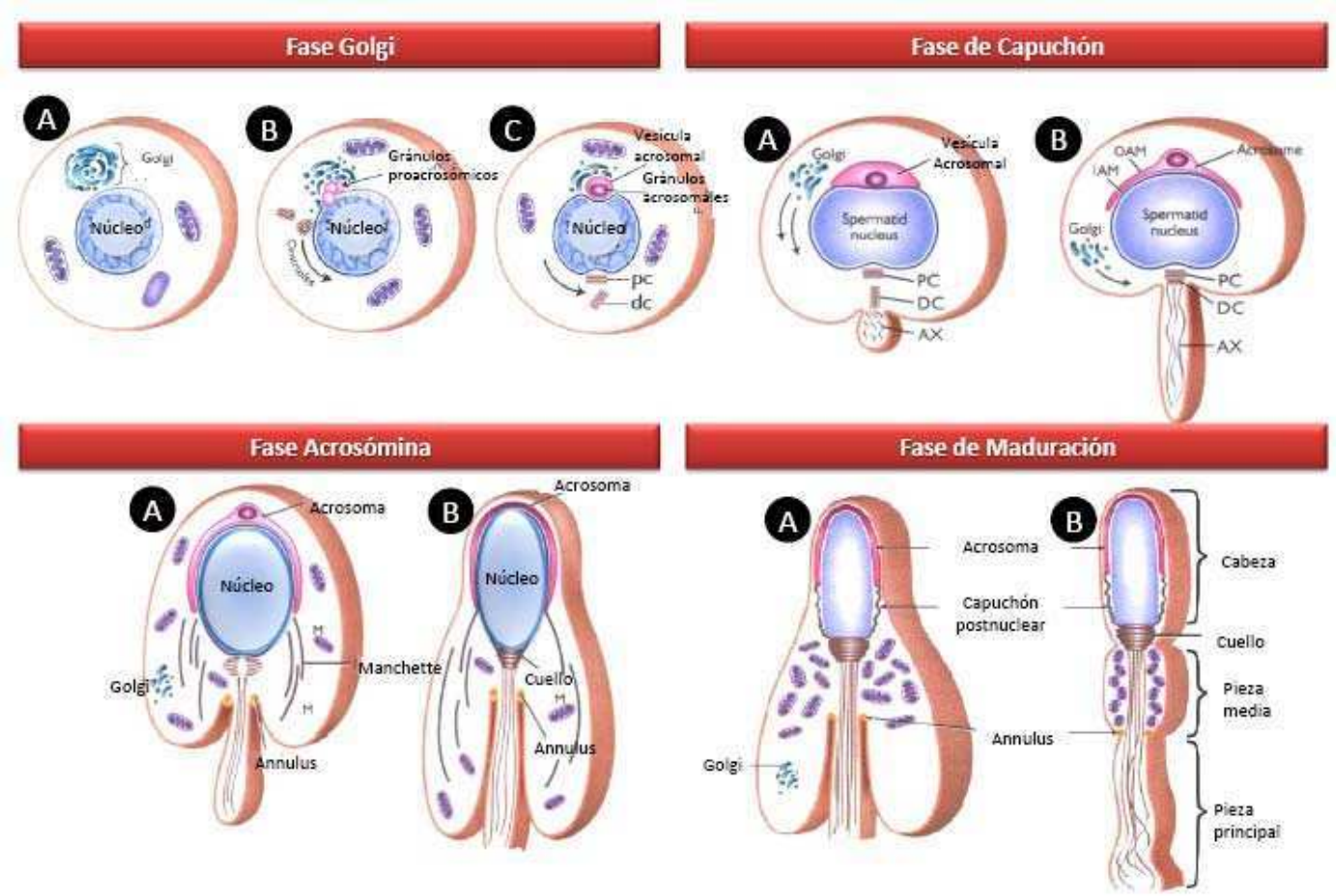


Figura 3. Espermiogénesis. Fase de Golgi, A: *espermátida redonda con aparato de Golgi.* ***B:*** *pequeñas vesículas provenientes del aparato de Golgi se fusionan para formar los gránulos proacrosómicos. Los centriolos comienzan a migrar en dirección opuesta al Golgi.* ***C:*** *las vesículas se fusionan dando origen a la vesícula acrosómica (contiene gránulos acrosomales). El centriolo proximal (PC) migra hacia la región caudal. El centriolo distal (DC), migra hacia el axonema en desarrollo.* ***Fase de Capuchón, A:*** *el Golgi migra hacia la zona apical y el DC forma el axonema (AX).* ***B:*** *la vesícula acrosomal comienza a formar el capuchón característico, delimitado por las membranas acrosomales externa (OAM) e interna (IAM).* ***Fase Acrosómica, A:*** *el núcleo comienza a elongarse y el acrosoma cubre la zona anterior del mismo. Se forma la "Manchette" y se extiende hacia el flagelo en formación.* ***B:*** *se forman el cuello y el annulus. Estos formarán parte de la unión entre la pieza media y la pieza principal del flagelo (M= Mitocondria).* ***Fase de Maduración, A y B:*** *las mitocondrias se ordenan en forma de espiral alrededor del flagelo, determinando la pieza media (Tomado de internet).*

Hacia el final del proceso de diferenciación, los espermatozoides salen del testículo y migran hacia el epidídimo (Figura 4). Este último viaje no sólo es responsable de mantener la viabilidad de los espermatozoides, sino que también adquieren capacidad fecundante potencial y cierta motilidad, pero sin embargo, no son capaces aún de fecundar al oocito. Una vez en el *cauda* epididimario, el reservorio de

espermatozoides, pueden mantener su capacidad fecundante potencial por varias semanas antes de su eyaculación. En el momento de la eyaculación, la vesícula seminal se contrae y los espermatozoides son eyectados por el canal eyaculador hacia la uretra y luego hacia la parte exterior del pene.

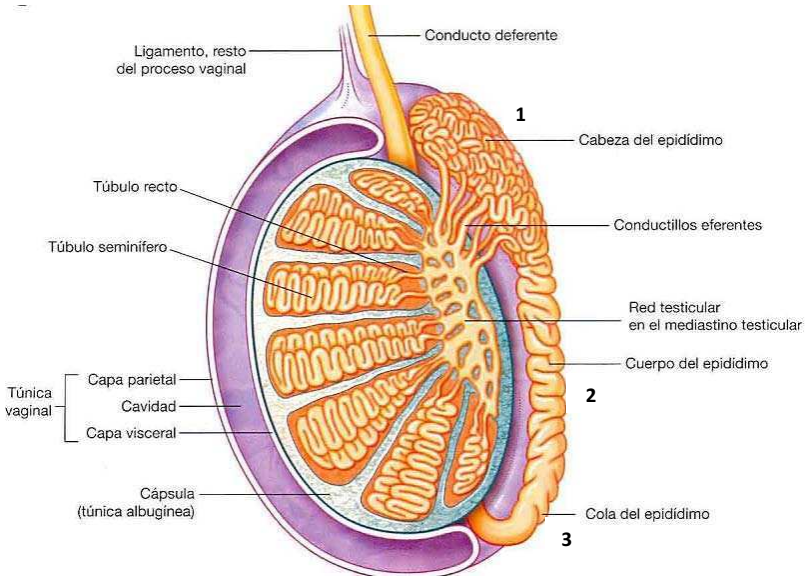


Figura 4. Esquema del testículo y epidídimo en donde se muestra la anatomía de los túbulos. 1: *desde la rete testis varios ductos eferentes delgados permiten el pasaje de los espermatozoides desde el testículo hacia la región del caput (Cabeza del espidídimo).* ***2:*** *el diámetro de los túbulos se amplía en la región del corpus (cuerpo del epididímo) mientras se produce una disminución del grosor del epitelio.* ***3:*** *el túbulo en el cauda (cola del espidídimo) y en el vas deferens es menos intrincado que en el caput y el diámetro del túbulo es mucho más amplio para permitir el almacenamiento de los espermatozoides.*

En la espermatogénesis participan otros tipos celulares que no pertenecen a la línea germinal y que se localizan dentro de los túbulos seminíferos tapizando su epitelio (Figura 5). Estas son las células de Sertoli, Leydig y células mioides. En el espacio intersticial, las células de Leydig producen hormonas esteroideas, expresan receptores para factores de crecimiento y secretan testosterona que regula la espermatogénesis (Kornbluth and Fissore 2015) y desarrolla y mantiene las características sexuales secundarias de todo el cuerpo. Además, las células de Leydig regulan la barrera hemato-testicular permitiendo el acceso de los productos de estas células y de factores circulantes que modulan el ciclo de la espermatogénesis (Bittman 2015). Las células de Sertoli forman uniones estrechas entre sí, dan sostén a las células germinales a lo largo de toda su etapa de desarrollo y contactan con todos los demás tipos celulares. Las espermatogonias reposan entre las células de Sertoli y la membrana basal, mientras que otras células (espermatocitos, espermátidas, etc.) se sitúan entre las células de Sertoli o están embebidas en su citoplasma. Se forman así dos compartimientos en los túbulos seminíferos, un compartimiento basal que permite acceder a sustancias que se encuentran en circulación y en donde se encuentran las espermatogonias, y un compartimiento adluminal por encima de las uniones

intercelulares (barrera hemato-testicular) en donde se encuentran las células en diferentes estadios de la espermatogénesis (Figura 5)(Barratt, 1995).También se sabe que muchos factores que regulan la función del testículo, funcionan a través de las células de Sertoli, y las fallas de alguno de los receptores, de andrógenos, estrógenos o FSH, demostraron que estas células son esenciales para la espermatogénesis (Johnson et al. 2008)**.** Cuando finaliza la espermiogénesis, las extensiones citoplasmáticas de la célula de Sertoli se rompen y se libera el espermatozoide.

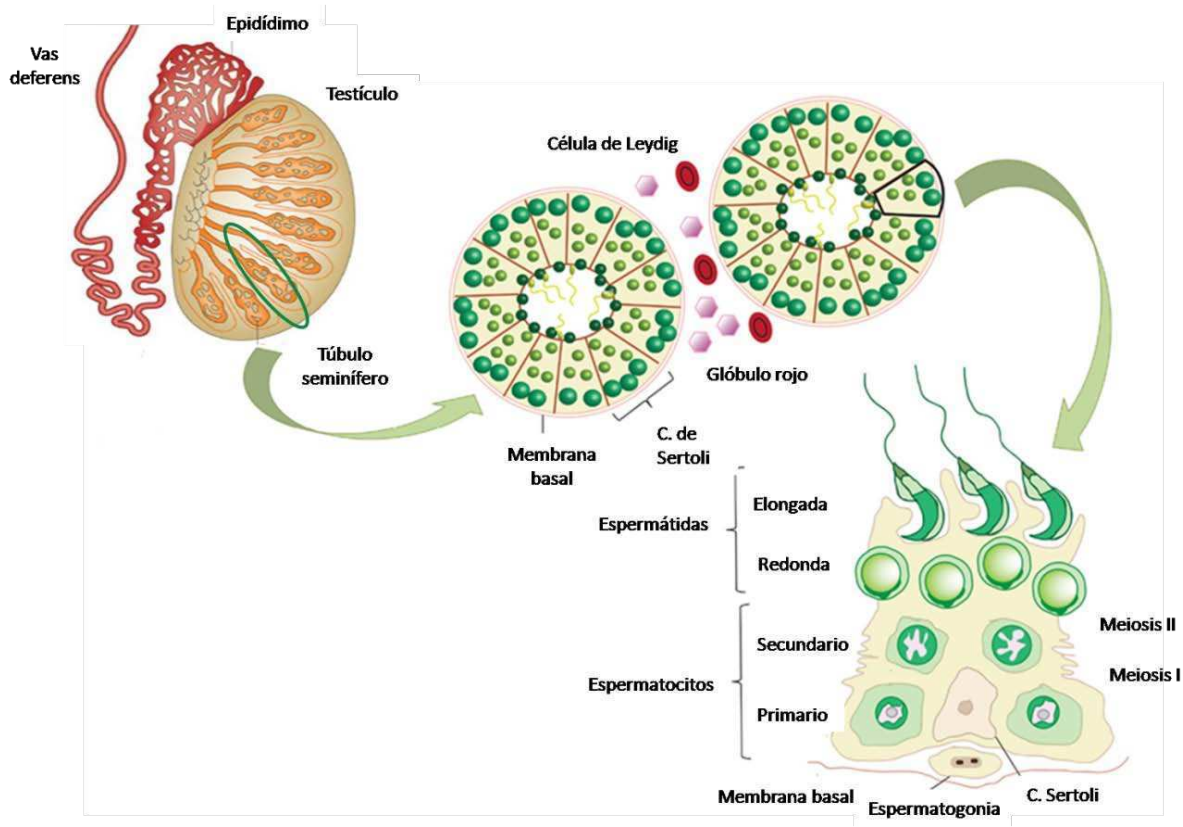


Figura 5. Diagrama del epitelio seminífero. *La imagen ilustra cómo el epitelio es dividido en un compartimiento adluminal y otro basal por medio de las uniones estrechas entre las células de Sertoli, la barrera hemato-testicular y la línea germinal. A la derecha de la figura se puede observar la transición desde la célula germinal hasta el espermatozoide, con las sucesivas etapas de división celular. El compartimento basal es ocupado por las espermatogonias que contienen células madre y su progenie diferenciada. Luego, las células germinales se traslocan a través de las uniones estrechas al compartimento adluminal cuando comienzan la meiosis. Las espermátidas redondas y elongadas son empujadas hacia el lumen, lo cual resulta en una organización meticulosa del epitelio seminífero. Los espermatozoides maduros son liberados al lumen y son eyaculados fuera del cuerpo a través de la rete testis, epidídimo y vas deferens.*

La gameta masculina: el espermatozoide

La creación de un nuevo individuo diploide requiere de la contribución de ambos pronúcleos haploides, materno y paterno. El éxito de este proceso depende de una serie de eventos secundarios tales como que el espermatozoide conserve su ADN, lo

pueda transportar hacia el sitio de fecundación y sea capaz de reconocer al oocito. Para que el espermatozoide pueda cumplir todas estas funciones, debe desarrollar una morfología especializada con todos sus componentes estructurales hechos a medida de los distintos aspectos específicos relacionados con su función. El espermatozoide se divide en dos regiones principales: la cola, que incluye el flagelo responsable de la motilidad y la pieza media responsable de la producción de energía,y la cabeza, que contiene al ADN y las estructuras y moléculas necesarias para el reconocimiento del oocito y la fusión con dicha gameta (Figura 6), (Curry y Watson, 1995).

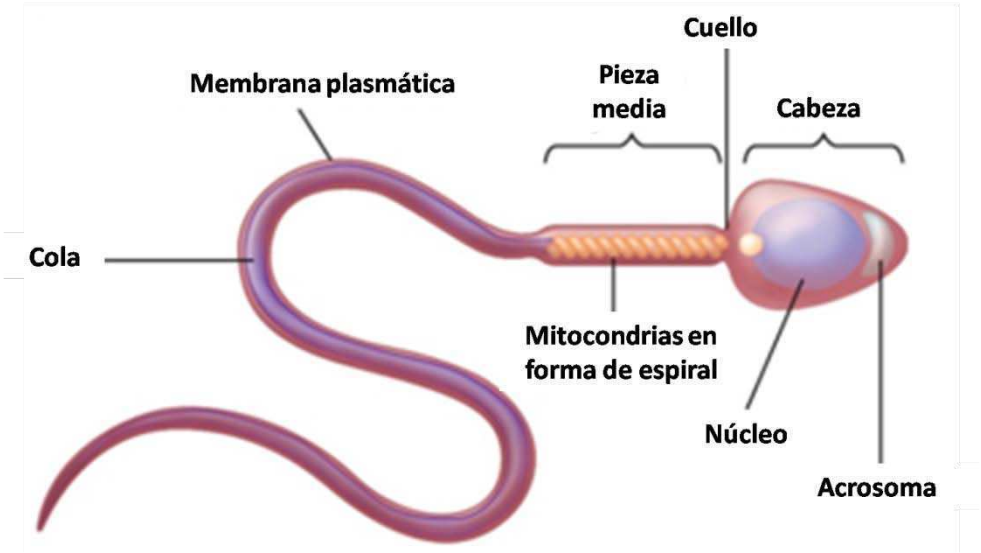


Figura 6. Esquema de un espermatozoide de mamífero. *Las estructuras principales que componen el espermatozoide son: el flagelo responsable de la motilidad y la cabeza reservorio del ADN paterno.*

La motilidad activa, proporcionada por el flagelo, es necesaria para atravesar el mucus cervical, cruzar la unión útero-tubaria y penetrar las capas del oocito. El flagelo puede ser dividido en cuatro regiones principales: pieza conectora, pieza media, pieza principal y pieza final (Figura 7). En el centro del flagelo se extiende el axonema, una superestructura altamente conservada que constituye el aparato motor de la cola del espermatozoide. Consiste en nueve pares de microtúbulos que rodean un par central, el clásico patrón de 9 + 2. Cada uno de los nueve pares consiste en una subunidad A que forma un microtúbulo completo y una subunidad B, el cual es un microtúbulo incompleto. Estos pares de microtúbulos tienen miles de motores de dineína unidos que "caminan" sobre los mismos energizados por la hidrólisis de ATP, provocando la curvatura del flagelo (D. T. N. Chen et al. 2015). Además, los nueve pares de microtúbulos están unidos entre sí por una proteína llamada nexina.

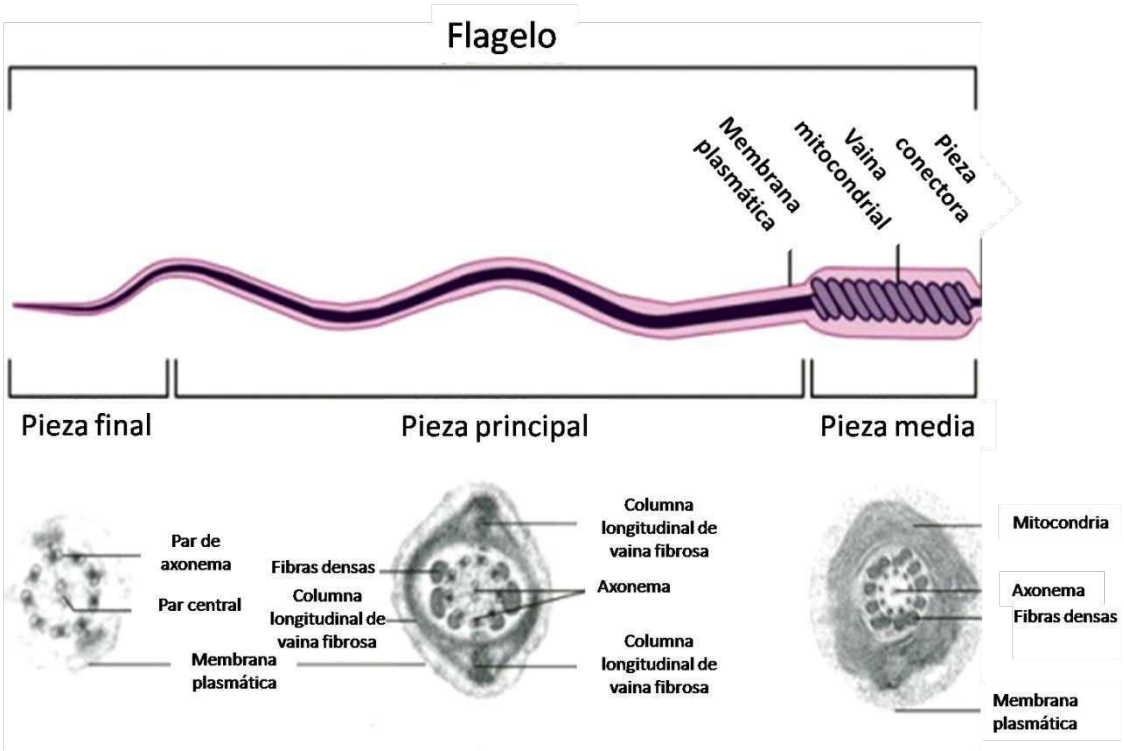


***Figura 7. Flagelo espermático**. Arriba: esquema donde se representa la pieza conectora, pieza media, pieza principal y pieza terminal. Abajo: imágenes de microscopia electrónica de los cortes transversales de sus diferentes secciones.*

La pieza media, es un pequeño segmento conector entre el flagelo y la cabeza del espermatozoide. Su mayor componente es el *capitulum*, una estructura fibrosa con forma de cúpula y columnas segmentadas, donde se posiciona el centriolo proximal en ángulo recto al eje del flagelo. Rodeando al axonema, desde la región de la pieza conectora hasta el final de la pieza principal, se encuentran nueve fibras densas conteniendo proteínas similares a la queratina. La estabilización de estas fibras por un gran número de puentes disulfuro entre sus componentes, sugiere que dichas estructuras estarían involucradas en otorgar al espermatozoide la elasticidad y flexibilidad necesarias para el batido de la cola. Además de las fibras densas, en la pieza media se encuentra la vaina mitocondrial, estructura compuesta por mitocondrias organizadas extremo con extremo que envuelven a la cola en forma helicoidal y cumplirían un papel en la provisión de energía para el espermatozoide. En la pieza principal, reemplazando a la vaina mitocondrial, se encuentra la vaina fibrosa, conformada por dos columnas longitudinales asociadas entre sí por columnas transversales. El alto grado de compactación y la orientación de las fibras en la vaina fibrosa serían importantes para regular el plano de batido de la cola del espermatozoide. Finalmente, la pieza final o terminal está formada por el axonema como único componente estructural.

La cabeza del espermatozoide contiene un rango limitado de estructuras entre las que se encuentran el núcleo, que ocupa la mayor parte de la cabeza, el acrosoma y la

región post-acrosomal (Figura 8). El reconocimiento espermatozoide-oocito es primordialmente función de la membrana plasmática de la cabeza. La organización básica de la cabeza espermática es común a todos los espermatozoides de mamíferos, pero el tamaño y forma, tanto del núcleo como del acrosoma y de la cabeza en sí misma, es extremadamente variable entre especies. La evolución en tamaño y forma de la gameta masculina fue conducida por dos fuerzas selectivas principales: la competencia espermática y la biología reproductiva de la hembra (Sanchez et al. 2013). Mientras que para el espermatozoide humano la forma es ovalada o espatulada, para el espermatozoide de ratón es falciforme (con forma de hoz).

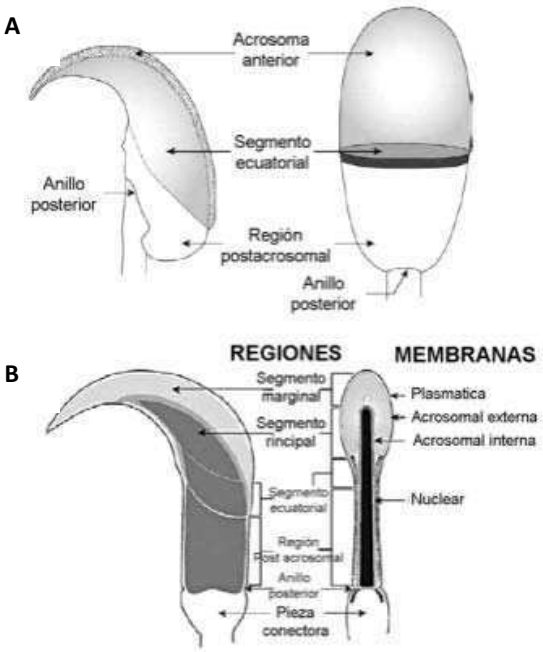


Figura 8. Cabeza del espermatozoide. A: *se muestran las estructuras generales de la cabeza de un espermatozoide falciforme (izquierda) y otro con forma espatulada (derecha).* ***B:*** *se muestran las regiones y las membranas de un espermatozoide falciforme.*

El acrosoma comienza a formarse durante las primeras etapas de la espermiogénesis. Durante esta fase, el flagelo se elonga desde un polo de la célula definiendo la polaridad de la misma. El acrosoma se forma a partir de gránulos del aparato de Golgi y comienza a ubicarse por encima del núcleo. Se cree que las vesículas membranosas, cuyos productos parecen ser procesados a través del aparato del Golgi y repartidos en forma de vesículas, se fusionan unas con otras para formar una sola vesícula que se asocia íntimamente con la envoltura nuclear. A medida que la espermiogénesis continúa, las membranas forman un “capuchón” mientras que su contenido acrosomal se acumula, al mismo tiempo que ocurre la condensación nuclear (D. R. Tulsiani et al. 1998). El acrosoma en animales euterios consiste en dos compartimientos, un gran segmento anterior donde se encuentra la matriz que contiene las enzimas y un

segmento posterior más pequeño y delgado llamado segmento ecuatorial (Fléchon 2015). La matriz del acrosoma contiene diferentes enzimas hidrolíticas, entre las cuales la hialuronidasa y la acrosina son las mayoritarias. La membrana nuclear que limita con la membrana plasmática recibe el nombre de membrana acrosomal externa mientras que la membrana que se sitúa sobre la envoltura nuclear se denomina membrana acrosomal interna (Figura 9). Directamente por debajo del acrosoma y separándolo del núcleo hay una fina capa de material citoplasmático estabilizado por puentes disulfuro que forma la teca perinuclear. La función de la misma es unir el acrosoma al núcleo y se cree que también está involucrada en la activación del oocito una vez que ocurre la fecundación (Oko & Sutovsky 2009).

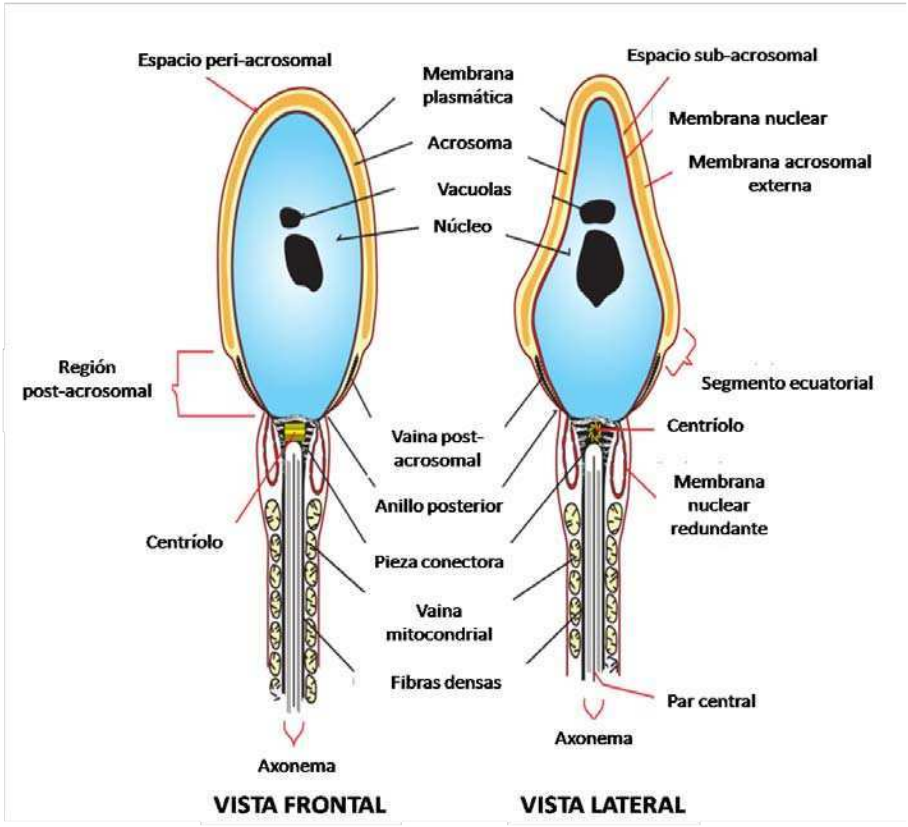


***Figura 9. Detalle de la cabeza de un espermatozoide**. En el esquema se observa: acrosoma, núcleo, segmento ecuatorial, región post acrosomal y cuello, y las membranas acrosomal externa e interna, nuclear y plasmática. (Tomado y modificado de https:// commons. wikimedia. org/ wiki/ File: Complete_diagram_of_a_human_spermatozoa_en.svg)*

El núcleo contiene el ADN que será depositado en el ooplasma luego de la fecundación. La forma del núcleo es específica de cada especie, determinada por el genotipo del espermatozoide, y, en la mayoría de las especies, muestra un alto grado de uniformidad. La membrana nuclear carece por completo de poros nucleares, lo que refleja probablemente la naturaleza inerte del núcleo espermático, junto con una cromatina altamente condensada y ausencia de cualquier capacidad de síntesis

(Bedford & Hoskins 1990). El ADN de los espermatozoides de mamíferos se encuentra empaquetado de manera más compacta, estando al menos seis veces más condensado que el ADN en cromosomas mitóticos, lo que le permite ocupar un pequeño volumen (Ward & Coffey 1991). El anillo posterior se forma por unión circunferencial entre la membrana plasmática y la membrana nuclear y, al igual que el *annulus* del flagelo, es una barrera física entre los dominios de membrana y representa el mayor punto de separación entre el flagelo y la cabeza (Curry y Watson 1995). La estructura de la cromatina es muy distinta de la que se encuentra en las células somáticas, requiere de una compactación extrema del genoma paterno para asegurar su protección contra el impacto ambiental durante su transporte hasta el sitio de fecundación. Se sabe que la condensación nuclear tiene lugar en forma de gradiente desde la zona apical hacia la zona caudal de la cabeza del espermatozoide (De Vries et al. 2012). La cromatina de espermatozoides de mamíferos consiste en ADN asociado a protaminas unidas por puentes disulfuro inter e intra catenarios. El primer paso de esta transición consiste en el reemplazo de las histonas del espermatozoide por proteínas básicas ricas en lisina llamadas proteínas de transición TP1 y TP2. En muchos mamíferos distintos, TP1 es una proteína pequeña de 54 aminoácidos con una distribución uniforme de aminoácidos básicos, con capacidad de desestabilizar la doble hélice del ADN. Por otro lado, TP2 actúa mejor estabilizando y condensando al ADN. TP2 es una proteína de 115 aminoácidos que tiene distintos dominios estructurales con muchos residuos básicos hacia el carboxilo terminal, mientras que hacia el extremo amino terminal contiene motivos con dedos de zinc. Experimentos previos demostraron que TP2 aparece temprano en la espermátida y se une preferencialmente a secuencias CpG asociadas a dominios promotores de los genes, mediante su actividad dependiente de zinc que le da mayor afinidad por estas regiones (Lévesque et al. 1998). Además, dado que las islas CpG están presentes en estas regiones, se cree que la unión de TP2 tendría como consecuencia la represión de la actividad transcripcional, un evento que coincide con la aparición de las proteínas de transición (Kundu et al. 1996). En cambio, TP1 que aparece un día después, parece estimular la reparación de las rupturas simple cadena del ADN, sugiriendo que podría actuar uniéndose a las rupturas que ocurren durante la remoción de las histonas hasta que sean reparadas. Luego de la remoción de las histonas y la reparación del ADN, se depositan las protaminas en la cromatina de las espermátidas elongadas para completar la compactación de la misma y, asegurar de esta manera que el genoma permanezca inactivo hasta que el oocito sea activado luego de recibir el material genético paterno (Brewer et al. 2002). En espermatozoides de ratón, menos del cinco por ciento del genoma permanece asociado a histonas, mientras que en humanos esta fracción varía entre diez y quince por ciento (Mirella L. Meyer-Ficca 2013). Estas histonas parecen estar distribuidas a lo largo del genoma, principalmente en regiones de genes promotores (Arpanahi et al. 2009). Además, en espermatozoides humanos se descubrió que familias enteras de genes importantes para el desarrollo temprano están asociados a histonas (Hammoud et al. 2009),

sugiriendo que las histonas son necesarias, tanto para la reorganización de la cromatina y formación del pronúcleo paterno, como para el desarrollo del embrión (Ward 2010). Las protaminas que se unen al resto del ADN, contienen una serie de dominios ricos en arginina que se unen al esqueleto fosfodiéster del ADN de un modo independiente de la secuencia de bases, neutralizando así sus cargas negativas. Cada molécula de protamina se une a cada par de bases del ADN en el surco menor de la doble hebra, y las argininas adyacentes a los dominios de anclaje conectan ambas hélices del ADN (Brewer et al. 1999). La remodelación de la cromatina entonces, tiene como fin la formación de un toroide de 50 kb aproximadamente, en forma de "doughnut" (dona) con el bucle de cromatina superenrollada que se mantiene en su lugar por enlaces disulfuro formados por la oxidación de grupos sulfhidrilo presentes en las protaminas (Calvin & Bedford 1971; D 'occhio et al. 2007). Estudios previos sugieren que el agregado de zinc al semen de cabra lavado, inhibe la descondensación de la cromatina de estos espermatozoides, sugiriendo que el zinc presente en el fluido seminal está involucrado en mantener la estabilidad de la cromatina espermática (Ohanian 1985). Por otro lado, Kwist y Eliasson (Kwist & Eliasson 1980) demostraron que el zinc es responsable de la inhibición de la descondensación de la cromatina de espermatozoides humanos. La conformación asociada a las regiones del ADN con histonas remanentes, se pliega para organizar la estructura nuclear especifica de espermatozoides (Figura 10), la cual es mantenida por su asociación con la matriz nuclear en determinados sitios, también específicos (Santi et al. 1994) llamados MAR (del inglés: "*matrix attachment region*" o región de anclaje a la matriz). Se cree que en las regiones del ADN que se unen a la matriz extracelular se encuentran los genes activos (Ward 1993). La organización estructural que incluye tanto a las histonas unidas al ADN como a los MARs, probablemente sea transmitida al pronúcleo paterno luego de la fecundación, indicando la necesidad de su presencia para una embriogénesis normal.

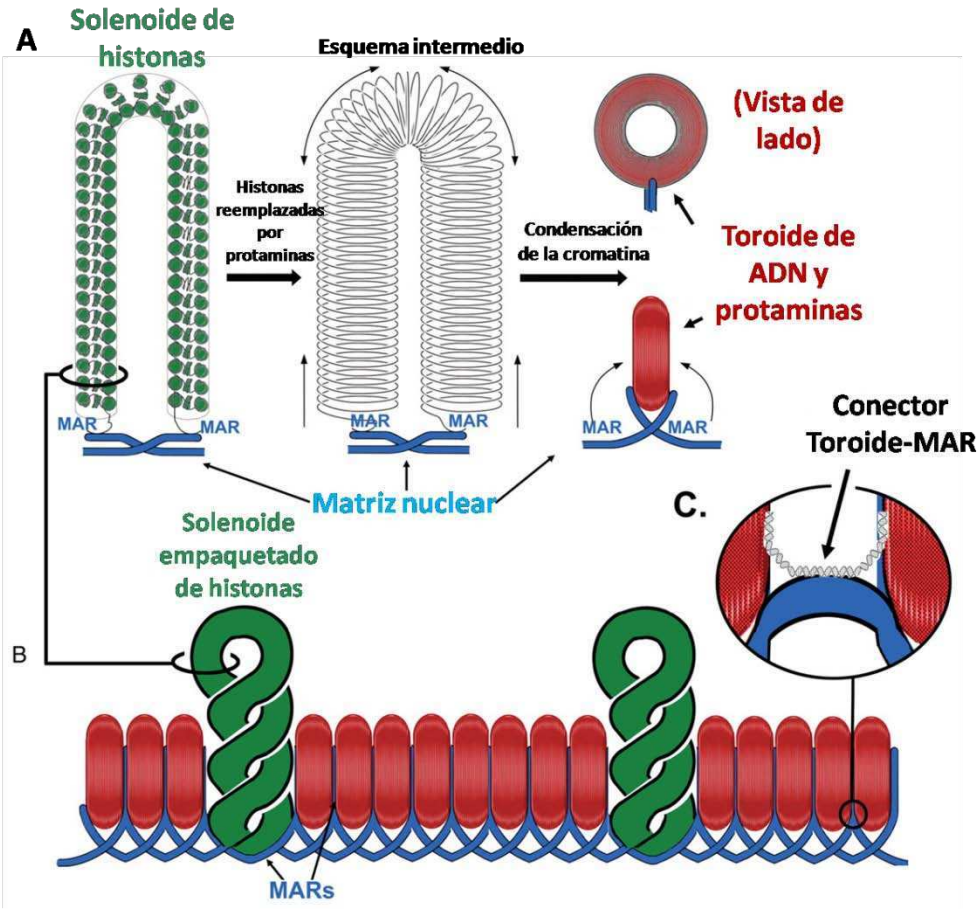


Figura 10. Principales elementos estructurales de la cromatina del espermatozoide. A: *durante la espermiogénesis, las histonas son reemplazadas por protaminas, que condensan el ADN en forma de toroides altamente compactos. Cada protamina del toroide es un dominio de "loop" (la parte A de esta figura está modificada de una figura similar publicada en Ward et al 1993).* ***B:*** *los toroides son organizados lado a lado. Evidencia reciente sugiere que algunos fragmentos del ADN retienen histonas (solenoide verde).* ***C:*** *las cadenas del ADN que se unen a los toroides de protaminas son sensibles a nucleasas, y también podrían estar unidas a histonas. Modificado de (Ward 2010).*

Todos los primates, y la mayoría de los roedores estudiados hasta el momento, producen espermatozoides que contienen ambas protaminas, demostrando que tanto P1 como P2 parecen ser transcriptas y traducidas. Sin embargo, los espermatozoides de la mayoría del resto de las especies solo contienen P1. Mientras que el gen de la protamina P1 parece ser transcripto y traducido en las espermátidas de todos los mamíferos, el gen de la protamina P2 es regulado traduccionalmente de una manera específica de especie. En alguna de estas especies, el gen de la protamina P2 está presente, pero parece ser disfuncional o producir una proteína aberrante.

Las protaminas son pequeñas (50-110 aminoácidos) y pueden llegar a contener un 70% de arginina. Se identificaron dos elementos estructurales en las protaminas de todos los vertebrados: una serie de pequeños dominios de anclaje que contienen múltiples aminoácidos de arginina o lisina responsables de la unión proteína-ADN, y la presencia de múltiples residuos de serina o treonina que pueden ser utilizados como sitios de

fosforilación. En los animales euterios las protaminas contienen múltiples residuos de cisteína que son los que se oxidan para formar puentes disulfuro que unen las protaminas y así estabilizan la cromatina durante los últimos estadios de maduración de los espermatozoides. A pesar de que las protaminas parecen derivar de un precursor ancestral común, P2 tiene varias características que la distinguen de P1. Existe entre un 50 y un 70% de identidad de secuencia entre ambas protaminas, pero en el caso de P2, el gen codifica para una proteína precursora que primero se une al ADN y luego sufre un procesamiento proteolítico. El procesamiento de la protamina, estudiado en detalle en el ratón, ocurre durante varios días en las espermátidas tardías y resulta en la producción de seis formas procesadas del precursor. Cuando se completa el procesamiento, aproximadamente el 40% del extremo amino terminal de la molécula es removido. La forma completamente procesada del precursor de P2, la protamina P2, es un poco más larga que P1 y es la forma predominante en el espermatozoide maduro (Balhorn 2007). La cantidad de protaminas en relación al ADN es constante entre especies, pero la relación P1/P2 es variable (Corzett et al. 2002a) y está aparentemente vinculada con el tiempo necesario para que pueda llevarse a cabo la descondensación nuclear. Aquellas especies que contienen P2 además de P1 descondensarían más rápidamente, sugiriendo que P1 y P2 difieren en el grado de estabilidad que confieren a la cromatina (Perreault et al. 1987).

El espermatozoide en el tracto reproductor femenino

A pesar de que el macho libera millones de espermatozoides en el tracto reproductor de la hembra, esto no garantiza que la fecundación sea exitosa. Después de la eyaculación, los espermatozoides de los mamíferos no son capaces de fecundar al oocito pues, tal como se mencionara previamente, la capacidad fecundante adquirida durante la maduración epididimaria es tan sólo de carácter "potencial". Es durante su paso por el tracto reproductor femenino hacia el sitio de fecundación, que los espermatozoides sufren una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos denominados en su conjunto, capacitación (Austin 1951;Chang 1951;Austin & Braden 1952). Una vez depositados en el sitio de inseminación, la vagina en el caso de espermatozoides humanos y de ratón, los espermatozoides son transportados por el tracto reproductor femenino hasta el sitio de fecundación en la *ampulla* del oviducto. En el momento de la cópula, los espermatozoides son inmótiles, o poseen una motilidad muy reducida, razón por la cual, se acepta que los mismos son arrastrados hacia el cérvix como consecuencia de las contracciones musculares del tracto reproductor femenino. Unos pocos espermatozoides nadan a través de las uniones útero-tubarias para alcanzar el oviducto, donde los espermatozoides se almacenan en un reservorio interactuando con el epitelio oviductal (Suarez 2005). El pasaje de los espermatozoides a través del oviducto comienza a ser controlado por varios procesos regulatorios. A medida que se aproxima el momento de la ovulación, los

espermatozoides que se encuentran en el reservorio, continúan con el proceso de capacitación, ya iniciado en el útero (Figura 11), incluyendo también la hiperactivación de la motilidad. Durante el proceso de capacitación, ocurren grandes cambios en todos los compartimientos del espermatozoide: los factores originados en el fluido epididimario y el plasma seminal se pierden o redistribuyen, los lípidos y proteínas de membrana se reorganizan, el flujo de iones induce modificaciones bioquímicas, los espermatozoides sufren la hiperactivación de la motilidad y se inician complejas señales de transducción (de Lamirande et al. 1997a), además de producirse un incremento en el pH intracelular. Este proceso de capacitación de los espermatozoides también puede promoverse *in vitro,* si los espermatozoides se incuban en presencia de un medio de cultivo definido y que posea determinadas condiciones favorables para tal fin. Los requerimientos necesarios para lograr que esta capacitación *in vitro* funcione, tales como las horas de incubación en el medio o la composición del mismo, varían de una especie a otra, pero en general el medio de cultivo debe tener una composición similar a la del fluido oviductal e incluir fuentes de energía tales como los sustratos piruvato, lactato y glucosa, albúmina, y los iones Ca^{2+}, K^{+}, Na^{+}y $HCO3^{-}$.

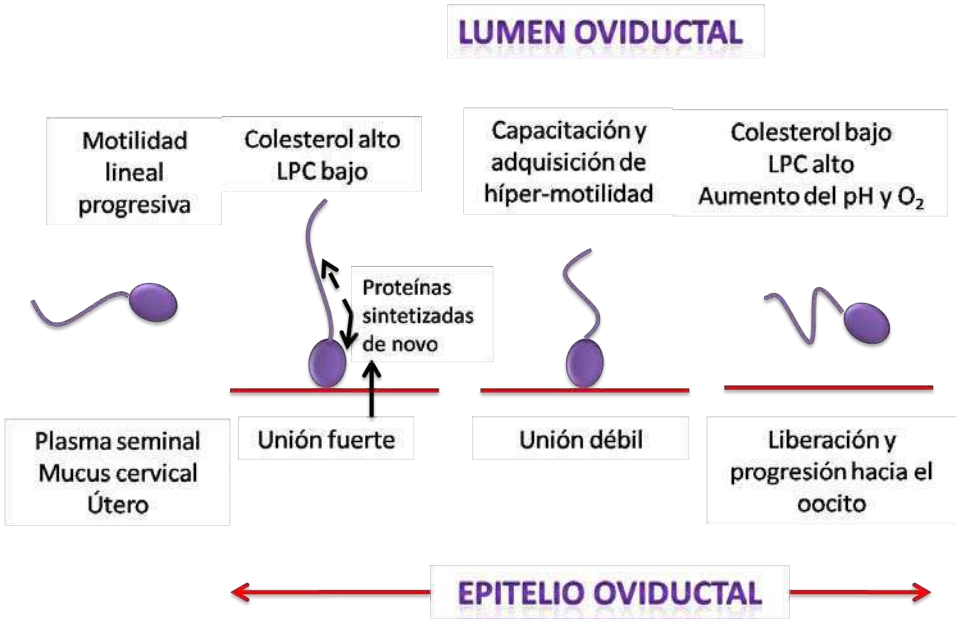


Figura 11. Representación esquemática de la capacitación in vivo. *Los espermatozoides todavía recubiertos con las sustancias originadas en el epidídimo y el plasma seminal no están capacitados cuando entran al oviducto. Se unen fuertemente a las células epiteliales del oviducto, las cuales responden a la síntesis de novo de una variedad de proteínas. Las proteínas específicas del epitelio oviductal se unen a los espermatozoides y permiten mantener la viabilidad y motilidad de los mismos Durante el tránsito por el oviducto se produce un reordenamiento de las proteínas de membrana de los espermatozoides. Cuando se acerca el momento de la ovulación, se producen cambios físicos y químicos en el ambiente que favorecen la capacitación. La unión de los espermatozoides al epitelio oviductal se debilita y la adquisición de la hiperactivación permite que los espermatozoides se desprendan del epitelio y avancen hacia regiones del oviducto donde se completa el proceso de capacitación (de Lamirande et al. 1997b).*

Por lo tanto, los cambios que se producen en el espermatozoide durante la capacitación le permiten, por un lado, sufrir la reacción acrosomal (RA), y por otro, cambiar las proteínas de membrana favoreciendo de esta manera su unión al epitelio oviductal. Mientras esto ocurre en la cabeza del espermatozoide, en la cola se produce la hiperactivación, esto es, un cambio en la motilidad que permite al movimiento del flagelo alcanzar la fuerza necesaria para superar la atracción entre el espermatozoide y el epitelio (Figura 11). La hiperactivación de la motilidad fue definida por Yanagimachi (1994) como un patrón de nado característico, observado en la mayoría de los espermatozoides extraídos de la *ampulla* luego de la fecundación. El flagelo de los espermatozoides hiperactivados se mueve trazando una curva más profunda y usualmente su batido es menos asimétrico que el de los de espermatozoides activados. Como resultado de esto, los espermatozoides hiperactivados vistos sobre un portaobjetos nadan en círculo vigorosamente. El patrón de motilidad es variable en distintas especies de mamíferos estudiadas; en algunas especies, por ejemplo en el ratón, los espermatozoides forman un círculo completo con dos batidos, dando la apariencia de formar una figura con forma de ocho, tal como se puede ver en la figura 12 (Ho & Suarez 2001). De esta manera, el espermatozoide empuja y escapa de las criptas que se hallan en la mucosa (Susan S Suarez 2008; Buffone et al. 2012),y sólo los espermatozoides hiperactivados pueden separarse del epitelio oviductal (Demott & Suarez 1992). La liberación de los espermatozoides es gradual, de tal manera que se reduzcan las posibilidades de que ocurra polispermia. Además, los espermatozoides son guiados hacia el oocito por secreciones del oviducto, las células del *cumulus* o el propio oocito. El avance hacia el sitio de fecundación depende del transporte pasivo llevado a cabo por el fluido oviductal, pero también de la motilidad de los espermatozoides (Demott & Suarez 1992). La hiperactivación también es necesaria para asistir al espermatozoide cuando penetra la matriz del *cumulus*, y la zona pelúcida del oocito durante la fecundación.

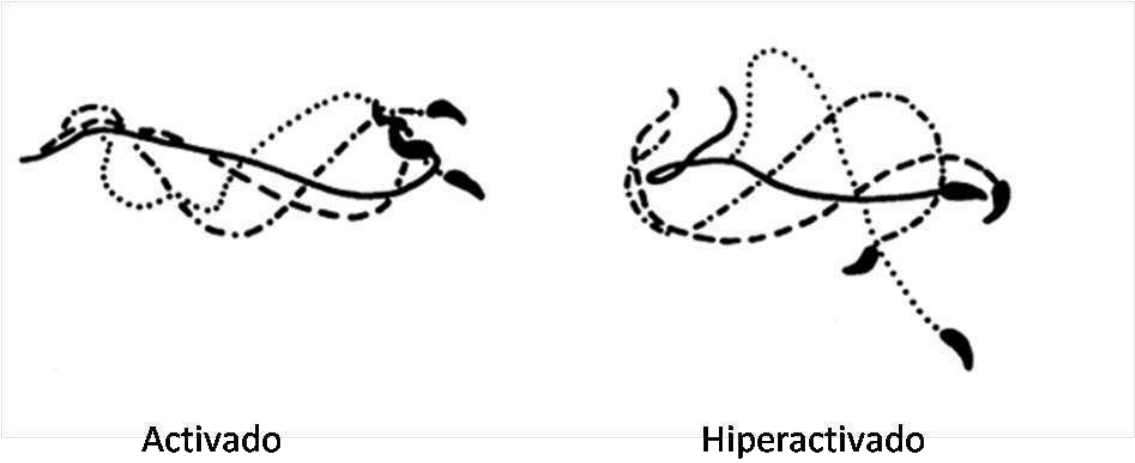


Figura 12. Hiperactivación en espermatozoides de ratón. *Patrón de movimiento característico de espermatozoides activados e hiperactivados (Suarez 2008).*

Una vez que los espermatozoides se capacitaron en el tracto reproductor femenino, responden a distintos estímulos complejos que los impulsan a sufrir la RA. Durante la misma, la membrana acrosomal externa se fusiona con la membrana plasmática produciendo la exocitosis de todo el contenido del acrosoma (Figura 13). Luego de la fusión de las dos membranas, los componentes solubles del acrosoma comienzan a difundir, mientras que los componentes particulados de la matriz permanecen expuestos en la superficie hasta que la matriz se rompe y estos componentes son liberados (Noland et al. 1994; Foster et al. 1997; Buffone et al. 2009). La síntesis de glicoproteínas y su transporte al acrosoma es muy activa, especialmente durante las primeras etapas de la espermiogénesis, lo que provoca cambios en la estructura nuclear, la membrana y el acrosoma. El acrosoma contiene una gran variedad de glicohidrolasas, proteinasas, fosfatasas, esterasas y aril-sulfatasas.

Es importante diferenciar la RA fisiológica o verdadera de la RA falsa, que consiste en la pérdida del capuchón acrosomal por muerte de los espermatozoides. Dentro de la RA verdadera, se puede distinguir una RA inducida por el oocito y una RA espontánea, que se produce en ausencia del oocito. La reacción acrosomal desencadena una serie de eventos esenciales para que ocurra la fecundación. En primer lugar, la membrana acrosomal interna se transforma en el nuevo dominio de membrana en la superficie celular; permitiendo que las moléculas que se encontraban dentro del acrosoma queden expuestas para ayudar al espermatozoide a atravesar la zona pelúcida (ZP). También se adquiere la capacidad fusogénica de la membrana plasmática del segmento ecuatorial del espermatozoide. Sólo la membrana plasmática de espermatozoides que han experimentado la RA es capaz de fusionarse con la membrana plasmática del oocito.

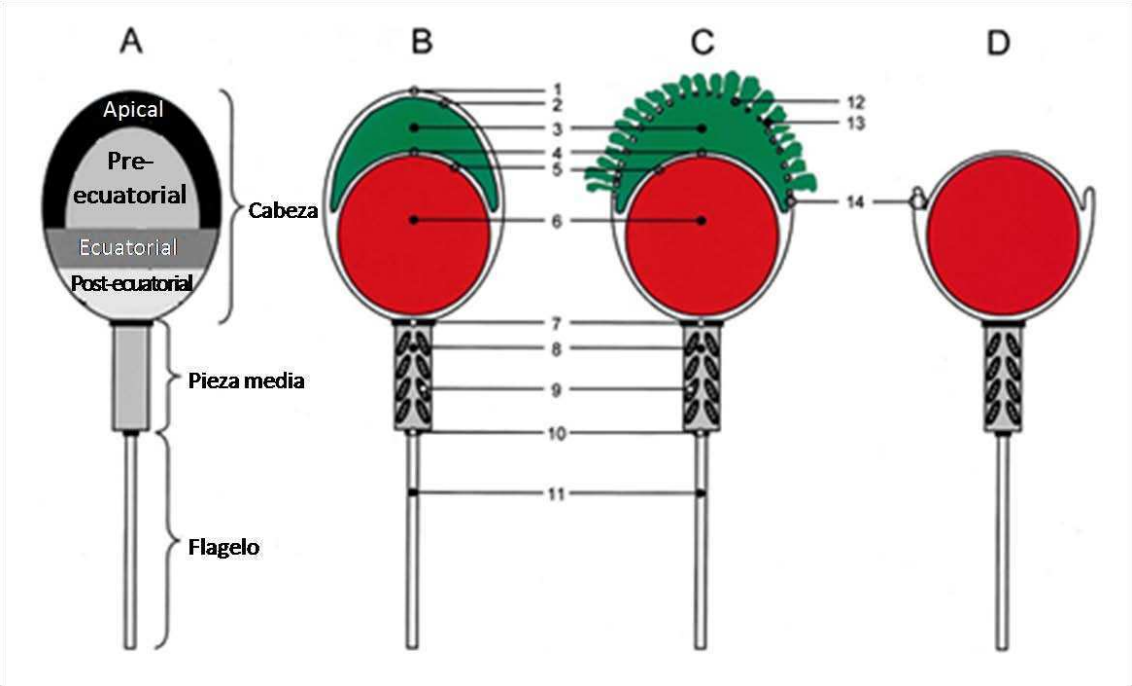


Figura 13. Esquema de los cambios producidos en las membranas del espermatozoide durante la RA. A: *esquema de la superficie del espermatozoide. La cabeza puede ser subdividida en cuatro regiones: apical, pre-ecuatorial, ecuatorial y post-ecuatorial. El acrosoma se sitúa en la zona apical del núcleo;*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

La iniciación de la fusión de membranas en el espermatozoide podría ocurrir en distintos puntos, pero todavía no se conoce con certeza dónde comienza y cómo progresa, dado que la misma depende de la especie y del modo de inducción. Hasta hace algunos años, se sostenía la hipótesis que la RA ocurría como consecuencia del contacto del espermatozoide con la ZP y que los espermatozoides que reaccionaban antes de contactar con la zona pelúcida del oocito eran incapaces de unirse a la misma, perdiendo la capacidad de fecundar (Saling et al. 1979). Sin embargo, en 1984 Yanagimachi y Phillips (Yanagimachi & Phillips 1984) observaron *in vivo* que la mayoría de los espermatozoides de hámster iniciaban su RA mientras avanzaban a través del *cumulus*. Varios años después, Kim y Gerton (Kim & Gerton 2003) propusieron un nuevo modelo, denominado " exocitosis acrosomal", en el que la RA sería un proceso gradual, espontáneo, que sería acelerado por la ZP, pero no iniciado por la misma. En los últimos años, varios grupos demostraron que existen varias etapas previas a la RA (Figura 14). Tanto en ratón como en cobayo, se descubrió que hay una relación temporal entre las cuatro etapas de la exocitosis acrosomal que representan los

estadios transicionales que conducen a la liberación completa de los componentes que se encuentran dentro del acrosoma (Buffone et al. 2009; Kim et al. 2011). Las evidencias previas acerca del rol de la ZP en la exocitosis acrosomal también fueron cuestionadas por Jin (Jin et al. 2011), quien junto a su grupo de trabajo descubrió que la mayoría de los espermatozoides que fecundaban y se encontraban en el *cumulus*, ya habían iniciado la RA y que, además, estos espermatozoides penetraban la ZP sin detenerse demasiado tiempo en su superficie. Otro grupo afirma también que el *cumulus* sería el sitio de exocitosis acrosomal y un nuevo concepto surgió en estudios recientes sosteniendo que sindecan-1 (proteoglicano de heparán sulfato ubicado, generalmente, en membranas) está presente en las células del *cumulus* y posee la habilidad de inducir la exocitosis *in vivo* (Joshi et al. 2014). Entonces, actualmente, se cree que solamente algunos espermatozoides comienzan la RA en la ZP, pero éstos son la excepción en lugar de ser la regla. Varias moléculas pueden inducir la exocitosis acrosomal pero, de todas maneras, este proceso debe ser coordinado en el tiempo y el espacio para que la fecundación sea exitosa.

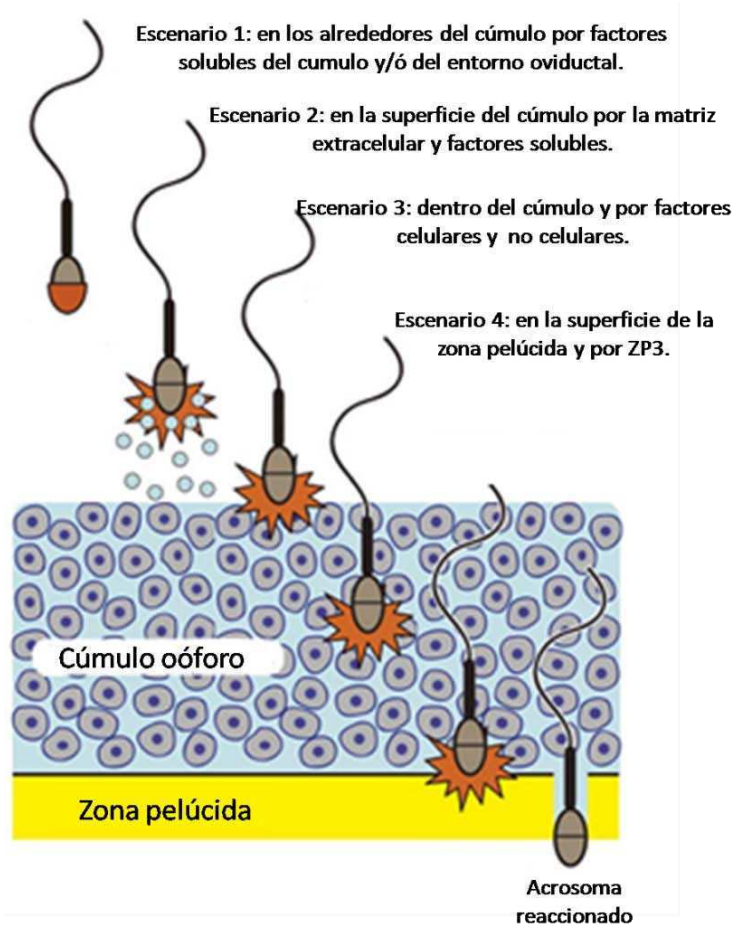


Figura 14. ¿Dónde se inicia la exocitosis acrosomal? *Los escenarios 1-4 ilustran dónde los espermatozoides podrían sufrir la exocitosis acrosomal mientras viajan al sitio de fecundación. La combinación de técnicas antiguas y modernas de imágenes in vivo, muy potentes, debería ayudar a resolver este problema en un futuro cercano (Buffone et al. 2014).*

Fecundación

La fecundación, definida como la unión de un espermatozoide con un oocito, en el caso de los mamíferos es un proceso interno que ocurre en el oviducto, más específicamente en la *ampulla*. Cuando la gameta masculina logra llegar a este sitio de manera coordinada con la ovulación del oocito que se encuentra arrestado en metafase II, tendrá que atravesar las distintas barreras que lo rodean antes de poder ingresar al ooplasma (Figura 15).

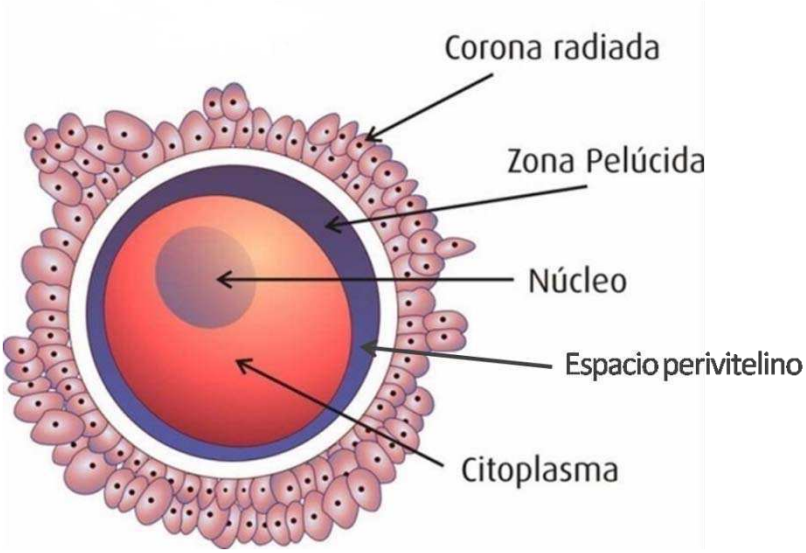


Figura 15. Capas que rodean el oocito. *En el esquema se observa: el núcleo, el citoplasma rodeado por el espacio perivitelino y la zona pelúcida. Más externamente, la densa masa de células del cumulus que habitualmente rodean el oocito (corona radiata).*

En la mayoría de las especies, el espermatozoide, una vez que atraviesa la unión útero-tubaria, se almacena en el istmo hasta el momento de la ovulación. El epitelio del istmo genera un microambiente que estabiliza al espermatozoide por un período determinado hasta que se desencadena la ovulación, momento en el cual, ciertos factores femeninos estimulan la liberación del espermatozoide. Este proceso ayuda a reducir el número de espermatozoides disponibles en el sitio de fecundación, haciendo que la proporción *in vivo* espermatozoide: oocito sea 1:1 o aún menor (Yanagimachi, 1994). La primera barrera con que se encuentra el espermatozoide capacitado al llegar al oocito es la *corona radiata*, formada por las células del *cumulus* y su matriz extracelular. La matriz es secretada por las células del *cumulus* durante la reanudación de la meiosis, causando una rápida expansión del mismo, antes de que ocurra la ovulación. El componente principal de la matriz es el ácido hialurónico (Russell & Salustri 2006), que se encuentra asociado a distintas proteínas. Actualmente se encuentra en discusión de qué manera los espermatozoides aptos logran atravesar el *cumulus*. Se cree que el espermatozoide se abre paso gracias a la combinación de dos factores: uno enzimático, en el cual la hialuronidasa liberada durante la exocitosis

acrosomal degrada la matriz extracelular de las células del *cumulus*, generando un cambio en la viscoelasticidad y por lo tanto, facilitando el movimiento del flagelo; y un factor mecánico que consiste en la hiperactivación que logra el espermatozoide durante su pasaje por el oviducto (Green 1988; Bedford 1998; Kim et al. 2008). Una vez que el espermatozoide inicia la exocitosis acrosomal, continúa su trayecto a través de la ZP que protege al oocito de posibles daños físicos y, luego de atravesarla, transita por el espacio perivitelino rápidamente para fusionarse con la membrana plasmática del oocito, última barrera física que el espermatozoide deberá atravesar antes de que se produzca la fecundación.

Descondensación de la cromatina

El primer cambio visible que ocurre en el núcleo del espermatozoide luego de penetrar la membrana del oocito es la ruptura de la envoltura nuclear y la interacción de la teca perinuclear con el ooplasma, coincidentemente con la descondensación cromatínica (Yanagimachi 1994). Previa incorporación, el oocito está arrestado en MII y el núcleo del espermatozoide está altamente condensado e inactivo; por lo tanto, la fusión de ambas membranas conduce a la descondensación y el remodelamiento de los genomas parentales (Figura 16).

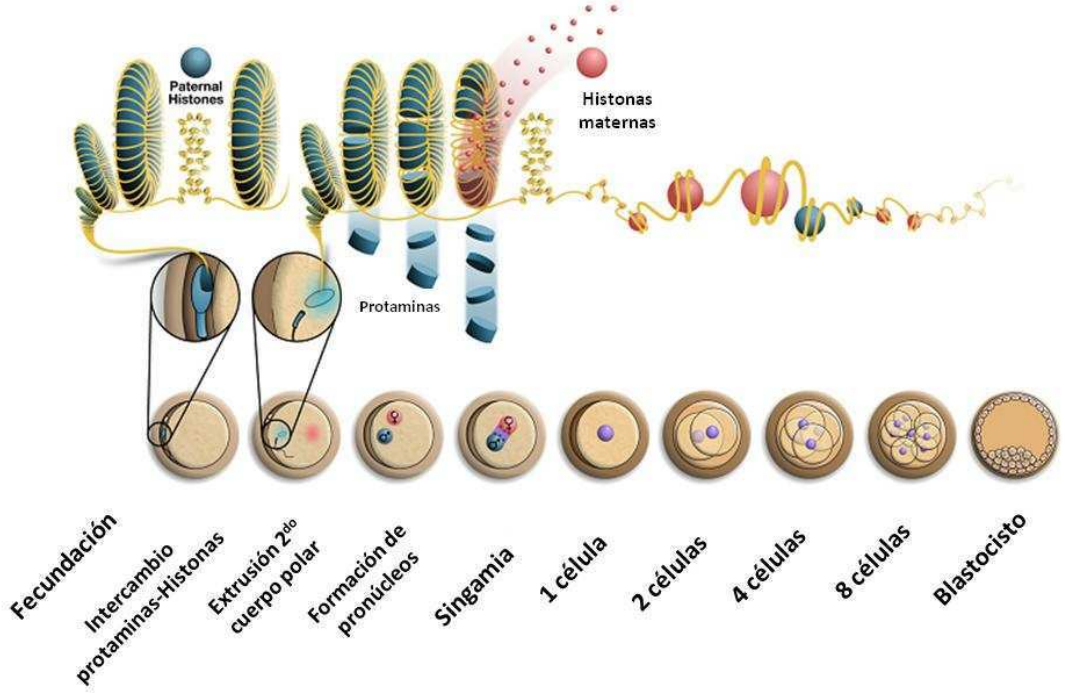


Figura 16. Alteraciones de la cromatina post-fecundación*. El panel de arriba ilustra la estructura de la cromatina del espermatozoide maduro a partir del momento de la fecundación, y en los estadios siguientes en los cuales se produce la transición protamina-histona, resultando en la descondensación de la cromatina del espermatozoide. En la parte inferior se ilustra la cronología de eventos asociado a los distintos estadios del desarrollo embrionario que se correlaciona con las modificaciones en la cromatina (modificado de Jenkins & Carrell 2012).*

Las primeras evidencias acerca del mecanismo de descondensación de la cromatina de espermatozoides las aportaron Calvin y Bedford en 1973 (Bedford et al. 1973) cuando descubrieron puentes disulfuro presentes en el núcleo del espermatozoide. Algunos años después, surgieron más evidencias acerca de la pérdida de proteínas especificas del núcleo que estaban unidas de manera no azarosa al ADN espermático (Ecklund & Levine 1975). Estas evidencias junto con hallazgos posteriores, permitieron comprender dos eventos cruciales para que se produzca la descondensación de la cromatina. Uno de estos eventos involucra la reducción de los puentes disulfuro (-S-S-) de las protaminas a sulfhidrilos libres (-SH), y el otro implica el intercambio de las protaminas del espermatozoide por histonas del oocito. Tradicionalmente, estos dos eventos se han considerado como dos etapas secuenciales en las que primero se reducen los puentes disulfuro por medio de un agente reductor y luego se remueven las protaminas para que sean reemplazadas por histonas maternas (Perreault et al. 1984; Zirkin et al. 1985).

Si bien las protaminas son reemplazadas por las histonas oocitarias cuando se produce la descondensación de la cromatina, parecería ser que las histonas que ya están presentes en el ADN de los espermatozoides no son reemplazadas, sino que se conservan (Kopecný & Pavlok 1975; Ajduk et al. 2006; van der Heijden et al. 2006). Van der Heijden y colaboradores (van der Heijden et al. 2008) demostraron que las histonas con modificaciones específicas están también presentes en el pronúcleo paterno, sugiriendo que nunca fueron reemplazadas (Figura 17).

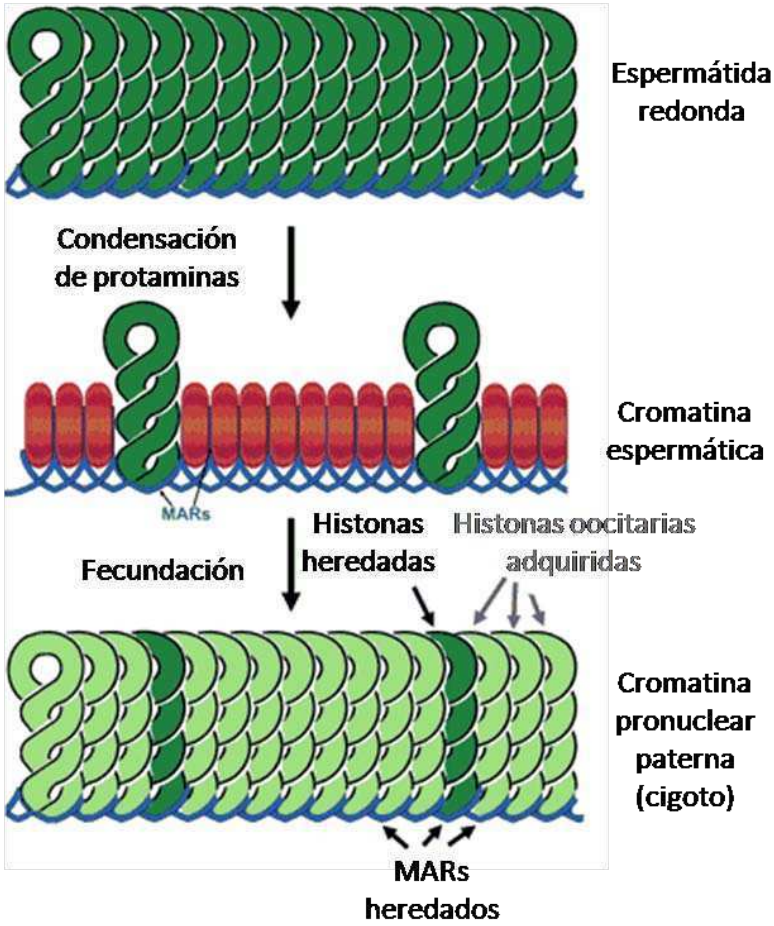


Figura 17. Elementos estructurales que el embrión hereda de la cromatina espermática. *El ADN de las espermátidas redondas está empaquetado por histonas (arriba), pero durante la espermiogénesis la mayoría de estas histonas son reemplazadas por protaminas (medio, rojo). Luego de la fecundación, las protaminas se remueven y son reemplazadas por histonas del oocito (abajo, verde claro). De todas maneras, algunas de estas histonas que fueron retenidas en el ADN (medio, verde oscuro) formaran parte del pronúcleo masculino luego de la fecundación. Las regiones de anclaje a la matriz nuclear (MARs) seguramente serán retenidas también en el pronúcleo masculino (Ward 2010).*

Teniendo en cuenta que el núcleo de los espermatozoides de mamíferos es rico en uniones disulfuro que se forman a lo largo de su maduración en el epidídimo (Calvin & Bedford 1971; Saowaros & Panyim 1979), es lógico pensar que sea necesaria la acción de un agente reductor de estos puentes disulfuro para que ocurra la descondensación. Esta hipótesis fue confirmada mediante la realización de experimentos *in vitro*, en los que se utilizaron distintos agentes reductores no fisiológicos para lograr la descondensación de la cromatina (Marushige & Marushige 1975; Witkin et al. 1975; Zirkin & Chang 1977; Marushige & Marushige 1978; Wagner & Yun 1979; Young 1979), agentes tiólicos más SDS (Bedford et al. 1973; Mahi & Yanagimachi 1973; Gall & Ohsumi 1976; Evenson et al. 1978). Sin embargo, ya hay bastante evidencia de que *in vivo*, la tiorreducción (reducción de los puentes disulfuro) la lleva a cabo el GSH presente en el oocito maduro en una gran variedad de especies de mamíferos incluyendo la humana (Perreault et al. 1984; Calvin et al. 1986; Liu & Baker 1992;

Sutovsky & Schatten 1997) y sería el paso limitante de la velocidad de descondensación nuclear espermática (Zirkin et al. 1982; Perreault et al. 1987). Aún más, en 1997 Sutovsky y Schatten (Sutovsky & Schatten 1997) demostraron que la depleción de glutatión (GSH) en oocitos de bovino impedía la formación de los pronúcleos luego de la inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Además, cuando se reducían los puentes disulfuro con DTT en estos oocitos depletados de GSH se observó que la descondensación nuclear se restablecía, confirmando la necesidad del GSH para que la descondensación ocurriera (Sutovsky & Schatten 1997). Otros autores bloquearon la síntesis de GSH en oocitos de hámster y obtuvieron el mismo resultado (Perreault et al. 1988). El GSH es un tripéptido (γ-Glu-Cys-Gly) que contiene un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato (Figura 18). Además, es sintetizado durante la meiosis I (Perreault et al. 1988) y es el mayor componente no proteico sulfatado del citoplasma del oocito de mamíferos (Abazari-Kia et al. 2014). El tripéptido es un agente reductor endógeno que protege a las células de la oxidación y que cumple muchas otras funciones asociadas al metabolismos celular (Alton Meister & Anderson 1983).

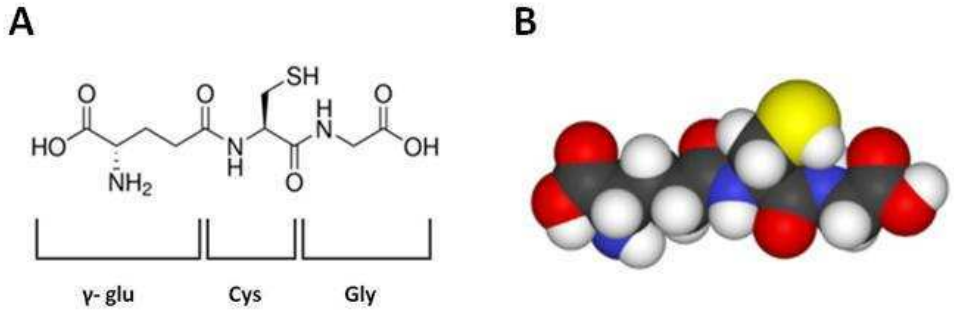


Figura 18: Estructura química del glutatión. A: *esqueleto carbonado del glutatión reducido.* ***B:*** *estructura tridimensional de la molécula, en la que se pueden diferenciar los átomos de carbono (gris), hidrógeno (blanco) oxígeno (rojo), nitrógeno (azul) y azufre (amarillo).*

El glutatión existe en los estados reducido (GSH) y oxidado (GSSG). La síntesis intracelular de esta molécula se produce por la acción secuencial de dos enzimas, primero mediante la actividad de la enzima γ-glutamilcisteinasintetasa (GCS), y luego por la actividad de la enzima glutatión sintetasa. Más del 90% del total del GSH intracelular se encuentra como glutatión reducido, y el balance entre GSH y GSSG se mantiene a través de un rápido reciclado de GSSG a GSH vía la enzima glutatión reductasa (GR) (A Meister & Anderson 1983) (Figura 19). Hay evidencias de que los oocitos regenerarían y mantendrían el GSH en estado tiol de manera similar al resto de las células (Wiesel & Schultz 1981).

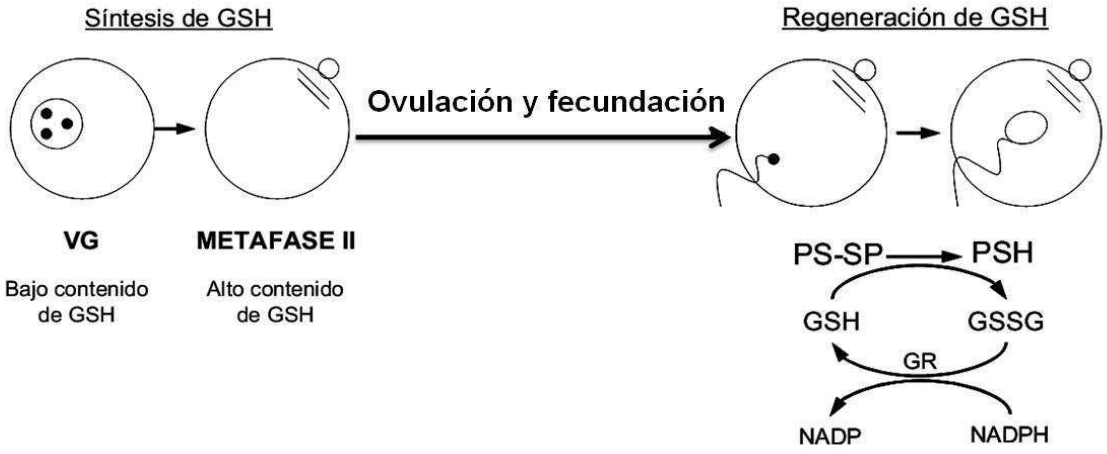


***Figura 19**. **Hipótesis de la adquisición de la capacidad tiorreductora de puentes disulfuro del núcleo espermático durante la maduración oocitaria en mamíferos.** En el momento de la fecundación, el GSH se oxida a GSSG como consecuencia de la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas (La enzima responsable de esta reacción es la glutatión reductasa (GR)). Para que esto suceda, se requiere tanto de la síntesis de un nivel relativamente alto de GSH intra-oocitario en oocitos arrestados en metafase II luego de la ruptura de la vesícula germinal; como de un adecuado sistema regenerador de GSH en el momento de la fecundación. **PS-SP**: protamina con puente disulfuro. **PSH**: protamina tiorreducida. **GSSG**: glutatión oxidado. **GR**: glutatión reductasa (Modificado de Perreault, 1990).*

La importancia fisiológica del incremento del GSH durante la maduración oocitaria fue demostrada por el grupo de Perreault (Perreault et al. 1988) cuando vieron que la capacidad descondensante del núcleo espermático que posee el oocito, podía ser bloqueada o inhibida tratando los oocitos inmaduros de hámster (prometafase I-metafase I) con BSO (L-buthionina-S, R- sulfoximina), un compuesto que inhibe específicamente a la enzima GCS. Los resultados obtenidos demostraron que la síntesis de GSH durante los primeros estadios de la maduración oocitaria, es esencial para adquirir la capacidad descondensante. Por otro lado, los investigadores no vieron efecto alguno del BSO sobre la capacidad descondensante de oocitos en metafase II, sugiriendo que la síntesis y degradación del GSH es baja en estos oocitos, y que el GSH presente en los mismos procede de estadios previos y es suficiente para lograr la descondensación de la cromatina. Asimismo, la capacidad descondensante en oocitos que ya formaron sus pronúcleos disminuye o se hace prácticamente nula (Usui & Yanagimachi 1976). Teniendo en cuenta toda la evidencia de experimentos previos, parecería ser que la capacidad descondensante es máxima en los oocitos maduros arrestados en metafase II, y menor en oocitos inmaduros que se encuentran en estadio de vesícula germinal (VG) (Barros & Muñoz 1973; Usui & Yanagimachi 1976; Berrios & Bedford 1979; Tarkowski & Bałakier 1980; Perreault et al. 1988). Probablemente, esta diferencia en la capacidad descondensante esté relacionada con la disponibilidad de GSH una vez que ocurre el proceso de descondensación, dado que una vez que las protaminas sufren la reducción de sus puentes disulfuro por medio del glutatión, esta molécula se oxida convirtiéndose en GSSG. Se podría suponer que los niveles

necesarios de GSH para reducir los puentes disulfuro de las protaminas dependen de su regeneración mediante la actividad de la enzima glutatión reductasa, que fluctúa con el estado de madurez de los oocitos (Wiesel & Schultz 1981). En 1988 Perreault demostró (Perreault et al. 1988) la diferencia que existe en el contenido de GSH en los distintos estadios de madurez de los oocitos. El valor promedio de GSH encontrado en oocitos ovulados de hámster equivale a una concentración aproximada de 7,8 mM, mientras que la misma aumenta a alrededor de 9-10 mM en oocitos ovulados de ratón (Calvin et al. 1986). Por el contrario, las concentraciones de GSH en VG y oocitos con pronúcleo de hámster disminuye a 4-6 mM (Perreault et al. 1988). Este cambio en las concentraciones en el que GSH es alto cuando el oocito está arrestado en metafase, y bajo cuando el oocito está en interfase (VG o pronúcleo), indicaría que las concentraciones de GSH fluctúan durante el ciclo celular del mismo y, por lo tanto, la síntesis de GSH estaría regulada por factores que regulan el ciclo celular (Zuelke et al. 2003). Una vez maduro el oocito, se frena la síntesis y los valores elevados de GSH se mantienen por medio de la glutatión reductasa (Luberda 2005). No se conocen todavía las implicancias del rápido aumento en GSH durante las primeras etapas de la meiosis, pero evidencias aportadas por el grupo de Soltaninassab (Soltaninassab et al. 2000), indicarían que el tiempo intermedio entre la aplicación de hCG y el incremento de GSH sería suficiente para permitir la transcripción y traducción de la enzima GCS, enzima catalizadora de la reacción limitante de la síntesis de GSH. De estos experimentos, también se desprende entonces, que el metabolismo del GSH estaría regulado por la acción de las gonadotrofinas (Clague et al. 1992; Aten et al. 1992) y que las células del *cumulus* contribuirían al "pool" de GSH presente en el ovario.

Teniendo en cuenta toda la evidencia previa, entonces, se pudo establecer que a pesar de que el GSH disponible en el oocito sería el factor limitante, no sería el único determinante para que se produzca la descondensación. La reducción de los puentes disulfuro no es suficiente para que se produzca la descondensación *in vitro.* Una vez que las uniones disulfuro de las protaminas son reducidas, se cree que otros factores deberían ganar acceso al ADN para dispersar la cromatina y remover las protaminas asociadas a él (Perreault et al. 1988). Algunos grupos sostienen que la descondensación involucra la degradación enzimática de las protaminas (Marushige & Marushige 1975; Zirkin & Chang 1977; Marushige & Marushige 1978; Zirkin et al. 1982), mientras que otros autores opinan que este evento ocurriría por mecanismos no enzimáticos que dependen de la carga de las moléculas (Calvin & Bedford 1971; Mahi & Yanagimachi 1973; Rodman et al. 1981; Dean 1983). En 1985, Zirkin (Zirkin et al. 1985) realizó una serie de experimentos en los que eliminaba la actividad proteasa de espermatozoides de hámster e insertaba su núcleo en oocitos ovulados; luego, determinaba si ocurría la descondensación y formación de pronúcleos. Como consecuencia de los resultados de estos experimentos, Zirkin sostuvo que la descondensación del núcleo espermático se inicia en la región postacrosomal y que la misma continúa a lo largo de la cabeza del espermatozoide mediante un proceso

enzimático que involucra la degradación proteolítica de las protaminas; y que la reducción de los puentes disulfuro es necesaria pero no suficiente. La hipótesis alternativa, considera 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 oocitarias. En 1966 Graham (Graham 1966) realizó experimentos con el fin de evaluar la contribución de los oocitos de *Xenopus laevis* sobre la síntesis de ADN y observó que la capacidad del citoplasma de los oocitos maduros de inducir la síntesis del ADN del núcleo del espermatozoide introducido, cambia a medida que el huevo atraviesa distintos estadios del ciclo celular. Por lo tanto, es el estado del citoplasma del oocito quien estaría controlando la síntesis de ADN y la mitosis. Teniendo en cuenta estos resultados, en 1969 Merriam (Merriam 1969) y su grupo analizaron la relación entre la entrada de las proteínas del ooplasma al núcleo de espermatozoides introducidos en el oocito maduro y la capacidad de inducir la descondensación de la cromatina y la síntesis de ADN. Como resultado, observaron que la descondensación nuclear es un evento esencial para que ocurra la síntesis de ADN y que depende de un conjunto preferencial de proteínas que aparecen en el citoplasma de oocitos maduros. Unos años más tarde, Barry (Barry & Merriam 1972a) demostró que el núcleo de precursores eritroides descondensaba en los oocitos maduros de *Xenopus* pero no en oocitos inmaduros y afirmó que la descondensación se podía reproducir *in vitro* cuando se utilizaba heparina debido a que su naturaleza polianiónica probablemente le conferiría la capacidad de desplazar las proteínas básicas del ADN. Si bien al introducir espermatozoides en el ooplasma de oocitos se observa siempre la descondensación de la cromatina, cuando se inyectaron espermatozoides en oocitos enucleados no se observó descondensación. Sin embargo, cuando el material nuclear fue introducido nuevamente, los espermatozoides sí fueron capaces de descondensar su cromatina (Lohka & Masui 1983). De la misma manera, cuando se inyectaron espermatozoides de ratón en oocitos de rata no hubo descondensación hasta que la envoltura nuclear del oocito no se hubiese desintegrado (Thadani 1979). Con toda esta evidencia se pudo inferir que el núcleo de los oocitos contiene agentes descondensantes que permanecen en una alta concentración en el ooplasma luego de que ocurra la ruptura de la envoltura nuclear. Cuando en 1978, Laskey y colaboradores (Laskey et al. 1978) purificaron las proteínas presentes en los nucleosomas de los oocitos maduros de *Xenopus laevis*, se identificó una proteína capaz de unirse a las histonas que se denominó nucleoplasmina. La nucleoplasmina es una proteína altamente ácida, termoestable y la más abundante en el núcleo del oocito donde se acumula. Esta proteína permanece en el citoplasma luego de la ruptura de la vesícula germinal. En 1991, Philpott, demostró que la nucleoplasmina, presente en el citoplasma de huevos de *Xenopus* (Philpott et al. 1991; Philpott & Leno 1992), era intermediaria en la descondensación de la cromatina en espermatozoides en esa especie. También se demostró esta función para la nucleoplasmina en *Drosophila*

melanogaster y *Mytiluscalifornianus* (Ohsumi & Katagiri 1991; Kawasaki et al. 1994; Rice et al. 1995; Philpott et al. 2000). Un estudio reciente sugiere que la nucleoplasmina sufre modificaciones post-traduccionales que regulan su actividad de chaperona y que, además, secuestra completamente a las histonas del ADN y también a las histonas unidas a otras chaperonas (Onikubo et al. 2015). En mamíferos, incluido el hombre, la nucleoplasmina no sería la responsable de la descondensación de la cromatina de los espermatozoides, ya que Burns y colaboradores en 2003 (Burns et al. 2003) demostraron que en hembras de ratones *knock-out* para nucleoplasmina, los espermatozoides pueden descondensar su cromatina sin problemas. Tal como demostraron Barry y Merrian (Barry & Merriam 1972b) que la descondensación de la cromatina podía inducirse en oocitos de hámster, también fue posible demostrarlo *in vitro* con espermatozoides humanos en presencia de concentraciones fisiológicas de heparina y GSH (Carranco et al. 1983; Jager et al. 1990). Además, la heparina tiene una fuerte afinidad por las protaminas y puede combinarse con ellas para formar complejos insolubles (Chargaff and Olson, 1938). Según experimentos realizados por Delgado en 1982, en los que evaluó la capacidad descondensante de distintos glicosaminoglicanos (GAGs), las diferencias en la capacidad descondensante dependían del grado de sulfatación de la molécula. Varios autores describieron la presencia de receptores de heparina en la membrana del espermatozoide (Delgado et al. 1982; Carrell & Liu 2002). Aunque la heparina actúe como descondensante de la cromatina de los espermatozoides (Delgado et al. 1980), primero es necesario que atraviese la membrana plasmática. Teniendo en cuenta esto, la unión del polisacárido a las células sería un requisito para la internalización del mismo. La unión a la membrana y la descondensación estarían relacionadas y, por lo tanto, sería necesario primero que la heparina se una a su receptor para desestabilizar la membrana. Luego de la apertura de la membrana y penetración del espermatozoide, entonces las moléculas presentes en el ooplasma tendrían acceso al núcleo del espermatozoide. Observaciones mediante microscopía electrónica mostraron que solamente aquellos espermatozoides que habían sufrido la descondensación, fueron los que tenían heparina unida a sus membranas (Delgado et al. 1982).

Los espermatozoides de mamíferos están revestidos por una delgada cubierta llamada glicocálix que se ensambla durante su desarrollo, maduración y contacto con el fluido seminal (Figura 20). El glicocálix es crítico para la supervivencia del espermatozoide durante su paso por el tracto reproductor femenino y su capacitación. Toda la membrana de la célula tiene glicolípidos que tienen asociados varias estructuras de disacáridos, estos glicoconjugados interactúan generando numerosos motivos de señalización que regulan la función espermática y, como resultado, la fertilidad. Los proteoglicanos que albergan largas cadenas de GAGs tales como el heparán sulfato o el condroitín sulfato, se superponen y extienden hacia el exterior. Como resultado de distintas investigaciones realizadas durante varios años, los glicosaminoglicanos se

consideraron moléculas muy importantes en la regulación de la función reproductiva (Delgado et al. 1980; Reyes et al. 1984; Meizel & Turner 1986). El glicocálix contiene moléculas que participan en actividades específicas relacionadas con la fecundación. El oocito también está rodeado de un glicocálix, que consiste en una malla compleja de glicoproteínas de la zona pelúcida rodeada de una matriz extracelular de ácido hialurónico que contiene a las células del *cumulus* y sus conjugados específicos.
Los GAGs son componentes ubicuos de los tejidos humanos con valores detectables en el tracto genital masculino (Sampaio et al. 1985), femenino (Lee & Ax 1984) y fluido folicular (Yanagishita et al. 1979; Grimek et al. 1984). Sin embargo, los GAGs fisiológicamente activos son los que están hidrolizados en el fluido folicular antes de la ovulación (Delgado & Zoller 1987; Gosden et al. 1988).

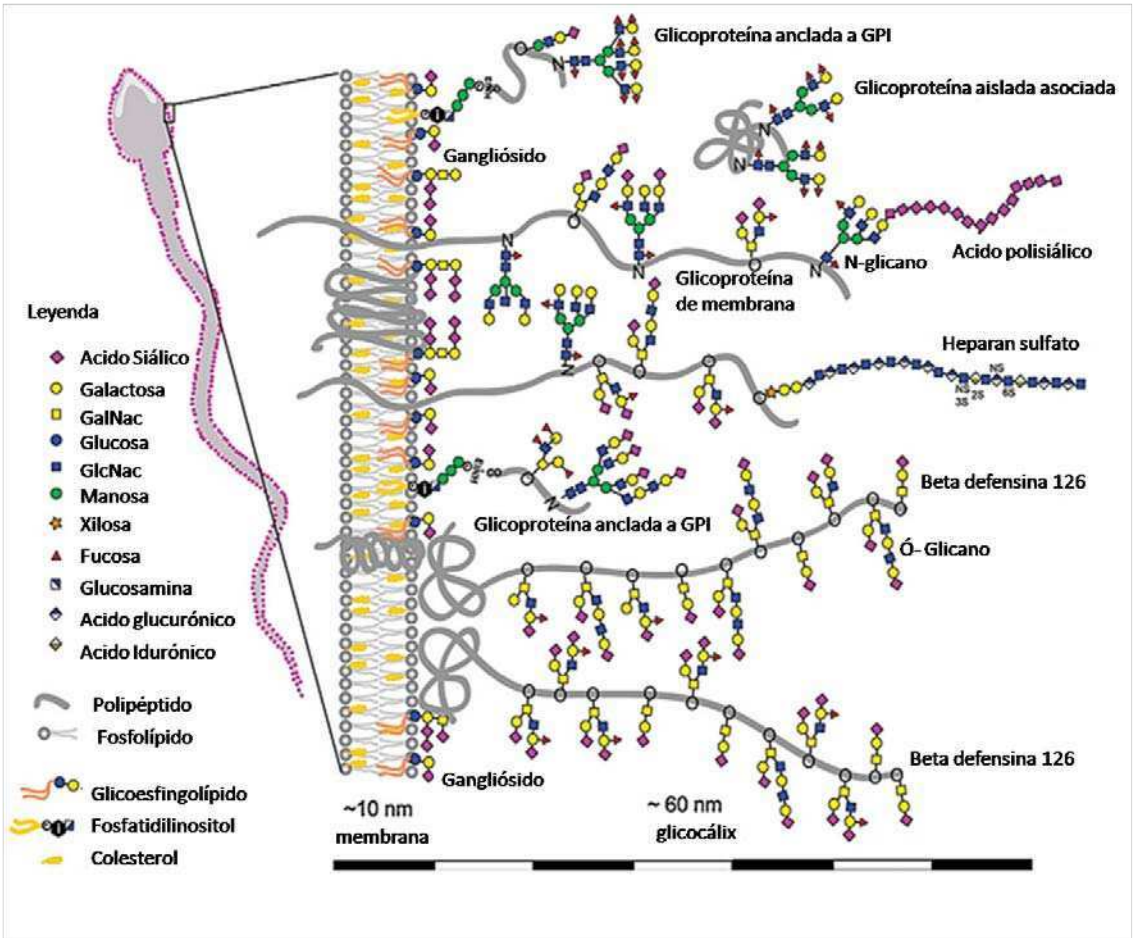


Figura 20. Las principales clases de glicanos y glicoconjugados del glicocálix del espermatozoide. *Los monosacáridos están coloreados con símbolos explicados en la leyenda. Las proteínas y los lípidos son grises, excepto el colesterol que está en color amarillo, y los lípidos de los esfingolípidos están en color naranja. Los mamíferos sintetizan glicanos ensamblados con una docena de distintos monosacáridos; algunos de los cuales pueden sufrir modificaciones tales como la sulfatación o la acetilación (Tecle & Gagneux 2015). En esta figura puede observarse la variedad de compuestos glicosilados y lo complejo de la estructura, otorgando especificidad a la interacción entre el espermatozoide y el oocito.*

Los GAGs son polisacáridos cargados negativamente, compuestos por unidades repetidas de disacáridos con o sin grupos sulfhidrilo asociados al esqueleto carbonado. En los tejidos, los GAGs se encuentran en su forma de proteoglicanos, a excepción del ácido hialurónico. Algunos GAGs son el ácido hialurónico (AH), el condroitín sulfato (CS), el dermatán sulfato (DS), el heparán sulfato (HS) y la heparina (H). Considerando los resultados obtenidos a lo largo de la historia en relación a la descondensación, en un principio nos enfocaremos en los dos últimos. Los polisacáridos de heparán sulfato son una familia de polisacáridos lineales, heterogéneos y sulfatados que se encuentran en la membrana y en la matriz extracelular como parte de proteoglicanos. La heparina es un polisacárido estructuralmente similar que se encuentra en los mastocitos como un componente del proteoglicano serglicina y que difiere en composición con el HS de varias especies de mamíferos (Gallagher & Walker 1985). Teniendo en cuenta la definición convencional, el HS y la H pueden ser comparadas de la siguiente manera: primero, en la heparina, predomina el L-iduronato mientras que en el HS predomina el D-glucuronato. Segundo, en la H la D-glucosamina está predominantemente N-sulfatada, mientras que en el HS la D-glucosamina está predominantemente N-acetilada. Las diferencias en sus características estructurales hacen que la heparina esté más sulfatada y, por lo tanto, más cargada que el heparán sulfato (Rosenberg & Lam 1979; Gallagher & Walker 1985). Además, el HS tiene un peso molecular (*cercano a* 50 kDa) mucho mayor que la H (*cercano a* 20 kDa) (Figura 21)(Mulloy et al. 2000).

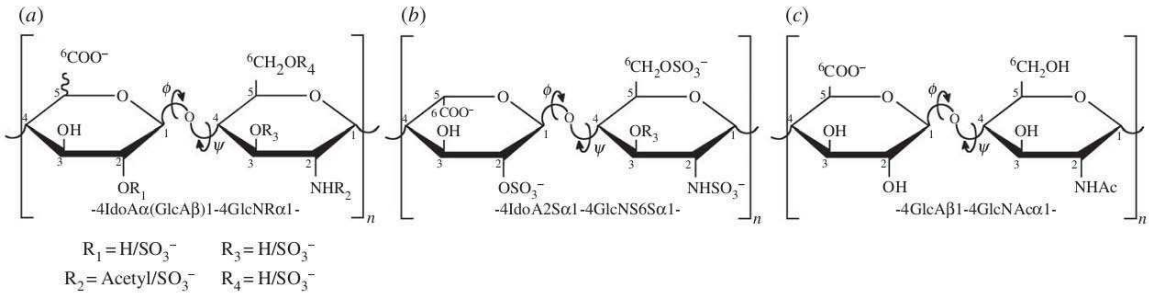


Figura 21. Características estructurales del HS y la H. *(a) Posibles patrones de sustitución entre la H y el HS. (b) la mayor unidad de disacárido de la heparina, que corresponde al 70-80% de la molécula. (c) La mayor unidad disacarídica de HS. La gran variación en la composición de HS también se observa entre especies y tejidos. f(phi) y (psi) representan los ángulos de torsión en las uniones glicosídicas (Meneghetti et al. 2015).*

A pesar de estas diferencias, se encontró HS con características similares a la H en varios tejidos y tipos celulares (Dietrich et al. 1987; Stringer et al. 1999; Shao et al. 2013). Sería posible, entonces, considerar a la heparina como una forma específica de tejido del HS. De hecho, debido a su similitud estructural con el heparán sulfato, a que posee actividad biológica semejante en diversos sistemas experimentales y a su mayor accesibilidad y menor costo, la heparina es elegida generalmente para ser utilizada en muchos experimentos como reemplazo del HS. El HS y sindecan-1 (proteoglicano del HS) fueron identificados en espermatozoides humanos provenientes de eyaculados, y

se cree, que participan en la asociación del espermatozoide al virus de inmunodeficiencia humano 1 (HIV-1) y el virus del papiloma humano 16 (HPV-16) (Ceballos et al. 2009; Foresta et al. 2011).

La biosíntesis de la H y el HS comienza en el retículo (Multhaupt & Couchman 2012) y continúa en el aparato de Golgi, donde varias polimerasas y enzimas modifican los distintos sustratos, dotando a cada molécula de una serie de características que le conferirán su acción biológica particular. La H y el HS pueden interactuar con un gran número de proteínas (Mulloy et al. 2000; Meneghetti et al. 2015) La unión de los polisacáridos de H/HS a las proteínas, involucra la unión de estos GAGs cargados a residuos de lisina y arginina, así como también interacciones con otros aminoácidos. Esta característica, es la que hace pensar en una posible interacción entre estos GAGs y las protaminas que se encuentran unidas al ADN del espermatozoide, dado la abundancia de arginina y lisina que presentan las mismas. La heparina y el GSH inducirían la descondensación de núcleos espermáticos a través de un mecanismo de neutralización de cargas iónicas de la cromatina (Delgado et al. 2001), es decir mediante una interacción directa de la heparina sobre la cromatina, sugiriendo que se trataría de un fenómeno meramente electrostático. Sin embargo, en nuestro laboratorio se demostró, utilizando heparinas químicamente modificadas, que si bien la actividad descondensante *in vitro* de la heparina era independiente del peso molecular de la misma en el rango de 3 a 18 kDa, se veía fuertemente afectada por la sulfatación de la molécula, no sólo porque se altera la carga neta, sino porque se modifica la ubicación de las cargas en la unidad disacarídica (Romanato et al. 2003). La localización de estas cargas determina las interacciones electrostáticas entre grupos cargados a lo largo de la cadena sulfatada y, en consecuencia, la modificación de la sulfatación de la molécula genera cambios conformacionales que, a su vez, modifican su actividad biológica. Se propuso entonces que la actividad descondensante *in vitro* de la heparina estaría relacionada con las características estructurales de la molécula y no solamente con la carga neta de la misma (aniónica,) que le permite competir con el ADN por las protaminas.

Por otro lado, comparando las cinéticas de descondensación de núcleos aislados y espermatozoides enteros, en nuestro laboratorio demostramos que la membrana plasmática del espermatozoide funcionaría como una barrera importante para que ocurra la descondensación nuclear. Estos resultados revelaron que sólo aquellos espermatozoides cuya membrana plasmática fue alterada durante el proceso de capacitación serían capaces de descondensar en presencia de heparina y GSH. Una vez que la membrana plasmática se remueve al aislar los núcleos, se alcanza el 100% de descondensación gracias al acceso total de los agentes descondensantes al interior del núcleo espermático (Romanato et al. 2005).

Estudios de inmunocitoquímica, también llevados a cabo en nuestro laboratorio, utilizando un anticuerpo anti heparán sulfato, permitieron demostrar la presencia del GAG en el ooplasma de oocitos maduros de ratón y humanos, como así también en el

espacio perivitelino y en células del *cumulus* (Julianelli et al. 2012a; Romanato et al. 2005). Se pudo demostrar que este HS sería responsable, por lo menos en parte, de la actividad descondensante de oocitos murinos frescos *in vitro,* a través de un micro-ensayo de descondensación de espermatozoides humanos. El agregado de heparinasa, pero no de otras glicosidasas a este sistema, redujo significativamente la capacidad de los oocitos murinos de descondensar los espermatozoides humanos. (Romanato et al. 2008).

Posteriormente, se quiso evaluar el efecto del uso simultáneo o secuencial de agente tiorreductor (GSH o DTT) y aceptor de protaminas (heparina/ HS) sobre la descondensación de espermatozoides humanos y núcleos aislados. Julianelli (Julianelli et al. 2012a) observó que la adición en primer lugar de H sola provocaba una reducción significativa de la descondensación a pesar de que el agente reductor fuera agregado a continuación de la misma, lo cual sugería que la cromatina compacta no permite la remoción total de las protaminas. Lo mismo observó al utilizar el GSH y la H en el orden inverso, indicando que el reductor requiere de la remoción parcial de las protaminas mediante la acción de la H. Al analizar si el efecto cooperativo dependía de la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas por acción del GSH, los resultados revelaron que la H fomenta la actividad del GSH, confirmando así, la existencia de un efecto cooperativo entre ambas moléculas.

En conjunto, todos los resultados obtenidos durante estos años en nuestro laboratorio, indican que durante la descondensación *in vivo* de espermatozoides humanos, el HS presente en oocitos humanos maduros, no sólo estaría actuando como "aceptor" de protaminas, sino que también colaboraría con el GSH en la reducción de los puentes disulfuro presentes en las mismas (Julianelli et al. 2012b).

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, creímos importante estudiar el proceso de descondensación espermática en espermatozoides de ratón con miras a utilizarlo como posible herramienta indicadora del efecto de tóxicos ambientales o ingeridos sobre la función reproductiva.

Agentes tóxicos ambientales o ingeridos

Actualmente, hay mucha evidencia que sostiene que la función reproductiva masculina está disminuyendo, tanto en humanos como en las poblaciones salvajes. Los riesgos asociados a la calidad de vida de las personas, tales como el consumo de alcohol o tabaco, el estrés y la exposición a tóxicos ambientales en relación a la infertilidad, han sido informados hace mucho tiempo (Figura 22). Los posibles efectos sobre la reproducción, luego de la exposición a los contaminantes ambientales, fueron puestos en evidencia en muchos estudios pero también se encontraron resultados conflictivos (Wigle et al. 2008; Toft et al. 2004). Este detrimento en la reproducción, coincide con el incremento y prevalencia de productos químicos en el ambiente durante los últimos cincuenta años. Algunas sustancias químicas, alteran el desarrollo del sistema

endocrino fetal en animales cuando están en el útero. De hecho, los tratamientos realizados en animales de laboratorio generaron los mismos efectos que se observaron en humanos o en animales salvajes. Además, se sabe que hay ventanas de tiempo específicas durante la gestación, en las que se produce el desarrollo fetal de las gónadas, que son altamente sensibles a pequeños cambios endocrinos (Murray et al. 2001).

La patología de la infertilidad masculina puede ser explicada como una cascada de eventos moleculares, bioquímicos y fisiológicos, que por lo general es representada por parámetros espermáticos anormales. Una de las posibles causas por las que la fertilidad se ve reducida es que los espermatozoides dañados o defectuosos generan grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés "*reactive oxygen species*") y éstas son responsables del daño oxidativo (Ball et al. 2001). Los radicales libres (RL) son especies químicas que tienen un electrón no apareado, comportándose de esta manera, como moléculas altamente reactivas (Hicks 2001). Son capaces de causar daño por reaccionar con diversas biomoléculas, sustrayendo electrones para lograr su estabilidad. Los sustratos moleculares más frecuentes incluyen a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, nucleótidos en el ADN, proteínas y carbohidratos (Machlin & Bendich 1987; Vilar-Rojas et al. 1996; Beckman & Ames 1998). Entre las especies reactivas de oxígeno, se destacan fundamentalmente el anión superóxido ($^{\cdot}O_2^{-}$), el radical hidroxilo ($^{\cdot}OH$), el anión hidroxilo (OH^{-}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Beckman & Ames 1998; Sommer et al. 2000). Los espermatozoides son altamente sensibles a los daños causados por las ROS, pudiendo resultar en daño en la membrana celular y en el ADN, y conducir al deterioro de su motilidad y función (Kumar et al. 2014). Su sensibilidad se debe, probablemente a la ausencia de enzimas antioxidantes citosólicas y a la relativa abundancia de ácidos grasos insaturados. Dada esta susceptibilidad, es asombroso que los espermatozoides sean al mismo tiempo, células con una intensa actividad redox y altos generadores de especies reactivas del oxígeno (Baker & Aitken 2004).

Los antioxidantes son aquellas sustancias que, estando presentes en bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retardan o previenen la oxidación de dicho sustrato (Gutteridge & Halliwell 1989). Estas móleculas funcionan colisionando con los RL y cediéndoles un electrón, reacción en la cual se oxidan y convierten en RL débiles no tóxicos. La evidencia sugiere que la alteración en el balance entre las sustancias peroxidantes y antioxidantes del semen conduce a desórdenes metabólicos y funcionales de las células germinales masculinas, y sería una de las principales causas de algunos tipos de infertilidad masculina. Con el fin de superar estas deficiencias, el espermatozoide cuenta con sistemas celulares "electron-scavengers" ("basureros") que contienen antioxidantes no enzimáticos tales como el GSH (Hsu et al. 1964), el ácido ascórbico (Sharma et al. 1964) el alfa-tocoferol (vitamina E), etc.; y una variedad de enzimas sensibles al estado redox de la célula que

catalizan reacciones químicas en las que participan sustratos que interaccionan con RL. Las más importantes son la enzima superóxido dismutasa (SOD) (McCord JM 1969), la catalasa (CAT) (Aebi et al. 1964) y la glutatión peroxidasa (GSH-PX). La enzima SOD actúa previniendo la peroxidación de la membrana plasmática causada por radicales superóxido, tanto intracelulares como extracelulares. Esta actividad debe ser conjugada con la actividad CAT o GSH-PX para prevenir la acción de los peróxidos de hidrógeno. La catalasa detoxifica a la célula del H_2O_2 intracelular y extracelular convirtiéndolos en agua y oxígeno (Kumar et al. 2014). La GSH-PX cataliza la reducción del peróxido a agua utilizando al NADPH. En el sentido bioquímico, todos estos sistemas contribuyen al estado redox de la célula y, sorprendentemente, tendrían la llave de la regulación homeostática de los caminos de señales de transducción (Baker & Aitken 2004). El GSH es necesario como coenzima por una variedad de enzimas, incluyendo la GSH-PX, glutatión S Transferasa (GST), y tioltransferasa. El sistema antioxidante está compuesto por GSH en conjunto con dos enzimas GPx y GR. Este sistema cataliza la disminución de peróxido de hidrógeno y el GSH opera en ciclos alternando entre su forma oxidada (GSSG) o reducida. El GSH reduce el peróxido de hidrogeno a agua en presencia de GSH-PX formando un puente disulfuro y, en seguida, el GSH es regenerado. El GSH mantiene el estado redox crítico de las proteínas sulfhidrílicas, que son necesarias en la reparación y expresión del ADN. El GSSG se acumula y por lo tanto, la relación GSSG/GSH es una buena medición del estrés oxidativo de un organismo. Tal como se mencionó anteriormente, los RL inducen la peroxidación de lípidos, debido a la abundante presencia de fosfolípidos en los sitios donde se forman los RL y específicamente los ROS (de Zwart et al. 1999). El malondialdehído (MDA) es uno de los productos más abundantes de la peroxidación lipídica y puede reaccionar con el ADN formando aductos que son mutagénicos en células bacterianas y de mamíferos. La sensibilidad de la detección del mismo mediante su reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARs), lo convirtió en el ensayo de elección para el *screening* y monitoreo de la peroxidación lipídica y, a pesar de que en la literatura la especificidad del ensayo respecto a los distintos compuestos del MDA ha sido ampliamente discutida, aún sigue siendo comúnmente utilizado para determinar la peroxidación lipídica. Con toda la evidencia previa acerca del daño que las ROS son capaces de producir, es importante evaluar el posible efecto de los tóxicos sobre el estado redox de las células, en nuestro caso particular, los espermatozoides, para tratar de comprender el mecanismo de acción de los mismos.

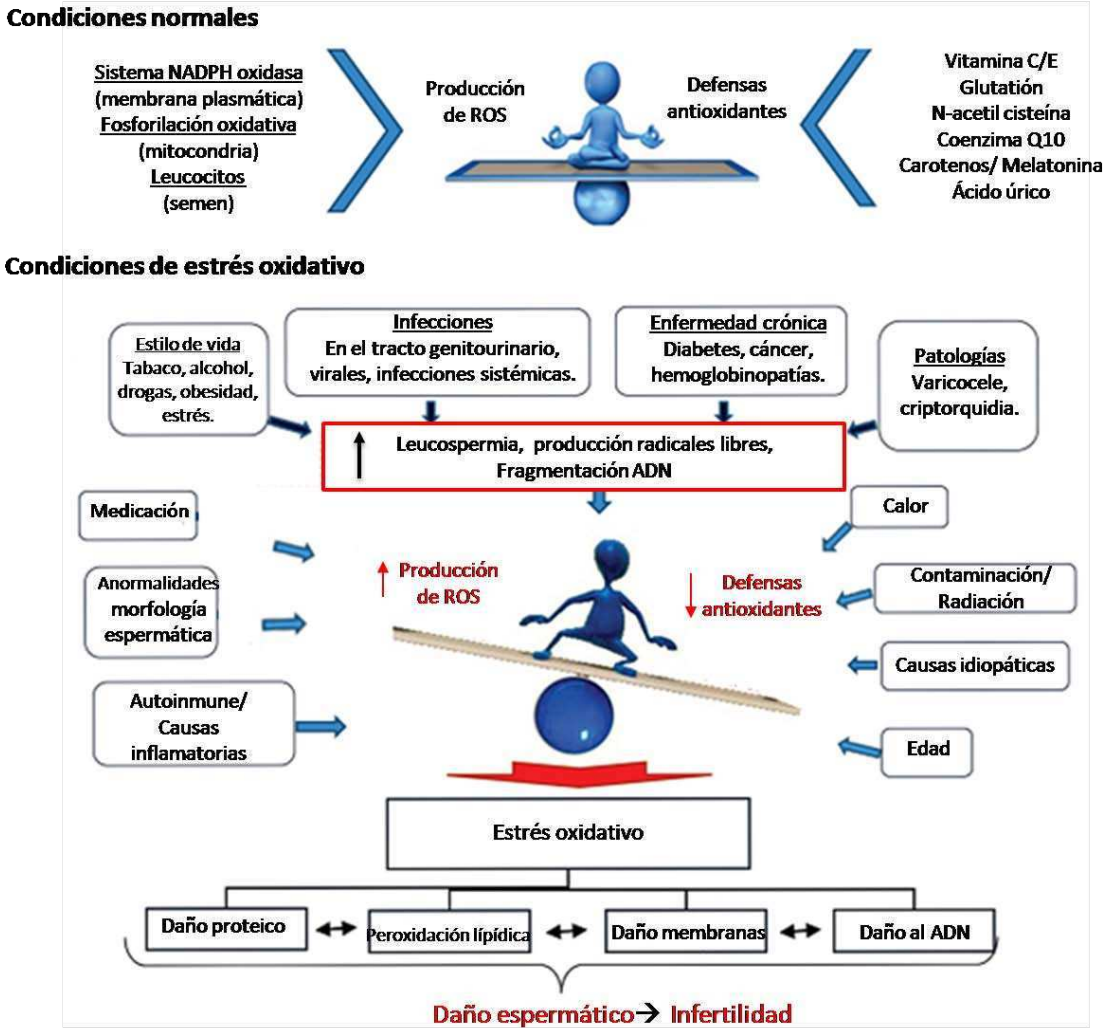


Figura 22. Causas que conducen al estrés oxidativo. *En el esquema se representan los principales mecanismos por los cuales se producen las ROS de manera natural o en condiciones adversas.* ***NADPH:*** *nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida;* ***G6PD:*** *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (D. R. P. Tulsiani et al. 1998)*

Muchos estudios han indicado la existencia de una conexión entre el estrés oxidativo y el daño en el ADN (Cummings & Thorgaard 1994; Twigg et al. 1998; Donnelly et al. 1999). De hecho, el estrés oxidativo parece ser la mayor causa de daño del ADN en la línea germinal masculina (Saleh et al. 2003; Aitken & Sawyer 2003; Aitken et al. 2003). El daño podría ocurrir a nivel del testículo, del epidídimo o post-eyaculación. Algunos cortes en el ADN podrían ser necesarios para reducir el estrés debido a la torsión que ocurre cuando se producen los cambios en la estructura terciaria del ADN, al reemplazar las histonas por las protaminas en las espermátidas elongadas (Balhorn 1982; McPherson & Longo 1992; Sakkas et al. 1995) De todas maneras, si estos cortes temporarios no se reparan por una excesiva actividad de la topoisomerasa II o una deficiencia de los inhibidores de esta enzima (Morse-Gaudio & Risley 1994; Bizzaro et al. 2000) se incrementa la susceptibilidad de los espermatozoides eyaculados a la desnaturalización y la fragmentación del ADN. De la misma manera, si no se produce

una correcta oxidación de los tioles a puentes disulfuro durante el transito epididimario, el ADN se torna más vulnerable al daño. En un estudio reciente en el que se investigó la relación de mecanismos hipotéticos responsables de la fragmentación del ADN espermático, se descubrió que la mayor causa de rupturas de ADN es un proceso de apoptosis, probablemente disparado por la deficiencia en la maduración de la cromatina en el testículo y el estrés oxidativo durante el tránsito por el tracto genital masculino (Muratori et al. 2015). Las enzimas que generan ROS en los espermatozoides todavía no fueron caracterizadas, pero se sabe que son varias (Baker & Aitken 2004). Por ejemplo, en los espermatozoides de rata, las mitocondrias dejan escapar electrones que son responsables de la generación de una proporción de los ROS detectados en los mismos (Vernet et al. 2001). Por otra parte, la línea germinal masculina posee sistemas de NADPH oxidasa (NOX5) que es potencialmente capaz de generar ROS en presencia de calcio y NADPH (Aitken 1997; Bánfi et al. 2001). Otros posibles sistemas de ROS en espermatozoides de mamíferos incluyen la lipooxigenasa (Oliw & Sprecher 1989) tNOX (Aitken et al. 2003) y la citocromo p450 reductasa (Baker et al. 2004). Asimismo, los espermatozoides poseen óxidorreductasas, que son capaces de generar compuestos xenobióticos involucrados en la formación de ROS durante el ciclo redox (Aitken et al. 2003). Esta actividad podría ser inducida por una variedad de sustancias químicas, incluyendo tóxicos ambientales de varias clases, que podrían contribuir así a la generación de ROS y al daño del ADN *in vivo* (Anderson et al. 2003).

Los componentes con características de disrupción endocrina que pueden producir efectos adversos en la reproducción humana son de especial preocupación, dado que interfieren con el desarrollo y el funcionamiento de las hormonas sexuales y los procesos tales como la producción de espermatozoides y la ovulación (Varghese et al. 2008; Bretveld et al. 2006). La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que un desorganizador endocrino es una mezcla o una sustancia exógena que altera la función del sistema endocrino y en consecuencia causa efectos adversos sobre la salud de un organismo intacto, o su progenie o (Sub) poblaciones. Los sistemas fisiológicos afectados por un desorganizador incluyen a todos los sistemas hormonales relacionados con el desarrollo y la función de los órganos reproductivos, y también enfermedades de los adultos, tales como la diabetes o enfermedades cardiovasculares (Maqbool et al. 2016). Antecedentes en la literatura sostienen que los desorganizadores endocrinos, especialmente los contaminantes sintéticos estrogénicos (xenoestrógenos), son factores que tienen cierta responsabilidad en la reducción de los parámetros espermáticos, así como también de otras afecciones tales como la criptorquidia, las hipospadias y el cáncer testicular (Campion et al. 2012; Rouiller-Fabre et al. 2014; Svechnikov et al.). Los químicos son una parte importante de la vida moderna y las poblaciones silvestres y humanas no pueden evitar estar en contacto con algunos productos químicos, tales como aquellos empleados en la producción de alimentos, el control de patógenos y la generación de productos modernos. Se manejan diversas hipótesis relativas al mecanismo de acción de los

desorganizadores endocrinos, pero todavía es difícil llegar a un consenso acerca de sus formas de acción y efectos. Sumado a que los estudios realizados en animales de laboratorio no pudieron aportar información adecuada relacionada con al rango de efectos que se le pueden atribuir a la exposición a los desorganizadores endocrinos *in útero*, la variedad de concentraciones utilizadas en los ensayos experimentales por distintos grupos, hace difícil relacionar los resultados con las observaciones en humanos. No se conocen con certeza las concentraciones de desorganizadores endocrinos representativas de la exposición fetal. Existen varios factores que hacen compleja la evaluación de estos tóxicos, tales como la gran cantidad de agentes químicos que son desorganizadores endocrinos, la capacidad de estos compuestos químicos de bioacumularse en los lípidos del cuerpo y el metabolismo de los mismos en el organismo. A pesar de los esfuerzos realizados para conocer el mecanismo de acción de los desorganizadores, sus efectos todavía son desconocidos. Estas preguntas sólo podrán resolverse combinando estudios *in vitro* en humanos con estudios *in vivo* en animales experimentales. Asimismo, no hay suficiente información obtenida en animales que pruebe el efecto de los desorganizadores hormonales sobre el desarrollo y la función masculina. Es necesario desarrollar estrategias que permitan, al menos, prevenir la decadencia del sistema reproductor femenino y masculino ante la exposición a estos tóxicos (Murray et al. 2001).

Endosulfán

La exposición de hombres o mujeres a ciertos plaguicidas en determinadas dosis podría incrementar el riesgo de anormalidades reproductivas tales como, disminución de la fertilidad, un déficit en niños de sexo masculino, abortos espontáneos, defectos de nacimiento o retardo en el crecimiento. Los plaguicidas utilizados en los lugares de trabajo o por exposición ambiental se incorporan a la leche materna. Algunos plaguicidas se relacionaron con problemas en el desarrollo neurológico o con alteraciones de la función de células del sistema inmune y posiblemente también con la leucemia infantil. En ensayos epidemiológicos se observó que la exposición a mezclas de plaguicidas utilizados en lugares de trabajo, se relaciona con efectos nocivos para la reproducción y el desarrollo, sobre todo cuando no se usa la protección adecuada. Cada clase de plaguicida tiene al menos un agente capaz de afectar la reproducción o el desarrollo en animales de laboratorio o personas, incluyendo los organofosforados, carbamatos, piretroides, herbicidas, fungicidas, fumigantes y especialmente los organoclorados. Muchos de los plaguicidas más peligrosos fueron prohibidos o restringidos en los países desarrollados, pero todavía se producen altas exposiciones a estos plaguicidas en los países más pobres del mundo, o por los efectos residuales, o por la continuada utilización hasta terminar los productos ya acumulados en los depósitos. Los equipos requeridos para utilizar estas sustancias tales como la

ropa protectora, máscaras y guantes son difíciles de tolerar en climas cálidos o húmedos y puede ser que no estén disponibles o que no puedan ser costeados. Aquellos pacientes que fueron orientados acerca de los efectos de los plaguicidas en la reproducción y el desarrollo, a menudo son asesorados en cuanto a los niveles de exposición, balance de costos y beneficios, así como también a adoptar prácticas para reducir o eliminar las dosis absorbidas. Los pacientes pueden no darse cuenta que, una vez que acuden a la primera visita prenatal, la mayoría de los efectos deletéreos sobre la organogénesis ya han ocurrido. Los planes a futuro son mejorar la posibilidad de disminuir el riesgo a los plaguicidas y de remediar estos efectos antes de la concepción (Frazier 2007).

El endosulfán (6, 7, 8, 9, 10, 10–hexachloro–1, 5, 5a, 6, 9,9a–hexahydro–6, 9–methano–2, 4, 3–benzodioxathiepin– 3–oxido), es un plaguicida perteneciente a la familia de los organoclorados, patentado en 1956 (Ware, 1994) (Figura 23). El endosulfán es un insecticida de amplio espectro que fue usado extensivamente en una variedad de cereales, por más de 30 años. La forma pura del endosulfán es una mezcla de dos estereoisómeros, endosulfán- α y β, en una proporción 7:3. Este plaguicida es extremadamente tóxico en peces e invertebrados y se lo responsabiliza de causar toxicidad en las gónadas, genotoxicidad y neurotoxicidad así como también disrupción endocrina (US EPA2002). Es liberado a la atmósfera a través de deriva de aerosoles ("spray drift"), volatilización posterior a la aplicación y erosión de partículas de suelo por el viento. En la naturaleza, es transformado en endosulfán sulfato, que es un metabolito tóxico y persistente (Kataoka & Takagi 2013), pero puede ser eliminado de la tierra contaminada por medio de la biodegradación. Algunos microorganismos pueden degradar endosulfán sin producir endosulfán sulfato, y otros pueden degradar este último metabolito una vez que ha sido producido. Tanto el endosulfán como el endosulfán sulfato fueron incluidos en la lista de contaminantes orgánicos persistentes en la Convención de Estocolmo que se realizó en abril del 2011. Todavía se puede encontrar endosulfán presente en el campo porque fue utilizado ampliamente hasta hace relativamente poco, y tiene una vida media de 60 días en el caso del endosulfán-α y de unos 800 días en el caso del endosulfán –β (Stewart & Cairns). Es un contaminante capaz de causar muchos problemas ambientales; a pesar de que sus componentes fueron prohibidos en muchos países, los residuos todavía son detectados en campos de soja luego de mucho tiempo de haber sido aplicado. En un estudio se reportó que la vida media de los residuos tóxicos combinados (endosulfán plus y endosulfán sulfato) se encuentra entre los 9 meses y los 6 años (US EPA 2002). El endosulfán está sujeto a transporte atmosférico de largo alcance. Por ejemplo, un reporte de 2008 del Servicio Nacional de Parques, señaló que el endosulfán comúnmente contamina aire, agua, plantas y peces de Parques Nacionales en los EE. UU; la mayoría de estos parques están lejos de las áreas donde se usa el endosulfán (Western Airborne Contaminants Assessment Project, National Parks Service).

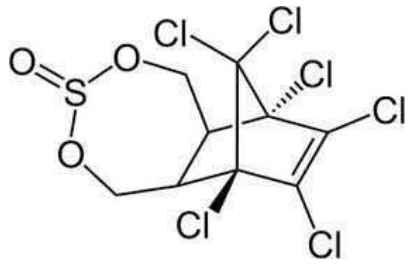


Figura 23. Estructura molecular del plaguicida endosulfán. *Esqueleto carbonado de la molécula 6, 7, 8, 9, 10, 10–hexachloro–1, 5, 5a, 6, 9,9a–hexahydro–6, 9–methano–2, 4, 3–benzodioxathiepin– 3–oxido.*

Uno de los principales y más conocidos efectos del endosulfán es su acción bloqueadora del canal de Cl^- asociado al receptor GABA en las neuronas del sistema nervioso central, actuando como un antagonista del mismo (Lawrence & Casida 1984). Como consecuencia de la entrada de Cl^- a la célula, GABA no puede unirse a su receptor y entonces se dispara una respuesta descontrolada de excitación en las células (Silva & Gammon 2009). Se han estudiado ampliamente sus efectos sobre el sistema nervioso central y su relación con el déficit neurofisiológico observado en niños, adolescentes y adultos. Hay evidencia que sostiene que la exposición a este plaguicida altera la expresión de proteínas asociadas a neurotransmisión en la corteza frontal (Cabaleiro et al. 2008). Por otro lado, se conoce que las sustancias químicas, como es el caso de los plaguicidas, pueden afectar el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal que a su vez regula el sistema reproductor en animales vertebrados (Coskun et al. 2012; Ozen et al. 2012). En el caso particular del endosulfán, se ha descubierto que produce problemas reproductivos en diversos modelos animales. Varios estudios realizados utilizando ratas como modelo experimental, sostienen que el endosulfán afecta a las células de Sertoli, disminuye el peso de los testículos, e inhibe la espermatogénesis y la esteroidogénesis (Aly & Khafagy 2014; Choudhary & Joshi 2003; Jaiswal et al. 2005; Rao et al. 2005; Rastogi et al. 2014). Cuando se utilizaron ratones como modelo experimental se encontraron los mismos desórdenes frente a la exposición al endosulfán, confirmando los efectos vistos en rata (Popov et al. 1998; Ren et al. 2008; Wilson & LeBlanc 1998; Xu et al. 2015). También, estudios realizados por Sinha y colaboradores (Sinha et al. 2001) demostraron que el plaguicida conduce a una disminución en la producción espermática diaria y a un incremento de los espermatozoides anormales y a actividad anormal de enzimas marcadores de testículo, tanto en ratas inmaduras como en ratas maduras. Se han utilizado células testiculares, principalmente co-cultivos de células de Sertoli, para investigar los mecanismos por los cuales los tóxicos ejercían su efecto. Si la cooperación metabólica que existe entre las células de Sertoli y las células germinales se ve afectada por alguna perturbación, es posible que conduzca a disfunción testicular. Los cambios citotóxicos inducidos por

endosulfán (0, 2, 20, 40, y 80 mM) en cultivos mixtos de células de Sertoli y células madre luego de 24 y 48 h de tratamiento, produjeron una mayor separación de las células madre de las células de Sertoli, en una forma dependiente de la dosis y también una disminución en la viabilidad de ambos tipos celulares (Sinha et al. 1999). Por otro lado, estudios realizados con el fin de analizar el efecto del endosulfán sobre la reacción acrosomal, demostraron que el plaguicida inhibe fuertemente la reacción acrosomal iniciada por progesterona o glicina en espermatozoides humanos (Turner et al. 1997).

El endosulfán actúa uniéndose a los receptores de estrógenos (Wozniak et al. 2005), como muchos otros xenoestrógenos que ejercen sus efectos a través del receptor de estrógenos unido a membrana e induciendo un ingreso de calcio que termina en la malformación de tejidos, cáncer y otros disturbios. También demostró tener efectos en chicos en edad puberal, disminuyendo su tiempo de madurez y afectando sus genitales y caracteres sexuales secundarios (Fernandez et al. 2007; Roy et al. 2009). Estudios poblacionales en diversas partes del mundo demostraron una tendencia al desarrollo temprano de la pubertad. Además, estudios epidemiológicos en los que se investigó la relación entre el desarrollo puberal y la exposición al endosulfán, revelaron asociaciones entre la exposición perinatal y postnatal, también observadas en estudios realizados en animales de laboratorio (Milesi et al. 2012; Milesi et al. 2015). Los estudios en animales de experimentación apoyan estos descubrimientos y apuntan a distintos mecanismos endocrinos regulatorios asociados al desarrollo puberal, en el periodo perinatal y en el pre-puberal (Soto et al. 1994; Schoeters et al. 2008; Alyea & Watson 2009). En experimentos en los que se utilizaron ratas como modelo experimental, el plaguicida redujo los niveles circulantes en plasma de las hormonas FSH, LH y testosterona (Singh & Pandey 1990; Wade et al. 1997).

Debido a la solubilidad lipídica y la resistencia a ser metabolizados, algunos plaguicidas organoclorados se acumulan en tejidos humanos. La exposición ambiental a un solo químico durante un largo periodo es rara. Sin embargo, un grupo de autores fue capaz de evaluar una población de Kerala, India, que estuvo expuesta durante 20 años a la fumigación aérea de endosulfán solamente. Cuando se estudió esta población, se encontró un retraso en la pubertad de varones indios asociado a una alta exposición al plaguicida, en comparación con chicos que vivían en zonas no contaminadas. Los valores séricos de endosulfán encontrados en niños de un pueblo contaminado eran de alrededor de 7,6 ng/g comparado con 1,4 ng/g en niños control (Saiyed et al. 2003). La región más grande de España destinada a la agricultura es la costa del Mediterráneo en el sur del país. Allí se detectaron concentraciones considerables de endosulfán I o II, o de sus metabolitos endosulfán-diol o endosulfán sulfato, en muestras de tejido adiposos o sangre de mujeres que vivían en zonas expuestas al endosulfán (Botella et al. 2004). De la misma manera, Carreño reportó que el endosulfán-diol fue el metabolito detectado con mayor frecuencia en mujeres (92%) y en hombres (70%) del

sur de España, seguido por el endosulfán-sulfato (Carrenõ et al. 2007). Además, cuando se evaluaron muestras de placenta de mujeres de la misma zona, también se encontraron residuos de endosulfán o sus metabolitos en las muestras (Lopez-Espinosa et al. 2007). Varios estudios recientes indicaron la existencia de endosulfán en distintas zonas del planeta (M. Y. Y. Chen et al. 2015; Fang et al. 2015; Huang et al. 2014; Papadakis et al. 2015) tales como África (Sun et al. 2016), el Himalaya (Devi et al. 2015) e inclusive Argentina (Astoviza et al. 2016; Butinof et al. 2015), así como también de sus residuos en la población de Europa (Ulutaş et al. 2015) e India (Sharma et al. 2015).

Durante los últimos años, varios grupos investigaron el efecto del endosulfán sobre el estado redox de las células. Algunos reportes sugieren que el plaguicida induce estrés oxidativo y apoptosis en las células espermáticas mediante las vías mitocondrial y no mitocondrial (Wang et al. 2012a; Xu et al. 2015). Otros autores también demostraron que el endosulfán produce peroxidación de los lípidos y daño oxidativo en testículo de rata (Sinha et al. 2001; Pal et al. 2009), afectando la función reproductiva. Como mencionamos antes, las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GSH-PX de testículo actúan como "scavengers" (basureros) de las especies reactivas del oxígeno y juegan un papel muy importante en mantener "normales" a las células espermatogénicas. Es por esto que, dado que es sabido que la vitamina E incrementa la actividad de estas enzimas antioxidantes y reduce la acumulación de radicales libres producida por el plaguicida, se la ha utilizado en varios estudios con el fin de revertir su efecto (Wang et al. 2012a; Takhshid et al. 2012). Lo mismo ha sucedido con la vitamina C, que ha sido utilizada en varios estudios con el fin de evaluar si es capaz de mitigar los efectos del endosulfán (Takhshid et al. 2012; Ozmen & Mor 2012; Ozmen & Mor 2015).

Queda claro, entonces, que el endosulfán es un Contaminante Orgánico Persistente (COP), que tiene alta capacidad de bioacumulación y alta persistencia en el ambiente, generando graves desórdenes mentales y fisicos. En nuestro país, el Ministerio de Salud de la Nación ha manifestado que "*…el Endosulfán, tiene propiedades carcinogénicas para los seres humanos, especialmente en los casos de exposición crónica…",* que *"…además, provoca alteraciones neurológicas que pueden asociarse con daños cerebrales permanentes, manifestándose con deterioro cognitivo y emocional, daños en la memoria y afección visual. También afecta el sistema inmunológico; tiene efectos adversos sobre el sistema reproductivo masculino, los riñones y el hígado; puede provocar hipotiroidismo y daña los glóbulos rojos sanguíneos*…" Como consecuencia de sus efectos y de lo establecido en el Convenio de Rotterdam, el SENASA por medio de la Resolución 511/ 2011, en su Artículo I resolvió prohibir, a partir del 1 de julio de 2012, la importación del principio activo Endosulfán y de sus productos formulados; asimismo en el Artículo II resolvió prohibir a partir del 1° de julio de 2013 la elaboración, formulación, comercialización y el uso de los productos que contengan el principio activo Endosulfán. Sin embargo, dada la eficiencia de la

acción de este plaguicida y su efectividad contra una amplia gama de insectos así como también a la persistencia del endosulfán en el ambiente, es probable que su uso haya sido y sea mantenido en el tiempo hasta encontrar un reemplazo efectivo. Como consecuencia de esto, y de todos los efectos perjudiciales reportados sobre el sistema reproductor de los vertebrados, consideramos de extrema importancia evaluar el mecanismo de acción del endosulfán y su efecto sobre la cromatina de los espermatozoides, que aún es desconocido.

Etanol

Así como sucede con el endosulfán, los mecanismos de daño que se asocian a los efectos reproductivos por consumo de etanol en el macho, tampoco están del todo comprendidos. El abuso en el consumo de alcohol puede producir una variedad de disturbios médicos, psicológicos o físicos que identifican al alcohol como uno de los mayores problemas de la sociedad moderna. El etanol, puede afectar el sistema reproductivo en tres niveles: sistema hipotálamo-hipofisario-gonadal, glándulas endocrinas y hormonas (Anderson 1981; Gabriel et al. 1998; Zhang et al. 2005; Lan et al. 2006). Perturba los sistemas de transducción de señales, el control de la proliferación celular, la concentración de calcio intracelular, la expresión proteica e interfiere con los eventos de diferenciación.

El equilibrio en la concentración de etanol en un tejido depende del contenido relativo de agua en ese tejido, es decir del contenido de agua, la velocidad de flujo sanguíneo y la masa de tejido. El etanol es prácticamente insoluble en grasas y aceites, aunque al igual que el agua, puede atravesar las membranas biológicas. Se distribuye desde la sangre hacia todos los tejidos y fluidos en proporción a su contenido de agua relativo. La concentración de etanol en un tejido depende del tejido y alcanza el equilibrio rápidamente con la concentración de etanol en plasma. No hay proteínas del plasma que se unan al alcohol (Cederbaum 2012).
La concentración de alcohol en sangre está determinada por la cantidad de alcohol consumida y por la presencia o ausencia de comida en el estómago; estos dos factores afectan el vaciado gástrico y la tasa de oxidación del alcohol.

Una parte del etanol que es ingerido no ingresa a la circulación sistémica, pero es oxidada en el estómago por isoformas de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) como la σADH y la ADH clase I y clase II. La ADH es una enzima que contiene zinc y consiste en dos subunidades de 40 KDa cada una. Se encuentra en altas cantidades en el hígado, seguido por el tracto gastrointestinal, los riñones, la mucosa nasal, los testículos y el útero. Existen múltiples formas de ADH en el hígado. Este primer paso metabólico podría modular la toxicidad del etanol, dado que su eficiencia determina la biodisponibilidad del mismo. El etanol pasa rápidamente del estómago al duodeno cuando el estómago está vacío. Esto minimiza el primer paso metabólico,

contribuyendo al aumento de la concentración del etanol en sangre que se observa en el estado de ayuno, comparado con el estado de alimentación.
La principal enzima responsable de la oxidación del alcohol, la ADH, está presente en el hígado, al igual que (aunque en menor medida) el sistema oxidante de etanol citocromo P450. El etanol es un nutriente que tiene valor calórico. Sin embargo, a diferencia de los carbohidratos y las grasas, que pueden ser almacenados y utilizados cuando son necesarios, el etanol no es almacenado y permanece en el agua del cuerpo hasta que es eliminado.
Mientras que el metabolismo de la mayoría de los nutrientes se encuentra bajo control hormonal, generalmente hay poca regulación hormonal que pueda marcar el ritmo de la eliminación del etanol. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el hígado tiene una mayor responsabilidad para oxidar el alcohol y removerlo del cuerpo.
Los animales con pequeño peso corporal metabolizan el etanol a velocidades mayores que los animales más grandes, la velocidad de eliminación del etanol en ratón es 5 veces mayor que la velocidad en humanos. Estas tasas de metabolización de etanol se correlacionan con la tasa metabólica basal de esa especie, indicando que la capacidad de oxidar el etanol es paralela a la capacidad de oxidar los nutrientes típicos. De todas maneras, es importante resaltar que las calorías derivadas del etanol se producen a expensas del metabolismo normal de los nutrientes, ya que se oxida preferencialmente antes que otros nutrientes (Salaspuro & Lieber 1978; Morgan & Levine 1988; Lieber 1991; Addolorato et al. 1997). Los animales muy jóvenes tienen velocidades de eliminación de etanol muy bajas porque la ADH (y la CYP2E1) no están expresadas completamente. El hígado fetal elimina etanol muy pobremente, lo que podría estar involucrado con el síndrome de alcoholismo fetal (FAS, del inglés "*Fetal Alcohol Syndrome*"). Hay cierta disminución en la eliminación del etanol con el envejecimiento, probablemente debido a una menor masa en el hígado o contenido de agua. La velocidad de eliminación del etanol es mayor en las mujeres cuando la misma se correlaciona con la masa corporal. Debido a que las mujeres tienen pequeño tamaño corporal y como consecuencia, poca masa corporal magra; la eliminación de etanol por unidad de masa corporal es mayor en las mujeres. Los hombres y las mujeres generalmente tienen tasas de eliminación de etanol similares cuando se expresan los resultados como g/hr o g/l de volumen del hígado. A causa del primer paso del metabolismo en el estómago, es posible que una dosis dada de etanol pueda producir una mayor concentración en hembras que en machos (Cole-Harding & Wilson 1987; Norberg et al. 2003; Baraona et al. 2001).

Como se mencionó antes, el primer paso del metabolismo del etanol es catalizado por la enzima ADH (Figura 23), que está ampliamente presente en el hígado, y forma parte de una familia de isoformas. Se requiere un cofactor, NAD^+, para aceptar los equivalentes reducidos del etanol. Como resultado, el etanol es oxidado a su producto acetaldehído y el cofactor NAD^+ es reducido a $NADH+H^+$. La reacción de la ADH es reversible. El segundo paso es catalizado por la enzima aldehído deshidrogenasa

(ALDH). El acetaldehído es oxidado a acetato; el cofactor NAD^+ es reducido a NADH. La reacción mediada por la ALDH es esencialmente irreversible. La mayoría del acetaldehído producido por la oxidación del etanol es reoxidado a acetato en el hígado; los valores circulantes de acetaldehído son bajos en condiciones normales. La mayoría del acetato producido abandona el hígado y circula hacia los tejidos periféricos donde es activado a acetilCoA, que es también un metabolito clave producido por la mayoría de los nutrientes, carbohidratos, grasas y proteínas en exceso. Debido a que las reacciones de las enzimas ADH y ALDH reducen NAD+ a NADH, la proporción redox $NAD^+/NADH^+$ disminuye en el citosol. Esto tiene efectos importantes en otras vías metabólicas que requieren NAD^+ o son inhibidas por NADH. Como la reacción catalizada por la enzima ALDH se produce en las mitocondrias, la proporción NAD^+/ NADH también disminuye allí.

El citocromo P450 es una familia de enzimas hemo que están involucradas en la oxidación de esteroides, ácidos grasos y numerosos xenobióticos ingeridos desde el medio ambiente. CYP2E1 es miembro del citocromo P450 y tiene la actividad máxima de oxidación de etanol a acetaldehído. Además del etanol, CYP2E1 puede oxidar otros componentes incluyendo la acetona, el benceno y otros alcoholes. La catalasa, una enzima que utiliza el grupo hemo como cofactor, se encuentra en los peroxisomas y es un importante antioxidante, ya que cataliza la remoción del H_2O_2, pero también puede oxidar al etanol. Esta vía está limitada por las bajas concentraciones de H_2O_2 producidas en condiciones fisiológicas y parece tener un rol insignificante en la oxidación del etanol en el hígado.

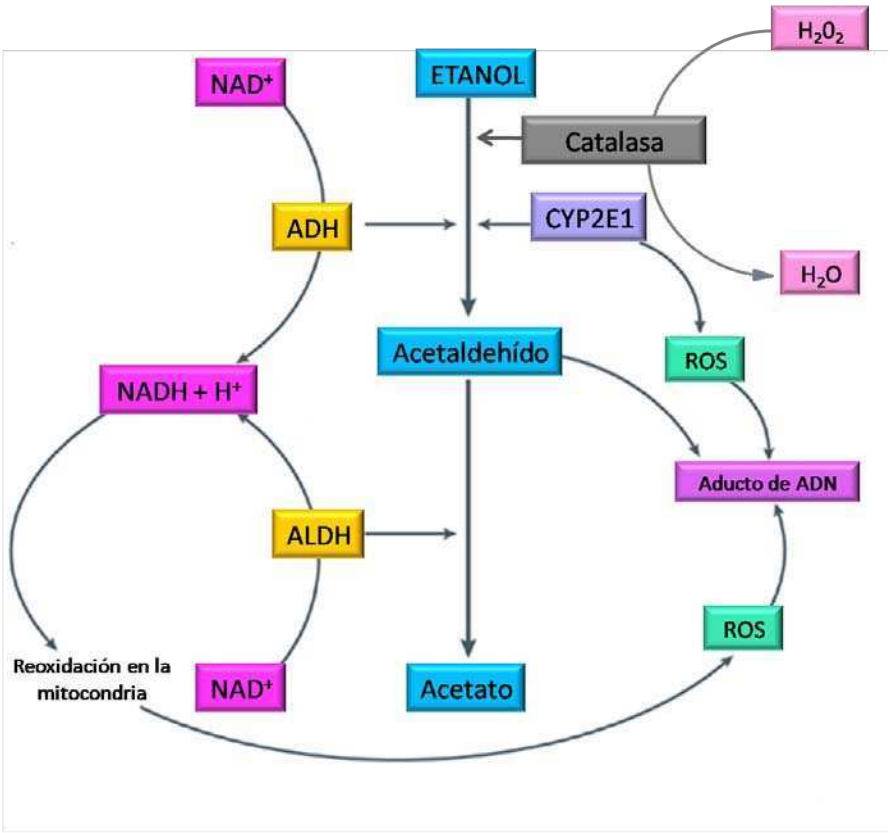


Figura 24. Representación esquemática de las vías de metabolización celular del etanol. *El Etanol es metabolizado a acetaldehído por medio de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), el citocromo P450 2E1 (CYP2E1) y la catalasa en una menor medida. El acetaldehído, a su vez, es oxidado a acetato mediante la actividad de la enzima acetaldehído deshidrogenasa (ALDH). El metabolismo del alcohol mediado por la ADH resulta en la generación de los equivalentes reducidos en la forma de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y acetaldehído, mientras que la oxidación por CYP2E1 conduce a la producción de acetaldehído, pero también a la generación de ROS. El consumo crónico de alcohol incrementa la actividad de CYP2E1 y como consecuencia aumenta aún más la producción de ROS. NADH es reoxidado a NAD^+ en la mitocondria, lo que también incrementa la producción de ROS. Además, el acetaldehído puede unirse al ADN, formando aductos estables con éste; las ROS resultan en productos de la peroxidación y peroxidación lipídica tales como el MDA que también puede unirse al ADN formando aductos. La oxidación del etanol por acción de la catalasa parece ser de importancia secundaria. Modificado de (Seitz & Stickel 2007).*

Existen cerca de 4000 trabajos publicados que confirman la teratogenicidad del etanol y no hay evidencia de que el etanol sea benéfico para el desarrollo embrionario o fetal. La teratogenicidad fue demostrada de manera indiscutida en la clínica, y en estudios epidemiológicos y comportamentales. Los efectos teratogénicos indiscutibles incluyen retardo mental y un espectro de anormalidades en el desarrollo y el comportamiento, así como también, bajo peso al nacer (Streissguth et al. 1980). La más severa de las manifestaciones teratogénicas de la *exposición* fetal al etanol causa un conjunto de alteraciones fisiológicas y neurofisiológicas permanentes en la descendencia, y se denomina síndrome de alcoholismo fetal (FAS, del inglés "*Fetal Alcohol Syndrome*"), cuadro patológico descripto en 1973 por Jones y Smith (1973) y observado por primera vez por Lemoine y colaboradores en 1968, a partir un patrón común de defectos al

nacimiento hallados en 127 niños nacidos de madres alcohólicas en Francia (Hill et al. 1989). Estimaciones realizadas en todo el mundo indican que al menos el 1% de los nacimientos son afectados por el consumo de alcohol prenatal, y el alcohol es una de las principales causas evitables de defectos en el nacimiento y el desarrollo (May & Gossage 2001). El tiempo y la cantidad de exposición no pueden explicar la variabilidad entre los distintos individuos afectados, lo que sugiere que la vulnerabilidad fetal estaría relacionada a la variabilidad genética. De todas maneras, no se conoce todavía si los aspectos de la vulnerabilidad del feto dependen de la madre, el padre o ambos. Mientras que los posibles efectos del consumo de alcohol en hembras durante la gestación están ampliamente documentados y comprendidos (Larkby & Day 1997; Marjonen et al. 2015), los efectos potenciales del consumo de alcohol paterno previo a la concepción sobre el feto en desarrollo están muy poco aclarados en la literatura. Si bien no se conocen aún los mecanismos por los cuales la exposición paterna al alcohol puede teóricamente afectar al feto, se cree que podrían producirse a nivel del ADN. La literatura reciente sugiere que estarían relacionados con mecanismos epigenéticos heredables, sobre los que podrían actuar los factores ambientales. Los cambios epigenéticos en el ADN inducidos por el alcohol podrían ser responsables de los efectos transgeneracionales como consecuencia del abuso de alcohol (Knezovich et al. 2012). Experimentos realizados en ratones, demostraron que la exposición crónica al etanol afecta la metilación de genes con impronta genética ("imprinting") en sus espermatozoides, alteración que será transmitida a sus crías, provocando desórdenes mentales (Liang et al. 2014). Estos cambios en la impronta genética a través de la metilación de genes estarían relacionados con los efectos teratogénicos causados por el alcohol (Stouder et al. 2011). Aún concentraciones de etanol que no inhiben el crecimiento embrionario pueden producir anomalías genético-cromosómicas (Kaufman, 1997) en las gametas, posibilitando efectos genotóxicos de línea somática, como fue demostrado recientemente por el incremento de la frecuencia de micronúcleos en médula ósea de ratón luego de la exposición paterna y materna prolongada a etanol (Cebral et al. 2011). Es difícil comparar entre estudios, ya que tanto las poblaciones estudiadas como el consumo de etanol varían considerablemente entre los mismos (Jensen et al. 2014). Así también es la variación que existe en el grado de sensibilidad de los distintos órganos a los efectos teratogénicos del etanol. Los factores críticos son el tiempo de exposición durante el periodo prenatal y la dosis y frecuencia de exposición (Cook et al. 1987; Zajac & Abel 1992; Zhang et al. 2005). Estudios recientes sobre el efecto del alcohol sobre la condensación de la cromatina y la integridad del ADN de espermatozoides de rata, demostraron el efecto nocivo del alcohol sobre los parámetros espermáticos, así como también efectos negativos sobre la integridad del ADN y el remodelamiento de la cromatina, sugiriendo que el etanol podría inducir la apoptosis de los espermatozoides. Por lo tanto, según estos autores, el abuso de alcohol resultaría en la producción de espermatozoides con una cromatina menos compacta, lo cual sería una

de las posibles causas de infertilidad asociada al consumo de alcohol (Rahimipour et al. 2013; A. R. Talebi et al. 2011). Además, distintos estudios sugieren que el alcohol aumenta el estrés oxidativo en los espermatozoides de animales intoxicados (Harikrishnan et al. 2013; Maneesh et al.).

Cuando se analizaron los parámetros espermáticos de hombre consumidores crónicos de alcohol que presentaban oligozoospermia, se observó un deterioro en la concentración espermática, en la motilidad progresiva y en la morfología normal. De todas maneras, estas alteraciones no resultaron ser significativas cuando se las comparó con los controles (Kumar et al. 2014). El consumo moderado de alcohol no parece ejercer mayores perturbaciones; pero contrariamente, los alcohólicos crónicos sufren los efectos en la reducción de la concentración de sus espermatozoides y los niveles de testosterona (Shayakhmetova et al. 2014). El etanol afecta a los testículos y a los espermatozoides mediante un mecanismo de peroxidación lipídica (Siervo et al. 2015). Se encontró que consumidores de alcohol crónicos poseen los túbulos seminíferos con espermátidas degeneradas y presentan consecuente azoospermia. En un estudio reciente en el que se compararon los efectos del consumo ocasional de alcohol con respecto a un consumo agudo de alcohol durante la semana previa al estudio, se descubrió que los pacientes infértiles que tomaban alcohol diariamente presentaban un semen de peor calidad, así como características hormonales significativamente peores que los grupos que consumían alcohol ocasionalmente (Jensen et al. 2014).

Los efectos del consumo de alcohol sobre la función reproductiva masculina permanecen bajo discusión a pesar de todos los estudios que sostienen el efecto perjudicial del alcohol sobre la línea germinal, el desarrollo testicular, los parámetros seminales, y la fecundación (Anderson et al. 1989; Caires et al. 2012; Cebral et al.; Hirai 1988; Jang et al. 2011; Liang et al. 2015). Dadas las similitudes entre los espermatozoides humanos y los de ratón y la ausencia de información relacionada con los efectos del etanol sobre la estructura de la cromatina del espermatozoide, elegimos como modelo experimental espermatozoides de ratón para evaluar los mismos.

Hipótesis

La descondensación de la cromatina del espermatozoide, una vez producida la penetración del oocito, es fundamental para una correcta singamia. Las técnicas de reproducción asistida han demostrado que muchas anomalías espermáticas pueden ser solucionadas, o pasadas por alto, pero no así los defectos en la descondensación cromatínica. De este modo, el proceso de descondensación representa un punto de regulación muy importante para una fecundación eficaz. Por lo tanto, consideramos que el mismo constituye un buen indicador de los efectos de tóxicos ambientales o desorganizadores endocrinos sobre la reproducción.

Objetivo principal

Estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la descondensación de la cromatina del núcleo del espermatozoide de ratón, relacionando los agentes tiorreductores y "aceptores" de protaminas y evaluar el impacto de tóxicos sobre este evento.

Objetivos específicos

1- Capítulo 1: Estudiar el detalle molecular del proceso de descondensación cromatínica en espermatozoides de ratón.

2- Capítulo 2: Analizar el efecto del etanol y del plaguicida endosulfán (puro y formulado) sobre la descondensación de espermatozoides de mamíferos.

1. ANIMALES

Se utilizaron ratones de la cepa CF-1 endocriados y sexualmente maduros, provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, Argentina. Los experimentos fueron llevados a cabo respetando el Reglamento para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (Res CD141/00). Además, se utilizaron ratones híbridos de la generación F1 resultantes del apareo entre machos BALB/C y hembras C57, criados en el Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET). Los procedimientos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética del IByME. Los animales fueron hospedados en jaulas, agrupados de a 3 ó 4 animales del mismo sexo, recibieron alimento "Balanceado Cooperación Rata-Ratón" (Asociación Cooperativas de Alimentos S.A., Buenos Aires, Argentina) y agua *ad libitum;* y se criaron a una temperatura de 20°C ± 2°C con períodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. El cuidado y la manipulación de los animales se realizaron respetando las Guías Institucionales y las Guías de Principios Sobre Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, auspiciada por el NIH (última edición publicada por National Academy Press, USA, 1996).

2. RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES Y CAPACITACIÓN

Para recuperar espermatozoides del cauda epididimario, se sacrificaron ratones macho por tracción cervical, se extrajeron rápidamente ambos epidídimos y se transfirieron a una placa de Petri conteniendo 300 µL de medio de cultivo A+B (ver Anexo) suplementado con 0,3% de BSA**.** Posteriormente, se realizaron uno o dos pequeños cortes en cada cauda epididimario para permitir la liberación al medio de cultivo de los espermatozoides mótiles (técnica de "swim out"), durante 10 minutos en estufa a 37°C (Figura 1). Al cabo de este tiempo, se retiraron los fragmentos de tejido; y la suspensión de espermatozoides se incubó en condiciones capacitantes (37°C bajo atmósfera de 5% de CO_2 en aire, 90 minutos) luego de ajustar su concentración a 5 x 10^6 espermatozoides/mL.

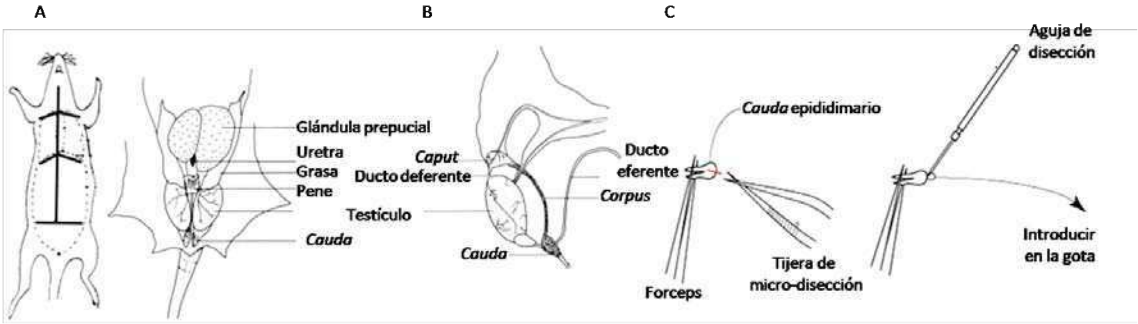


Figura 25. Esquema de la técnica empleada para obtener los espermatozoides de ratón. A: *se sacrificaron ratones macho y se les realizó una incisión transversal en el abdomen para tener acceso al epidídimo.* ***B:*** *usando pinzas se tiró suavemente una de las almohadillas de grasa testicular; los testículos asociados, conductos deferentes y epidídimo salieron con la misma. Sujetando una parte del conducto deferente fue posible cortar el cauda epididimario.* ***C:*** *finalmente, sosteniendo el tejido con una pinza, se realizaron dos o tres cortes pequeños en el mismo y se introdujo en una gota de medio A+B para que se produzca el "swim out".*

3. PARÁMETROS EVALUADOS EN LA MUESTRA DE ESPERMATOZOIDES

3.1 Concentración

La concentración de espermatozoides (spz) murinos se determinó utilizando una cámara de Neubauer (Figura 26). Para ello se realizó la dilución (D) adecuada de la muestra para el conteo y se colocaron 10 µL de la misma en la cámara. El número de espermatozoides se determinó contando los espermatozoides contenidos en los cuatro cuadrantes grandes (figura 2 B, celeste) mediante observación al microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200). La fórmula empleada para recuento es:

$$[\,X\ \ spz/mL\,] = \frac{Nro\ spz\ contados\ x\ D^{-1}\ x\ 10^4}{Nro\ cuadrantes\ contados}$$

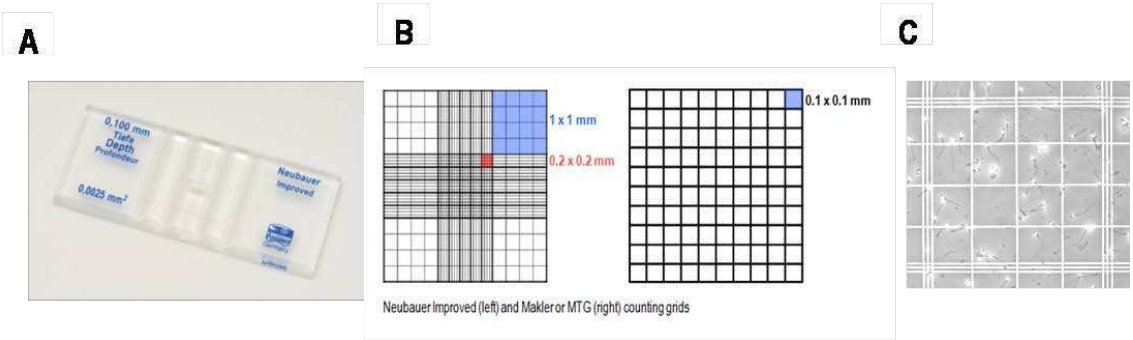


Figura 26. Esquema de la grilla de la cámara de Neubauer*. Se utilizó la cámara de Neubauer para evaluar la concentración de espermatozoides.* ***A:*** *cámara de Neubauer,* ***B:*** *detalle del recuadro celeste en cámara de Neubauer o su equivalente en cámara de Makler y* ***C:*** *detalle que se observa a 400X de aumento.*

3.2 Motilidad

Con el fin de determinar el porcentaje de espermatozoides mótiles, se colocó una alícuota de la suspensión de espermatozoides (10 µL) entre porta y cubreobjetos y se observó al microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200) a 400X. Se determinó el porcentaje de espermatozoides mótiles sobre un total de 100 a 200 células evaluadas.

4. DESCONDENSACIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA

4.1 Descondensación en presencia de heparina y GSH

De acuerdo con nuestra experiencia previa en espermatozoides humanos y con el objetivo de caracterizar la descondensación en espermatozoides de ratón, evaluamos el efecto de la heparina sobre dicho proceso. Para esto, se descondensaron espermatozoides, previamente capacitados, siguiendo la técnica de descondensación *in vitro* de espermatozoides humanos ya puesta a punto por nuestro grupo de trabajo (Romanato et al. 2003; Romanato et al. 2005). Los espermatozoides se incubaron en presencia de GSH 10 mM y heparina 46 µM durante distintos tiempos (15, 30, 45 y 60 minutos). Pasado el tiempo de incubación, se fijó una alícuota de 30 µL en un volumen igual de glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato salino (PBS). Se observaron dos alícuotas de 10 µL de cada condición en microscopio con contraste de fase usando un aumento de 400X y se determinaron los diferentes estadios de descondensación tal como lo describiera Bedford en el año 1973. Ellos son: espermatozoides sin cambios en su cromatina (S), moderadamente descondensados (M) o groseramente descondensados (G). Se contaron al menos 200 células en cada alícuota. La descondensación total alcanzada fue determinada como la suma del % de

espermatozoides moderadamente y groseramente descondensados (%(M+G)). Los resultados se graficaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). Previamente se demostró que la heparina, análogo estructural del heparán sulfato, tiene la misma actividad biológica en la descondensación *in vitro* de la cromatina espermática (Romanato et al. 2003) y, en virtud de su accesibilidad y menor costo, será utilizada en los experimentos como sustituto del heparán sulfato.

4.2 Evaluación del efecto de diferentes GAGs sobre la cromatina espermática

Luego de observar la capacidad descondensante de la H sobre los espermatozoides de ratón, se procedió a evaluar la capacidad descondensante *in vitro* de diferentes GAGs. Se realizó la descondensación de espermatozoides murinos capacitados en presencia de GSH 10mM, condroitín sulfato (CS), dermatán sulfato (DS) 46 µM o ácido hialurónico (AH) 2 mg/ mL en medio de cultivo A+B a 37°C durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo, se determinó el porcentaje de descondensación tal como se describió en la sección 4.1 y los resultados se graficaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.).

4.3 Evaluación del uso secuencial del agente reductor de puentes disulfuro (GSH) y del agente descondensante (GAG) en la descondensación de espermatozoides murinos capacitados

Para ahondar en el mecanismo del proceso de descondensación nuclear en espermatozoides murinos, quisimos ver (siguiendo el protocolo utilizado por Julianelli (Julianelli et al. 2012a) en nuestro laboratorio, para espermatozoides humanos), si existía un efecto cooperativo entre el agente descondensante y el agente reductor. Para ello, se incubaron espermatozoides murinos capacitados en presencia de la mezcla descondensante (H 2,3 µM o DS 46 µM y GSH 10 mM) a 37°C durante 45 minutos (control positivo de descondensación). Simultáneamente, para evaluar la existencia del efecto sinérgico, el tiorreductor (GSH) y el agente descondensante (H o DS) se agregaron en forma secuencial: primero H, DS o GSH solo durante 15 minutos y, al cabo de dicho tiempo y previo lavado por centrifugación, se agregó el reactivo complementario durante 30 minutos más, tal como se detalla en la Tabla 1. Los lavados entre incubaciones se realizaron por centrifugación a 2000 xg durante 3 minutos con medio A+B suplementado con 0,3% BSA. Para descartar cualquier efecto que pudiera provocar el lavado entre las incubaciones, los controles de descondensación (H/GSH o DS/GSH) también se lavaron luego de los 15 minutos de incubación y se incubaron en la misma mezcla descondensante durante 30 min

(controles de lavado: GSH+H_{lav} y GSH+DS_{lav}). Cumplido el tiempo final de incubación, se detuvo la reacción por fijación con glutaraldehído y se determinó el porcentaje de descondensación de la forma habitual.

	C	C	C	C	C	GSH+H_{lav}	GSH+DS_{lav}	1	2	3	4
GSH	✓			✓	✓	✓	✓	✓		✓	
H		✓		✓		✓			✓		
DS			✓		✓		✓				✓
						Centrifugado y lavado					
GSH						✓	✓		✓		✓
H						✓		✓			
DS							✓			✓	

Tabla 1. Esquema experimental utilizado para evaluar el efecto cooperativo entre H o DS y GSH sobre la descondensación in vitro de espermatozoides murinos. C: *controles en los que se incubaron espermatozoides con los distintos reactivos durante 45 minutos sin interrupciones;* ***GSH+H_{lav} y GSH+DS_{lav}:*** *controles de espermatozoides incubados en presencia de GSH y uno de los GAGs, cuya descondensación fue interrumpida para ser lavados y de nuevo incubados con la misma mezcla descondensante;* ***1 y 3:*** *espermatozoides incubados primero con GSH y luego del lavado, con heparina o con dermatán sulfato;* ***2 y 4:*** *espermatozoides incubados primero con heparina o dermatán sulfato, y luego del lavado con GSH solamente.*

4.4 Cinética de la descondensación de la cromatina en presencia de heparina y GSH

Con el fin de evaluar el progreso de la descondensación *in vitro* a lo largo del tiempo, se incubaron espermatozoides no capacitados y capacitados en presencia de H o DS (46 µM) y GSH (10 mM). Luego de 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación se fijaron alícuotas en un volumen igual de glutaraldehído al 2,5% en PBS y se determinó el porcentaje de descondensación total como se describiera previamente. Las curvas de descondensación en función del tiempo obtenidas se graficaron con el programa Sigma Plot (Systat Software, Inc).

4.5 Curvas dosis – respuesta de los glicosaminoglicanos heparina y dermatán sulfato

Para analizar el efecto de distintas concentraciones de heparina o dermatán sulfato sobre la descondensación, se incubaron espermatozoides no capacitados (NC) recuperados en medio A+B sin BSA o capacitados (C) en medio A+B suplementado con BSA al 0,3% durante 15 minutos a 37°C, en presencia de distintas concentraciones de estos GAGs. Los espermatozoides de ambas condiciones se incubaron con GSH 10 mM y concentraciones crecientes de estos GAGs (0,46-1,2-2,3-4,6-9,2 y 46 µM). Finalizada la incubación, los espermatozoides se fijaron y observaron al microscopio tal como se detalló en la sección 4.1.

4.6 Análisis in silico de las protaminas murinas P1 y P2 y de los glicosaminoglicanos dermatán sulfato y heparina

Con el objeto de explicar las diferencias encontradas entre los dos glicosaminoglicanos, dermatán sulfato y heparina, frente a la descondensación cromatínica, se inició un estudio *in silico* de estas moléculas, conjuntamente con las protaminas P1 y P2.
A tal fin, se obtuvieron las secuencias proteicas de ambas protaminas de ratón, utilizando la base de datos RCSB Protein Data Bank (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do). Para la protamina P2 se utilizó la secuencia de la forma más corta que es la que permanece unida al ADN luego de sufrir un procesamiento posterior a su incorporación a la cromatina (Balhorn 2007). Una vez obtenidas las secuencias, se modeló la posible conformación espacial utilizando el Swiss-Model (es un servidor para realizar modelado por homología, completamente automatizado, accesible a través del servidor Web http://Expasy.org). En el mismo servidor Expasy.org se utilizaron herramientas de análisis proteico para calcular el punto isoeléctrico (pI) de ambas proteínas.
Una vez obtenidos los templados posibles y la conformación espacial resultante, el archivo pdb correspondiente fue utilizado con el programa HyperChem (HyperChem 8.08, HyperCube Inc.) que permite realizar cálculos cuánticos y electrónicos.
Para los GAGs se utilizó la base de datos Poly Sac 3DB (http://polysac3db.cermav.cnrs.fr/home.html) de donde se obtuvo el archivo para heparina (heparin-dp12-NMR-1HPN.pdb) y para dermatán sulfato (dermatan83-allo1_expanded.pdb). Ambos archivos fueron depurados para mostrar solamente un modelo y liberarlos de moléculas de agua y/o sodio.
De la misma forma en que se procedió con las protaminas, para los GAGs se utilizó el programa HyperChem 8.0.8 (Hypercube, Inc.) para realizar los cálculos electrónicos.

4.7 Evaluación del efecto sinérgico entre heparina y dermatán sulfato en la descondensación nuclear espermática

Para evaluar la existencia de un posible efecto sinérgico entre la heparina y el dermatán sulfato, primero fue necesario determinar las concentraciones óptimas de dichas moléculas, para lo cual se utilizaron las curvas dosis respuesta realizadas según se indicara en la sección anterior. Estas concentraciones resultaron ser 46 µM para el dermatán sulfato y 0,46 µM para la heparina, tal como se podrá observar en Resultados (Sección 1.6). A continuación, se evaluó el posible efecto cooperativo de ambos GAGs sobre espermatozoides murinos capacitados y no capacitados, en presencia de GSH 10 mM y heparina 0,46 µM, dermatán sulfato 46 µM o la combinación de ambos GAGs, durante 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación en las condiciones habituales. Se detuvo la reacción con glutaraldehído y se observó al microscopio de contraste de fase tal como se describiera previamente.

4.8 Evaluación de la ultraestructura de espermatozoides mediante microscopía electrónica de transmisión.

Para ver el estado de las membranas plasmática y acrosomal externa e interna luego del proceso de descondensación nuclear, se incubaron espermatozoides murinos en presencia de GSH (control negativo), H 0,46 µM/GSH, DS 46 µM/GSH o H+DS/GSH durante 60 min a 37°C. Las cuatro muestras fueron diluidas 1:4 en PBS 0,1 M (pH 7,4) a temperatura ambiente y se centrifugaron a 380 xg durante 10 minutos. Los precipitados, ajustados a una cantidad de 5 x 10^6 espermatozoides, se fijaron con glutaraldehído al 3% en PBS a 4°C. Luego de 18 horas, las muestras fijadas fueron tratadas con tetróxido de osmio al 1,3%, deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol frio y lavadas con óxido de propileno a temperatura ambiente. Los *pellets* fueron sumergidos en Eponate 12 - Araldite (Pelco, Redding, CA, USA) y cortados en ultramicrótomo con una cuchilla de diamante. Luego de una coloración doble con acetato de uracilo y citrato de plomo, los cortes fueron analizados con un microscopio electrónico Zeiss EM 109T (Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios de Microscopía Electrónica, LANAIS-MIE, Buenos Aires, Argentina) (Figura 27).

***Figura 27**. Microscopio electrónico Zeiss EM 109T utilizado para realizar la microscopia electrónica de transmisión.*

5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ENDOSULFÁN

Para analizar los efectos del endosulfán se utilizó el principio activo (AI, del inglés active ingredient) y dos formulaciones distintas del mismo**.** El endosulfán puro es una mezcla de dos isómeros: el alfa (α) y el beta (β). Se comercializa como un concentrado

emulsionable y debe contener al menos un 94% de endosulfán de acuerdo con las especificaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO). Las formulaciones del endosulfán incluyen el ingrediente activo, ingredientes inertes, aditivos y coadyuvantes. Los experimentos que se muestran a continuación se realizaron con endosulfán marca Master® y endosulfán marca Zebra Ciagro®. Ambas marcas contienen un 35% del principio activo, el primero es producido por la empresa CHEMIPLANT S.A. y el segundo por la empresa Ciagro SRL. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) clasifica al endosulfán como Categoría Ib –Altamente Peligroso. La Unión Europea también lo califica como Altamente Peligroso. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica al endosulfán en Categoría II –Moderadamente Peligroso. Se ha considerado que la clasificación de la OMS es inapropiada, considerando la clasificación aceptada en países de todo el mundo y la información disponible sobre su toxicidad.
Se evaluará el efecto de Endosulfán en espermatozoides murinos y humanos como se detalla a continuación:

Evaluación del efecto in vitro del endosulfán en espermatozoides murinos

5.1 Evaluación del endosulfán sobre la motilidad

Para evaluar el efecto del plaguicida sobre la motilidad, se incubaron espermatozoides murinos capacitados en presencia del principio activo (de aquí en adelante endosulfán puro) y sus dos formulaciones distintas, en una concentración igual a 100 µM, durante 15 minutos a 37°C. Luego, la motilidad se determinó tal como se describió en la sección 3.2.

5.2 Curva dosis – respuesta de endosulfán sobre la descondensación in vitro

Con el objetivo de evaluar el efecto del endosulfán sobre la descondensación de la cromatina espermática, se preincubaron espermatozoides murinos capacitados durante 15 minutos en presencia de concentraciones crecientes (100 pM, 10 nM, 1 µM, 100 µM) de cada una las dos formulaciones comerciales antes descriptas, o con endosulfán puro. Dado que las diluciones seriadas del plaguicida se realizaron en DMSO (dimetilsulfóxido). Como control negativo se incubó una alícuota de espermatozoides en presencia de DMSO sólo (1 ul de DMSO puro en 99 ul de la suspensión de espermatozoides, para obtener la misma concentración de DMSO que la utilizada para la mayor concentración del plaguicida). Luego de la preincubación en presencia del tóxico, se realizó el ensayo de descondensación en presencia de H/GSH (H 4,6 µM / GSH 10 mM) durante 30 minutos a 37°C, se fijaron alícuotas de cada

condición con glutaraldehído, se observó al microscopio de contraste de fase y se construyó una curva dosis-respuesta con el programa Sigma Plot (Systat Software, Inc).

5.3 Evaluación de la fragmentación del ADN mediante la técnica de TUNEL

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

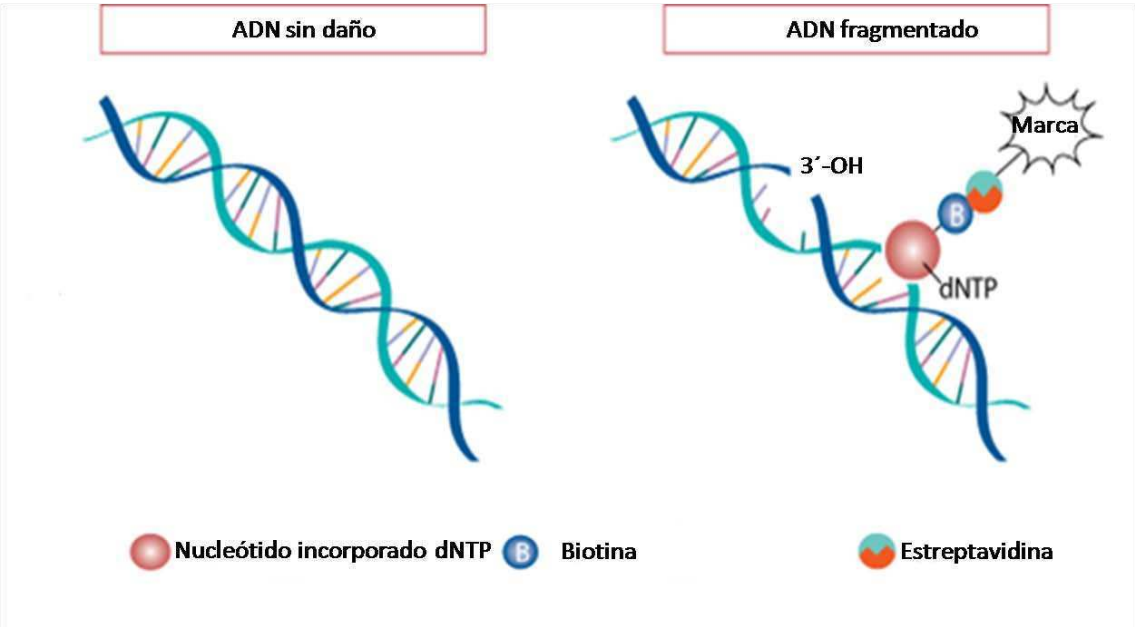


***Figura 28. Ensayo de TUNEL**. Esquema en el que se explica el fundamento de la técnica. El ADN fragmentado en simple o doble cadena se marca con un nucleótido acoplado a biotina-estreptavidina mediante la acción de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT).*

Se preincubaron espermatozoides capacitados en presencia de endosulfán puro o sus dos formulaciones comerciales durante 15 minutos, se descondensaron luego en presencia de H (2,3 µM) y GSH (10 mM) durante 30 minutos de la forma habitual (MM Sección 5.4). Para los controles, se incubaron espermatozoides en medio A+B, o DMSO y luego se descondensaron de la misma forma que los espermatozoides expuestos a endosulfán. Se fijaron alícuotas de espermatozoides provenientes de cada condición de descondensación y previamente preincubados o no en plaguicida, en

paraformaldehído al 2% en PBS (pH 7,4 Gibco) durante una hora como mínimo a 4°C. Cada muestra se colocó en un pocillo (4 mm de diámetro) de un portaobjetos multipocillo ("multiwell") y se dejó secar y fijar al vidrio. Luego de una hora, cada pocillo se lavó 3 veces con PBS durante 5 minutos cada vez, las células se permeabilizaron con metanol frio y previo a un nuevo lavado con PBS, se incubaron con el reactivo de TUNEL. Para cada muestra, se realizó un control positivo incubando un pocillo adicional con DNAsa (1 UI/mL) durante 30 minutos, y en otro pocillo, se omitió la enzima de TUNEL para ser utilizado como control negativo. Luego de incubar todas las muestras con el reactivo de TUNEL durante una hora a 37°C, las mismas se lavaron con PBS (3 veces, durante cinco minutos cada vez) y se montaron con medio Vectashield H-1000. Para cada condición, se evaluó un total de 500 espermatozoides mediante microscopia de fluorescencia utilizando un filtro verde (Isotiocianato de fluoresceína, 488 nm) (Rougier et al. 2013).

5.4 Evaluación del estado de tiorreducción de los espermatozoides

Con el objeto de evaluar la cantidad de tioles libres en general en los espermatozoides como una indicación global de la tiorreducción, se tiñeron espermatozoides murinos con el reactivo tiólico monobromobimane (Shalgi et al. 1989). El monobromobimane es una sonda fluorescente que se une a tioles libres, utilizada para la determinación del estado redox de tioles proteicos en sistemas biológicos. La derivatización *in situ* utilizando monobromobimane resulta en la detección total de los tioles libres, emitiendo fluorescencia de color azul (Figura 29).

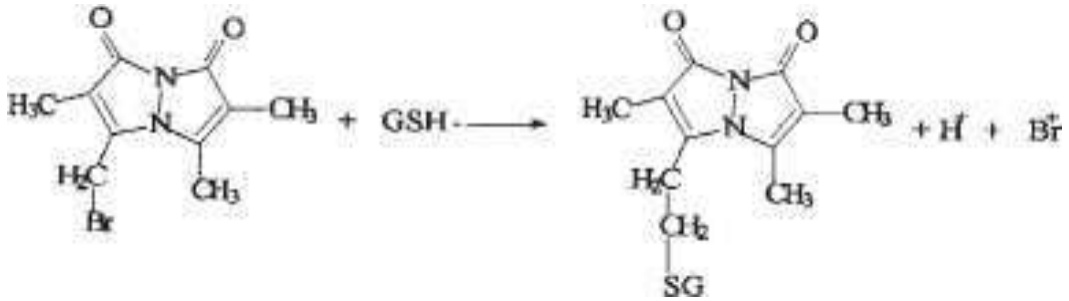


Figura 29. Fundamento del ensayo*. Los tioles libres se unen a la molécula de monobromobimane y la convierten en una molécula fluorescente.*

Dado que se deseaba evaluar en particular el efecto del plaguicida sobre el estado tiólico en general, debido a la importancia que los puentes disulfuro tienen no solamente en la condensación de la cromatina sino también en la motilidad, espermatozoides murinos capacitados se preincubaron en presencia de endosulfán puro durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se realizó el ensayo estándar de descondensación en presencia de H/GSH, durante 5 y 30 min a 37°C (el control negativo se realizó en presencia de GSH sólo). Al cabo de cada tiempo de incubación,

se fijó una alícuota de 30 µl de cada condición en glutaraldehído y se observó al microscopio de contraste de fase. Las suspensiones de espermatozoides incubados en condiciones descondensantes durante 5 minutos se lavaron 2 veces por centrifugación a 800 xg durante 10 min y cada *pellet* se resuspendió en PBS, ajustando la concentración final a 4-8 x 10^6 células/mL. Se colocaron 10 µL de cada condición sobre portaobjetos, se secaron al aire y se incubaron con el reactivo tiólico monobromobimane. Se preparó en el día una solución de mBBr 0,5 mM en PBS, a partir de un stock 50 mM en acetonitrilo (Shalgi et al. 1989), que se agregó a los preparados durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, los preparados se lavaron dos veces con PBS, se montaron también en PBS y se examinaron al microscopio de fluorescencia (Zeiss 426126), utilizando un filtro de excitación de 340-380 nm y un filtro de emisión mayor a 450 nm. La intensidad de fluorescencia de cada célula fue cuantificada en unidades arbitrarias (UA) utilizando la función RGB del software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Se realizaron duplicados de los tratamientos y se cuantificaron al menos 200 espermatozoides en cada condición experimental.

5.5 Evaluación del efecto in vitro del endosulfán sobre el estado redox de los espermatozoides.

5.5.1 Preparación de las muestras

Para determinar la actividad de las enzimas GST y SOD, y medir el contenido de GSH y la peroxidación lipídica; se incubaron 7,5 x 10^6 espermatozoides/mL previamente capacitados en presencia de endosulfán puro o las formulaciones (100 µM) durante 15 minutos a 37°C. En el caso de los controles los espermatozoides se incubaron en medio A+B o DMSO. Luego, los espermatozoides se conservaron a 0°C hasta ser sonicados tres veces durante 5 segundos a 40V (para generar la ruptura de sus membranas sin que pierdan contenido de su citoplasma) y se centrifugó a 12000 rpm por 15 min.

5.5.2 Actividad de GST

La actividad de la enzima Glutatión S Transferasa fue medida por la técnica de Habig (Habig et al. 1976). Brevemente, la mezcla estándar del ensayo contenía la muestra enzimática, una solución de GSH 100 mM y 1-cloro-2,4 dinitrobenceno (CDNB) 100 mM en etanol, en un volumen final de 0,8 ml de una solución 100 mM de PBS (pH 6.5). Luego de agregar el CDNB, el cambio en la absorbancia se siguió por 120 segundos. Una unidad de GST fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación

de 1 mmol de GS-DNB por minuto a 25°C y los resultados fueron expresados como un porcentaje del control (Chaufan et al. 2014).

5.5.3 Actividad de SOD

El ensayo consiste en utilizar eventos fotoquímicos para generar aniones superóxido ($^{\cdot}O_2^-$) a partir de la oxidación de riboflavina. Éste anión se puede detectar por medio de una reacción colorimétrica con el compuesto nitroazul de tetrazolio (NBT), que da como producto azul de formazán. Cuando está presente en la muestra, la enzima SOD inhibe la formación de azul de formazán, por disminución de la concentración del $^{\cdot}O_2^-$ del medio. Al aumentar el volumen de extracto enzimático, disminuye la concentración de este producto y determinando la disminución de la velocidad de reacción, se puede calcular la actividad enzimática. La actividad de la enzima superóxido dismutasa se midió usando el procedimiento modificado de Beauchamp y Fridovich (Beauchamp & Fridovich 1971) en una microplaca. La mezcla estándar del ensayo contenía la muestra enzimática, EDTA 0,1 mM, DL-metionina 13 mM, nitroazul de tetrazolio 75 mM y riboflavina 2 mM en un volumen final de 0,3 ml de buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 7.9). Las muestras fueron expuestas a luz fría intensa durante 5 minutos. Definimos una unidad enzimática SOD (U_{SOD}) como la cantidad de enzima necesaria para inhibir en un 50% la formación de azul de formazán en el tiempo del ensayo. Las muestras fueron medidas en un lector de microplacas Benchmark (BIO-RAD Laboratories) a 560 nm y los resultados fueron expresados como un porcentaje del control (Chaufan et al. 2014).

5.5.4 Contenido de equivalentes de GSH

La técnica se basa en la oxidación del glutatión reducido (GSH) por acción del ácido 5, 5' ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB). Esta reacción da como producto ácido 5 tio 2-nitrobenzoico (TNB), cuyo pico de absorbancia está en 412 nm. Esta absorbancia resulta proporcional a la cantidad de GSH presente en la muestra. Los niveles de glutatión fueron medidos siguiendo el procedimiento de Anderson modificado (Anderson 1985). Brevemente, se desproteinizó la muestra (sobrenadante de homogeneizado celular) con ácido sulfosalicílico al 10% en una relación 2:1. Se usaron 80 µL de muestra + 40 µL de ácido sulfosalicílico al 10%. Luego, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 7000-10000 rpm y se usó el sobrenadante como muestra a determinar. Las muestras desproteinizadas se incubaron con DTNB 6 mM en buffer fosfato de sodio 0,143 M (pH 7,5 conteniendo EDTA 6,3 mM) durante 30 min a temperatura ambiente. Paralelamente se realizó una curva de calibración de GSH colocando 0, 5, 10, 15, 20 µL de solución estándar de GSH 1 µM (preparada en ácido sulfosalicílico) y se incuba igual que las muestras a un volumen final de 250 µL. Tanto

las muestras como la curva de calibración fueron medidas en un lector de microplacas Benchmark (BIO-RAD Laboratories) a 412 nm. Los resultados fueron expresados como porcentaje del control (Chaufan et al. 2014).

5.5.5 Peroxidación lipídica

La técnica de peroxidación lipídica se determina midiendo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs). Esta técnica se basa en la reacción del MDA (uno de los productos finales de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados) con el ácido tiobarbitúrico (TBA) en medio ácido, en caliente, para dar un compuesto coloreado. Para realizar la medición se colocan 175 µL de cada muestra con 1 mL de reactivo MDA. El reactivo de TBA se prepara disolviendo 0,375 % p/v de TBA en una solución ácida de TCA al 15% y ácido clorhídrico 0,25 N en agitación a no más de 60 ºC. Una vez que la solución está homogénea y esté a temperatura ambiente se agrega BHT en etanol a concentración final de 0,68 mM. Para preparar el reactivo de MDA se agregó 0,37 g de TBA, 2 mL de HCl, 30 mL de TCA 50% y 680 mL de BHT 100 mM, se llevó a volumen final con agua destilada. Las muestras se calentaron durante 45 minutos y, luego de centrifugarlas, se determinó la absorbancia del sobrenadante a 535 nm. Luego, se calcularon los moles de MDA por mL de muestra.

<u>Evaluación del efecto in vitro del endosulfán en espermatozoides humanos</u>

5.6 Obtención de muestras de espermatozoides humanos

Los experimentos con espermatozoides humanos se llevaron a cabo utilizando muestras de semen de donantes voluntarios normospérmicos (OMS, 2010). Los donantes firmaron un consentimiento informado y se aseguró la confidencialidad de datos y el uso de las muestras exclusivamente para los experimentos aquí detallados, con aprobación del Comité de Ética del IBYME. Las muestras fueron obtenidas por masturbación luego de 36-48 horas de abstinencia sexual; se permitió la licuefacción del semen y se procesaron dentro de la hora de obtención.

5.7 Procesamiento de las muestras de semen, obtención de fracción altamente mótil y capacitación espermática

Luego de transcurrido el tiempo necesario para que ocurra la licuefacción del semen, se obtuvo la fracción de espermatozoides altamente mótiles mediante la técnica de "*swim-up".* Para ello, se fraccionó la muestra en alícuotas de 500 µL en tubos cónicos de 15 mL (Falcon) y se agregó, gota a gota, 1 mL de medio fresco HTF-26B (Human Tubal Fluid, suplementado con 2,6% de BSA. Los tubos se colocaron en una gradilla en ángulo de 45° durante 90 minutos a 37°C y bajo atmósfera de 5% de CO_2 en aire

permitiendo, de esta manera, que los espermatozoides de mejor motilidad pudieran nadar hacia el medio fresco. Posteriormente, se recuperó cuidadosamente el sobrenadante y se determinó la concentración de espermatozoides como se detallará a continuación y el porcentaje de espermatozoides mótiles, según la metodología descripta previamente para espermatozoides murinos en la sección 3.2. La fracción de espermatozoides mótiles, así obtenida, se incubó en condiciones capacitantes: 18 horas en medio HTF-26B, a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 en aire y en una concentración de 5-10 x 10^6 espermatozoides/ml.

La concentración de espermatozoides humanos se determinó utilizando una cámara de Neubauer (Figura 26). Para ello se realizó una dilución 1:20 de la muestra y se colocaron 10 µL de la misma en la cámara. El número de espermatozoides se determinó contando los espermatozoides contenidos en 5 cuadrados pequeños (rojo) mediante observación al microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200).

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

Volumen ≥ 1,5 mL
Viabilidad > 58%
Motilidad > 40%
Concentración > 15 x 10^6 espermatozoides/ mL
Cantidad total > 39 x 10^6 espermatozoides/eyaculado

5.8 Evaluación del efecto del endosulfán sobre la viabilidad y la motilidad espermática.

Con el fin de analizar si el endosulfán afecta los parámetros generales de funcionalidad de espermatozoides humanos se realizó una curva de dosis-respuesta de endosulfán formulado Zebra Ciagro®, se eligió este endosulfán porque demostró tener la mayor toxicidad sobre espermatozoides murinos. Espermatozoides humanos capacitados se incubaron en presencia de endosulfán (1- 12,5- 25- 50 y 100 µM) durante 30 minutos a 37°C, y se evaluó en primera instancia la motilidad y concentración espermática tal como se detallara en la sección 3. Además, se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos utilizando Eosina Y (colorante de exclusión). Una alícuota de 5 µL de semen se mezcló con una alícuota de 5 µL de colorante (0,5 mg/mL en PBS) y se homogeneizó cuidadosamente. Luego de 30 segundos se observó al microscopio (400 X) y se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos (no teñidos) sobre un total de 200 espermatozoides.

5.9 Evaluación del efecto in vitro del endosulfán sobre la descondensación de la cromatina de espermatozoides humanos.

Los espermatozoides humanos incubados en condiciones capacitantes se expusieron a endosulfán puro, Master® o Zebra Ciagro® en una concentración igual a 100 µM durante 30 minutos a 37°C. Luego se descondensaron siguiendo el protocolo descrito por Romanato (Romanato et al. 2003) Brevemente, espermatozoides capacitados se descondensaron en presencia de GSH (10 mM) y heparina 46 µM en HTF-26B a 37°C durante 30 minutos. Los controles consistieron en incubaciones paralelas con GSH o heparina solos. Finalizado el tiempo de incubación, se fijaron las alícuotas con glutaraldehído y se determinó el porcentaje de espermatozoides descondensados tal como se describió en la sección 4.1.

6. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CONSUMO DE ETANOL SOBRE ESPERMATOZOIDES MURINOS.

6.1 Intoxicación de los ratones con etanol (in vivo)

Para realizar los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones macho CF1 de 60 días de edad, mantenidos en las condiciones indicadas previamente en la sección 1. El grupo de ratones intoxicados, recibió agua de bebida conteniendo un 15% (v/v) de alcohol etílico (graduación 96° PUROCOL) durante 15 días, mientras que los ratones control recibieron agua filtrada. Ambos grupos de animales tuvieron acceso *ad libitum* a la comida. El día 15, luego de la administración de etanol, los machos se sacrificaron mediante dislocación cervical y se obtuvieron los espermatozoides del *cauda* epididimario tal como se describiera anteriormente en la sección 2.

6.2 Evaluación del efecto del etanol sobre la morfología de espermatozoides murinos.

Para evaluar la morfología de los espermatozoides se utilizó un test para detectar anormalidades. Los espermatozoides se recuperaron en medio buffer bicarbonato Krebs-Ringer, y una alícuota de 10 µL de los mismos fue colocada en un portaobjetos donde se dejó secar. Inmediatamente después, los espermatozoides se fijaron con formaldehído al 5% en PBS (v/v), se lavaron con agua destilada, se tiñeron con el kit de Spermac y se dejaron secar nuevamente. La tinción de Spermac es un kit de tres tinciones (A, B y C) y una solución fijadora (formaldehído). La tinción "C" (verde) es específica para acrosoma. La tinción "A" (roja) lo es para los contenidos nucleares.

Las preparaciones fueron observadas sin medio de montaje en un microscopio Zeiss de campo claro a 1000X. Se examinó la morfología de la cabeza, las regiones acrosomal y post-acrosomal, la presencia de gota citoplasmática, la pieza media, y el flagelo. El criterio para considerar la morfología anormal (con o sin acrosoma) fue: (1) cabeza anormal: tamaño mayor o menor a lo normal, cabeza plana, formas parcial o completamente anormales (redondas, pequeñas, grandes, dobles) y/o presencia de acrosoma anormal (más pequeño, 30%, o más grande, 70%, que la cabeza del espermatozoide); (2) defectos en el cuello y la pieza media: debris alrededor del cuello, cuello delgado, pieza media que sea más del 30% del espermatozoide; (3) flagelo anormal: flagelo doble, flagelo enroscado, o flagelo roto, inserción incorrecta del flagelo, gotas citoplasmática. Para el control y el grupo intoxicado con etanol, se calculó el porcentaje medio (del total de espermatozoides/ratón, cerca de 1000) ± la desviación estándar , de cabezas anormales, cuello-pieza media, y flagelo (Cebral et al. 2011).

6.3 Evaluación del efecto del etanol sobre la motilidad y la hiperactivación de espermatozoides murinos.

Se evaluó el efecto del etanol sobre la motilidad de los espermatozoides tal como se describió previamente en la sección 3.2 y también sobre la hiperactivación de los mismos. El patrón de hiperactivación fue identificado cuando se presentó un gran movimiento del flagelo en forma de "látigo" siendo la motilidad no progresiva, intercalada con pequeños episodios de motilidad lineal progresiva (Yanagimachi et al. 1994). Con el fin de estudiar la evolución de la motilidad de la muestra espermática durante el tiempo de incubación o de capacitación *in vitro*, el *cauda* del epidídimo de cada ratón fue cortado dentro de una gota de 200 mL de medio A+B cubierta de aceite, y luego de su dispersión por 5 min, se colocó en la estufa gaseada durante 2 h, ya que el tiempo de capacitación en el ratón oscila entre los 90 y 120 min.

6.4 Evaluación del efecto del etanol sobre la reacción acrosomal de espermatozoides murinos.

Para analizar la reacción acrosomal se llevó a cabo la técnica de estudio de HOS-Spermac (Viggiano et al. 1996), que permitió detectar simultáneamente la presencia del capuchón acrosomal y la viabilidad espermática. Brevemente, desde los 0 hasta los 240 min cada 60 min, se tomaron alícuotas de 20 µL de la suspensión espermática, y se colocaron en tubos tipo Eppendorf con 200 µL de medio hipoosmótico (MHOS, ver Anexo). Se incubaron durante 1 h a 37°C. Finalizada la incubación, las muestras se centrifugaron a 500 x g durante 5 min y el pellet se resuspendió en 20 µL de MHOS. Las suspensiones se extendieron en portaobjetos y se dejaron secar, inmediatamente

después se fijaron con 5% de formaldehido (v/v) durante 1 h. Luego de la fijación, los extendidos se lavaron tres veces en agua destilada, se sumergieron 1 min en la tinción "A", y 2 min en la "B' y "C". Entre cada tinción, los preparados fueron lavados nuevamente con agua destilada; se dejaron secar y se examinaron (sin montar) bajo microscopio de campo claro a 1000X con aceite de inmersión. Con la tinción Spermac, la presencia del capuchón acrosomal murino se revela como una banda verde sobre la cabeza, y el núcleo se tiñe de rojo (Herrero et al. 1995). Se determinó el porcentaje de espermatozoides viables con presencia del capuchón acrosomal, contabilizando al menos 100 células. Finalmente, se calculó el porcentaje de espermatozoides reaccionados espontáneamente (en ausencia de inductor fisiológico) (sin capuchón) para los diferentes tiempos de incubación y se excluyeron los no viables.

6.5 Descondensación in vitro de espermatozoides provenientes de ratones intoxicados con etanol.

Espermatozoides murinos, provenientes tanto de animales control como de ratones intoxicados con etanol, e incubados en condiciones capacitantes: se descondensaron *in vitro* aplicando la metodología estándar en presencia de heparina 4,6 µM y GSH 10 mM, durante 30 y 60 minutos a 37°C. Luego, se fijaron alícuotas de 30 µL de cada condición con glutaraldehído y se observó al microscopio de contraste de fase tal como se describiera previamente (Sección 4.1).

6.6 Fertilización in vitro (FIV)

6.6.1 Recuperación de espermatozoides murinos para realizar la FIV

Se obtuvieron espermatozoides de *cauda* epididimario de animales control e intoxicados con etanol, tal como se describiera previamente en la Sección 2. Luego de determinar los parámetros seminales, los espermatozoides se incubaron en condiciones capacitantes en una gota de 300 µL de medio A+B cubierta con aceite mineral, a una concentración de 1-5 x 10^6 espermatozoides/mL, durante 90 minutos a 37°C y bajo atmósfera de 5% de CO_2.

6.6.2 Superovulación y recuperación de oocitos de ratón

Con el fin de obtener una mayor cantidad de oocitos, se estimularon hormonalmente ratones hembra CF-1 de 8 semanas de edad con una primera inyección de 10 UI de PMSG seguida de una segunda inyección de 10 UI de hCG, 48 horas más tarde. A las 16 -17 horas post hCG, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical, se

recuperaron los oviductos y cada uno de ellos se colocó en una gota de 100 µL de medio A+B. Se recuperó el complejo *cumulus*-oocito (CCO) de cada oviducto pinchando con aguja de jeringa tipo tuberculina en la región de la ampolla (Figura 30). Una vez recuperados los CCOs, se descartaron los oviductos y se colocó cada CCO en una gota de 90 µL de medio A+B en la cual posteriormente se realizaría la FIV.

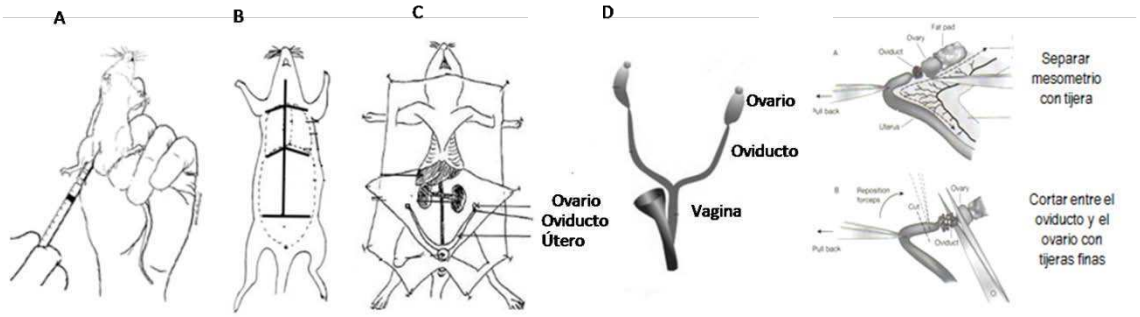


Figura 30. Esquema de la técnica de obtención de oocitos de ratón. A: *se estimuló hormonalmente a la hembra y se sacrificó.* ***B:*** *para realizar la disección del animal, se realizó un corte longitudinal por el vientre y se expusieron los ovarios* ***(C)****.* ***D:*** *entre el extremo de cada ovario y el útero se encuentra el oviducto con forma de ampolla pequeña. Se retiró la grasa que rodea el oviducto y se cortó para poder separarlo del ovario. Cada oviducto se colocó en una gota de medio A+B, se pinchó y se extrajeron de esta manera los complejos cumulus-oocito. Los complejos recuperados se colocaron en la gota de FIV en medio A + B donde se realizaría la coincubación con los espermatozoides de animales alcoholizados o control.*

6.6.3 FIV con espermatozoides provenientes de animales intoxicados con etanol

En cada gota de FIV conteniendo los correspondientes CCOs, tal como se detallara en el punto anterior, se colocó una alícuota de 10 µL de espermatozoides murinos capacitados (1-5 x 10^5 espermatozoides/mL), obtenidos de animales intoxicados con etanol tal como se indicara en el punto 6.1, o control. Las gotas se colocaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 en aire. Con el fin de analizar la cinética posterior a la FIV, se interrumpió la coincubación de las gametas en distintas gotas a distintos tiempos (2,5- 3,5 y 4,5 h), se fijaron los oocitos en paraformaldehído al 2% en PBS, se lavaron 10 min en gota de PBS, se colorearon con Hoechst 33342 durante 10 minutos y se lavaron nuevamente en gota de PBS durante 10 minutos. Luego, los oocitos provenientes de cada condición se montaron en portaobjetos multipocillo ("multiwell") con medio de montaje Vectashield para ser observados al microscopio de fluorescencia (Excitación 350 nm/Emisión 461 nm). Los oocitos se clasificaron en tres categorías distintas: (i) oocitos en metafase II sin signos de haber sido fecundados (Me II), (ii) oocitos con segundo cuerpo polar extrudido más pronúcleo femenino y con cabeza descondensada de un espermatozoide en su citoplasma (II CP + PNf + CD), y (iii) oocitos con segundo cuerpo polar extrudido en los que ya se podían ver los pronúcleos

femenino y masculino (II CP + PNf + PNm). El total de oocitos fecundados correspondió a la suma de las últimas dos categorías definidas.

6.7 Evaluación del efecto del etanol sobre el estado redox de los espermatozoides

Se evaluó la actividad de las enzimas GST y SOD, el contenido de GSH y la peroxidación lipídica (TBARs) en espermatozoides capacitados provenientes de animales intoxicados tal como se describiera en la sección 5.10.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los efectos de los distintos tratamientos realizados (diferentes glicosaminoglicanos, sinergismo, cooperatividad, pretratamiento con endosulfán, intoxicación *in vivo* con etanol) sobre la descondensación espermática se evaluaron por ANOVA, seguida del test de Tukey.

El efecto del endosulfán sobre la tiorreducción de las protaminas en condiciones descondensantes se evaluó mediante análisis de varianza de mediciones repetidas (Repeated Measures ANOVA) seguida por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

El efecto del etanol sobre la morfología espermática, la motilidad, la hiperactivación y la reacción espontánea fueron evaluados mediante el test de Student.

El efecto del consumo de etanol sobre la dinámica de FIV se evaluó mediante el Test de Fisher.

Las actividades enzimáticas (GST y SOD), contenido de GSH y TBARs se evaluaron mediante el test de ANOVA, seguida del test de Tukey.

En todos los casos, los resultados corresponden a la media ± EE y las diferencias fueron consideradas significativas con un valor de $p<0.05$.

Capítulo I: Estudio del proceso de descondensación de la cromatina en espermatozoides murinos

1. *DESCONDENSACIÓN DE ESPERMATOZOIDES MURINOS*

1.1 Descondensación estándar con heparina y GSH

Con el fin de evaluar si la descondensación *in vitro* de espermatozoides murinos en presencia de H y GSH responde de la misma manera que en espermatozoides humanos, se tomó como base el mismo protocolo puesto a punto previamente en nuestro laboratorio tal como se detallara en Materiales y Métodos (sección 4.1). En primer lugar, se descondensaron espermatozoides capacitados en presencia de H y GSH y se fijaron alícuotas a distintos tiempos para analizar si se producía la descondensación. Se definieron los distintos estadios de descondensación (S, M y G), y se determinó el porcentaje alcanzado de cada uno (Figura 32), tal como se muestra en la figura X. Para lograr una correcta visualización de la morfología y tamaño de la cabeza, el ADN espermático se tiñó con Hoechst 33342 y se observó al microscopio de fluorescencia (figura 31).

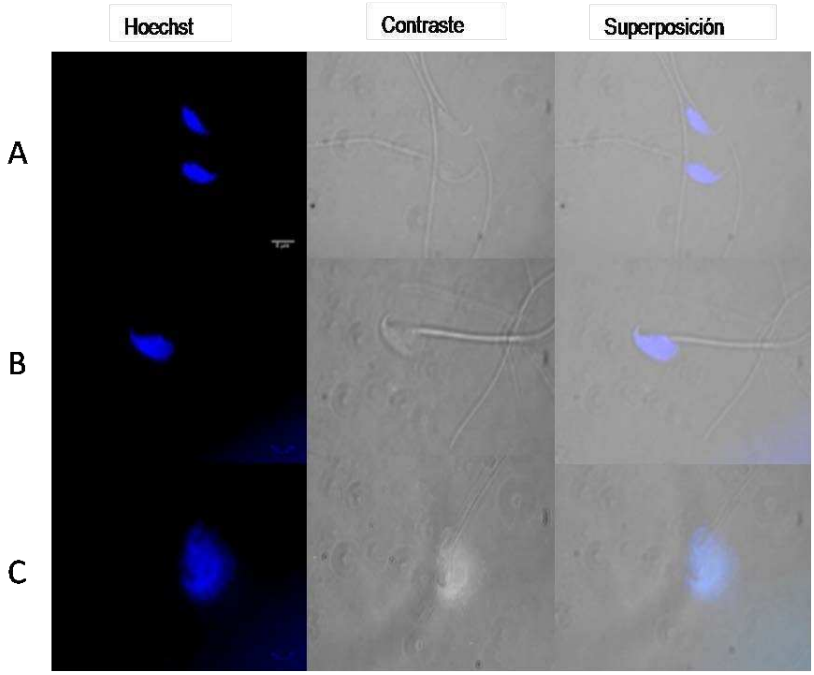


***Figura 31**. **Morfología de espermatozoides murinos descondensados**. La descondensación del núcleo se visualizó mediante la coloración con Hoechst 33342 en microscopio de fluorescencia (Hoescht). La figura muestra, además, la misma imagen en contraste de fase (Contraste), y la mezcla de ambas (Superposición). El panel A corresponde a espermatozoides S (sin cambios en su cromatina); el panel B a los espermatozoides M (moderadamente descondensados) y el panel C a los espermatozoides G (groseramente descondensados). El porcentaje de descondensación máxima alcanzado se calculó como la suma de los porcentajes de las formas M y G y se expresa como %(M+G). Magnificación original: 400x. Barra de escala: 5 µm.*

Tal como se observó en el caso de los espermatozoides humanos, los espermatozoides murinos descondensaron en presencia de H y GSH. Se pudieron distinguir distintas morfologías en cada tiempo de descondensación. A los 15 minutos las morfologías mayormente observadas fueron S y M (46,5 ± 10,9 y 48,2 ± 7,2, respectivamente), mientras que el porcentaje de espermatozoides en estadio G fue muy bajo. En cambio, a los 30 minutos de descondensación la mayoría de los espermatozoides eran M o G (39,6 ± 12, 8 M y 51,5 ± 13,0 G). A los 45 minutos, el porcentaje de espermatozoides M disminuye considerablemente, con el consecuente aumento de morfologías G (77,8 ± 3,4), lo que es esperado conforme la descondensación avanza. Finalmente, a los 60 minutos se observa que la forma G es la morfología predominante (84,3 ± 2,2). Por lo tanto, como primera aproximación se pudo confirmar que los espermatozoides murinos descondensan en presencia de H y GSH y, además, que se pueden distinguir los mismos estadios que en los espermatozoides humanos descondensados.

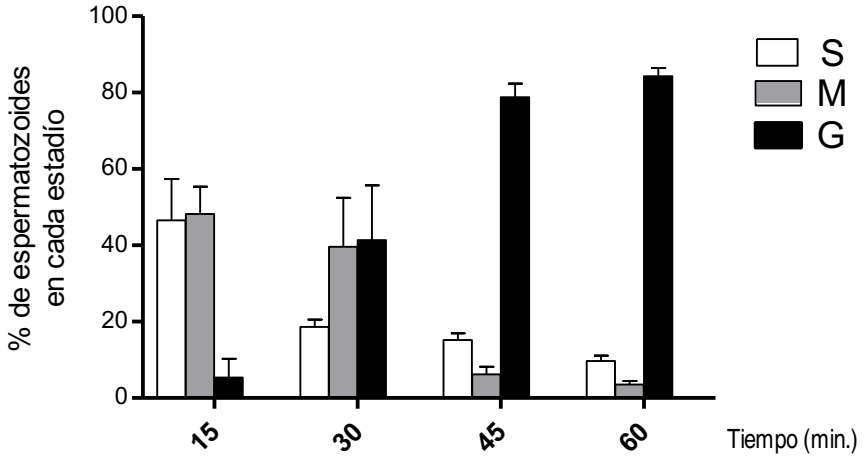


Figura 32. Descondensación in vitro de espermatozoides murinos. *Se descondensaron espermatozoides capacitados en presencia de H (46 uM) y GSH (10 mM) durante 15, 30, 45 y 60 minutos. Luego, se determinó el porcentaje de espermatozoides en cada estadio según la morfología de los mismos observada en el microscopio de contraste de fases. Los porcentajes de los estadios alcanzados por los espermatozoides se graficaron en función del tiempo.*

1.2 Evaluación de la capacidad descondensante de diferentes GAGs sobre la cromatina de espermatozoides murinos

Para evaluar la capacidad descondensante *in vitro* de diferentes GAGs, se incubaron espermatozoides murinos capacitados en presencia de GSH y de los diferentes GAGs, tal como se detallara en Materiales y Métodos (MM, sección 4.2). En la figura 33 se muestra el porcentaje de descondensación total alcanzado, luego de 60 minutos de incubación, para cada una de las condiciones evaluadas. Sorpresivamente y, a

diferencia de lo observado previamente en espermatozoides humanos, el DS presentó actividad descondensante comparable a la de la heparina, aunque significativamente menor (H/GSH: 87 ± 2 % vs. DS/GSH: 67 ± 2 %, ***p < 0,001, ANOVA + Tukey-Kramer Multiple Comparison Test, n =3). Por otra parte, los restantes GAGs ensayados no presentaron actividad descondensante alguna, tal como se había observado en espermatozoides humanos (ANOVA + Tukey-Kramer Multiple Comparison Test, NS, vs. GSH o H, n = 3).

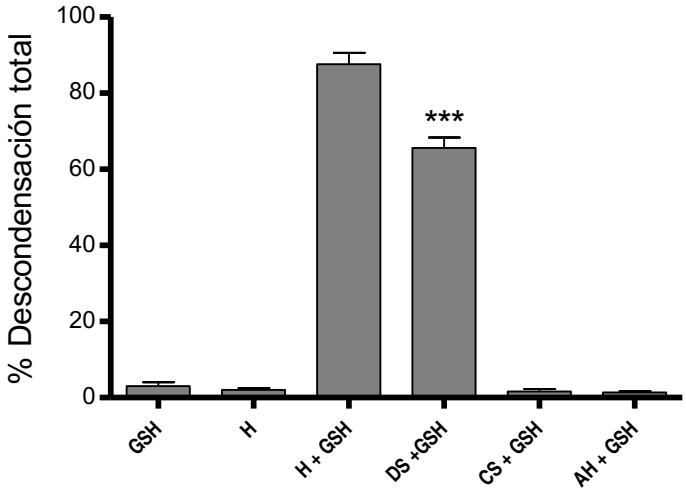


Figura 33. Evaluación de la capacidad descondensante in vitro de los glicosaminoglicanos (GAGs) sobre la cromatina de ratón*. Espermatozoides murinos capacitados, se descondensaron en presencia de GSH y cada uno de los siguientes GAGs heparina 46 µM (H +GSH), dermatán sulfato 46 µM (DS +GSH), condroitín sulfato 46 µM (CS + GSH), o ácido hialurónico 2mg/mL (AH + GSH). La descondensación total máxima alcanzada está expresada como %(M+G) y los resultados corresponden a la media ± EE de 3 experimentos independientes (*** p < 0,001, ANOVA + Tukey-Kramer Multiple Comparison Test, n = 3).*

1.3 Evaluación del posible efecto cooperativo entre tiorreductor (GSH) y aceptor de protaminas (GAG) en la descondensación in vitro de espermatozoides murinos

Con el fin de evaluar la existencia de un efecto cooperativo entre el GSH y los GAGs durante la descondensación *in vitro* de espermatozoides murinos, tal como la ya descripta por nuestro laboratorio en espermatozoides humanos, se comparó el efecto del agregado simultáneo y secuencial de los reactivos. Como puede observarse en la figura 34, la incubación secuencial con GSH y H produjo una disminución significativa de la descondensación, con respecto a los controles, independientemente del orden en que se utilizaran los reactivos (H/GSH: 7 ± 3 y GSH/H: 10 ± 2 vs. GSH+H: 58 ± 9; ***p <0,0001; ANOVA+ Tukey-Kramer Multiple Comparison Test, n=3). Lo mismo ocurrió cuando se realizaron incubaciones secuenciales de espermatozoides en presencia de GSH y dermatán sulfato (DS/GSH: 0,3 ± 0,3 y GSH/DS: 4,0 ± 1,0 vs. GSH+DS: 41,0 ± 9,0; ***p <0,0001, ANOVA+ Tukey-Kramer Multiple Comparison Test, n=3).

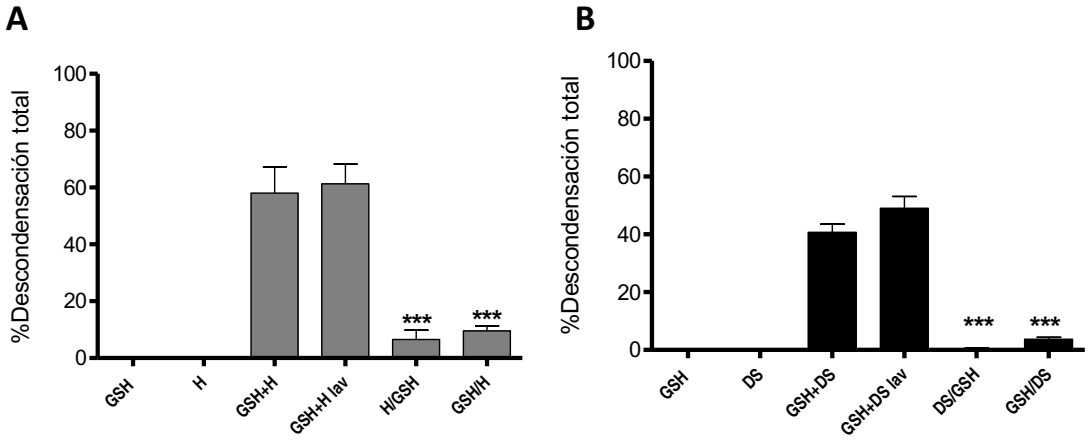


Figura 34. Efecto del agregado de GSH y GAG de manera secuencial sobre la descondensación in vitro de la cromatina de espermatozoides murinos. *Panel A: GSH y Heparina. Panel B: GSH y Dermatán sulfato. Espermatozoides incubados en presencia de GSH y H (GSH+H) o DS (GSH + DS) durante 45 minutos. Espermatozoides incubados en presencia de GSH y H o DS durante 15 minutos, centrifugados y luego incubados nuevamente en presencia de ambas moléculas durante 30 minutos más (GSH+H_{lav}; GSH+DS_{lav}). Espermatozoides incubados en presencia de GSH 15 minutos, lavados e incubados luego con H o DS durante 30 minutos adicionales (GSH/H; GSH/DS). Espermatozoides que sufrieron el tratamiento inverso: primero GAG 15 minutos y luego GSH 30 minutos más (H/GSH; DS/GSH). (***p <0,0001, ANOVA+ Tukey-Kramer Multiple Comparison Test, n=3).*

1.4 Cinética de descondensación en presencia de heparina o dermatán sulfato, y GSH

Dado que la actividad descondensante de H y DS fue semejante al cabo de los 60 minutos de incubación, tal como se pusiera de manifiesto en la sección anterior, resultó de interés evaluar la cinética de descondensación para cada uno de estos GAGs (figura 35). Las curvas obtenidas muestran claramente que la velocidad de descondensación fue mayor en presencia de H que de DS, dado que se alcanzó más rápidamente el nivel de descondensación máximo ($t_{0,5}$ = 8,79 ± 0,16 minutos), al incubar con este GAG que con DS ($t_{0,5}$ = 20,34 ± 2,35 minutos). Ambas curvas ajustaron a un modelo sigmoideo. Aunque a primera vista la curva A aparezca como hiperbólica, en realidad no lo es y puede observarse que es sigmoidea al comienzo de la misma. El análisis de correlación de Pearson, para cada curva por separado, dio una significancia estadística de p = 0,029 para el gráfico de heparina y de p = 0,0038 para el dermatán sulfato. La comparación simultánea de ambas curvas utilizando el programa Sigma Plot indicó que ambas curvas son significativamente diferentes tanto para su $t_{0,5}$ como también para el valor máximo alcanzado ($p < 0,05$; $R^2 = 0,9927$).

A **B**

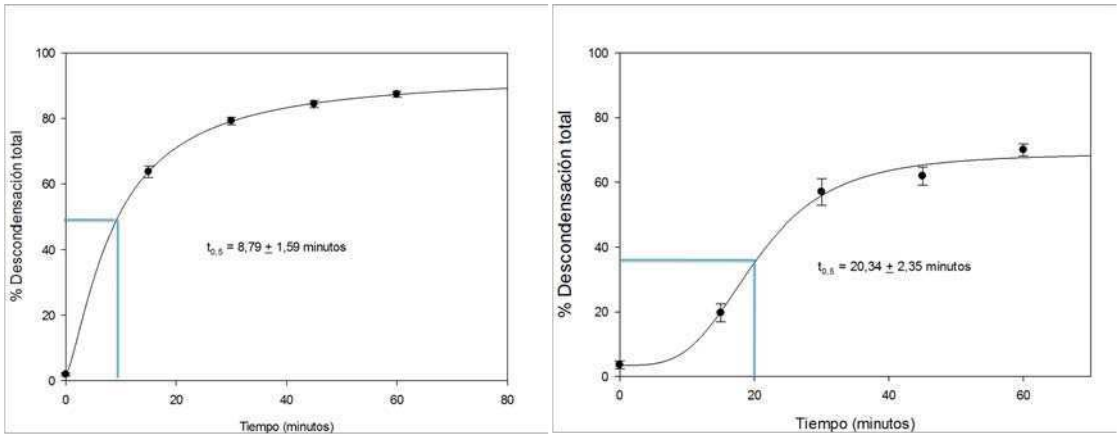


Figura 35. Cinética de descondensación de espermatozoides murinos. *Se representa el nivel de descondensación máximo alcanzado, en presencia de GSH (10 mM) y H (46 µM) o DS (46 µM), %(M+G), a lo largo del tiempo (15, 30, 45 y 60 minutos).* ***A:*** *H+GSH y* ***B:*** *DS+GSH. (Análisis de correlación de Pearson)*

1.5 Curvas dosis-respuesta de heparina y dermatán sulfato como agentes descondensantes in vitro de espermatozoides murinos

Con el objeto de evaluar la existencia de un posible efecto aditivo o sinérgico entre H y DS, se realizaron las correspondientes curvas dosis respuesta para cada GAG, para luego elegir la mejor combinación de concentraciones que permitiera poner en evidencia tal efecto. La Figura 36 muestra, entonces, el % de espermatozoides murinos descondensados luego de ser incubados durante 15 minutos en presencia de GSH y diferentes concentraciones de heparina (Panel A) o dermatán sulfato (Panel B). Dado que la curva de descondensación en función del tiempo (Figura 35) indicó que la descondensación máxima ocurría entre los 45 y 60 minutos, para evaluar la posible existencia de un efecto cooperativo entre la heparina y el dermatán sulfato, se realizaron las curvas dosis respuesta para cada GAG incubando los espermatozoides murinos durante quince minutos. En la figura 36 se muestran las curvas obtenidas para espermatozoides capacitados y no capacitados. El porcentaje de descondensación fue significativamente mayor que en el control (GSH solo, no mostrado en el gráfico) con todas las concentraciones de heparina evaluadas (Panel A), tanto para espermatozoides capacitados como no capacitados (ANOVA+ Tukey-Kramer Multiple Comparison Test, $p < 0,01$, $n = 4$). Sin embargo, como se puede ver en el panel B, la descondensación en presencia de dermatán sulfato a este tiempo recién se hizo evidente en espermatozoides capacitados y con la concentración más alta del GAG (46 µM, $p < 0.01$ comparado con GSH solo), y no se observó descondensación alguna en espermatozoides no capacitados. Considerando estos resultados, se eligieron como condiciones óptimas de descondensación, para evaluar un posible efecto sinérgico, las concentraciones de 0,46 µM de heparina y 46 µM de dermatán sulfato y utilizar para los ensayos tanto espermatozoides murinos capacitados como no capacitados.

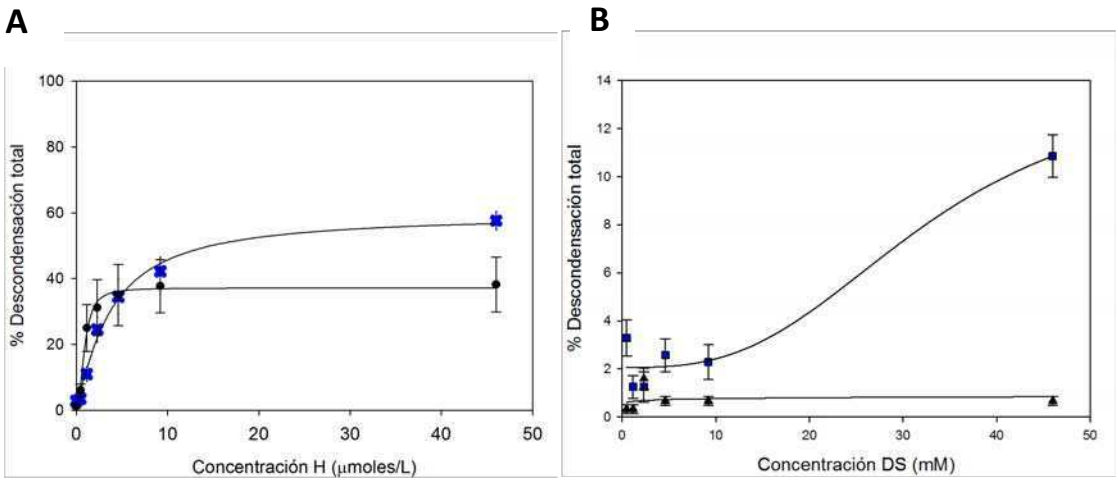


Figura 36. Curvas de dosis respuesta en presencia de heparina o dermatán sulfato. *Se evaluó la descondensación alcanzada por espermatozoides murinos (■) capacitados y (●) no capacitados después de 15 minutos de incubación con distintas concentraciones de heparina o dermatán sulfato (0,46- 1,15- 2,3- 4,6- 9,2 ó 46 µM) y GSH (10 mM).* ***A****: espermatozoides incubados en presencia de heparina.* ***B****: espermatozoides incubados en presencia de dermatán sulfato (ANOVA+ Tukey-Kramer Multiple Comparison Test, p < 0,01, n = 4).*

1.6 Efecto sinérgico entre heparina y dermatán sulfato sobre la descondensación in vitro de espermatozoides murinos.

Habiendo seleccionado las concentraciones adecuadas para analizar la existencia de posibles efectos aditivos o potenciados entre ambos GAGs como agentes descondensantes, se comparó la descondensación *in vitro* de espermatozoides murinos en presencia de una combinación de los mismos con la obtenida con cada uno de ellos por separado. El efecto se evaluó a distintos tiempos, tanto en espermatozoides capacitados (figura 37, Panel A) como no capacitados (Figura 37, Panel B).

Como puede observarse en la figura 37, los espermatozoides incubados tanto con heparina como con DS presentaron una cinética de descondensación sigmoidea pero los $t_{0,\ 5}$ fueron diferentes. La heparina descondensó más rápidamente a los espermatozoides capacitados (panel A) ($t_{0,5}$ = 35,45 ± 2,17 minutos) que el dermatán sulfato ($t_{0,5}$ = 43,55 ± 2,19 minutos), pero la combinación de ambos redujo el tiempo de descondensación a casi la mitad ($t_{0,5}$ = 17,96 ± 1,20 minutos). De todas maneras, las tres curvas alcanzaron el mismo grado de descondensación máxima (Sigmoidal dose-response curve fit, R^2= 0,8585, modelo preferido, diferente EC_{50}). La misma reducción en el tiempo se observó en espermatozoides no capacitados, aunque la diferencia fue menos marcada y se alcanzó un grado menor de descondensación que con los capacitados.

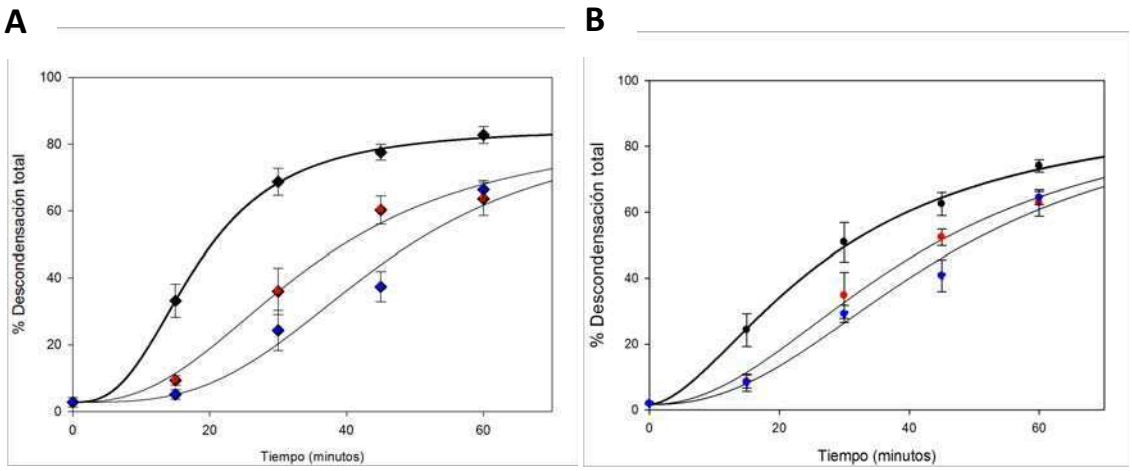


Figura 37. Cinética de descondensación in vitro de espermatozoides murinos en presencia de GSH, H y DS. *Se analizó la existencia de efecto sinérgico de ambos GAGs, incubando los espermatozoides en presencia de (●) heparina (0, 46 µM), (●) dermatán sulfato (46 µM) o (●) ambas moléculas juntas; en presencia de 10 mM de GSH.* ***A:*** *espermatozoides capacitados.* ***B:*** *espermatozoides no capacitados. El porcentaje de descondensación está expresado como la suma de los porcentajes de espermatozoides medianamente descondensados más los groseramente descondensados %(M+G). Los resultados corresponden a la media ± EE de 5 experimentos distintos (Sigma Plot: Sigmoidal dose-response curve fit, modelo preferido, diferente* EC_{50}*).*

La combinación de la menor concentración de heparina (0,46 µM) con la mayor concentración de dermatán sulfato (46 µM) produjo (siempre en presencia de GSH) un aumento significativo en el porcentaje de descondensación alcanzado al cabo de 15 minutos de incubación, con respecto a cada GAG por separado, tanto en espermatozoides capacitados (H+DS: 33 ± 9 vs H: 5 ± 2 ó DS: 4 ± 2, ANOVA + Tukey-Kramer Multiple Comparison Test, **p < 0,01; n = 5) como en no capacitados (H+DS: 18,0 ± 4,0 vs. H: 6,0 ± 2,0; (a) p < 0,05, H+DS: 18,0 ± 4,0 vs DS: 0,8 ± 0,4; (b) p<0,001; n = 3, ANOVA + Tukey-Kramer Multiple Comparison Test) (Figura 38, Panel A). Asimismo, al comparar el efecto de ambas moléculas utilizadas simultáneamente con la suma algebraica de los valores de cada una de ellas por separado, se evidenció claramente la existencia de un efecto sinérgico, tanto en espermatozoides capacitados (H+DS: 33 ± 9 vs Suma H+DS: 9 ± 4, *p < 0,05, n= 4, ANOVA + Tukey-Kramer Multiple Comparison Test) como en espermatozoides no capacitados (H+DS: 18 ± 4 vs Suma H+DS: 7 ± 2, (c) p < 0,05; n= 3). Tal como era de esperar, esta diferencia se hizo cada vez menos evidente a medida que aumentó el tiempo de incubación, conforme el grado de descondensación se acercaba al máximo. (Figura 38, panel B).

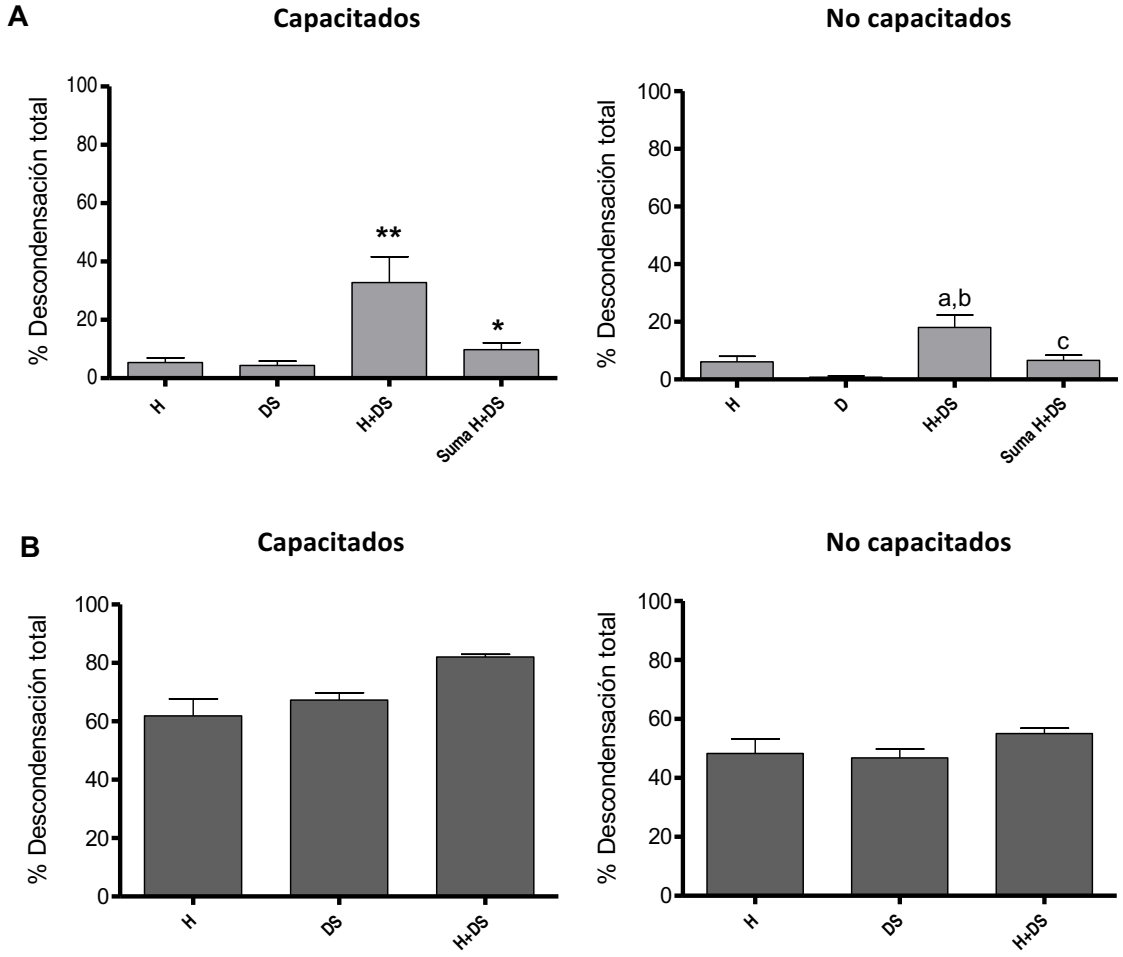


Figura 38. Efecto sinérgico entre heparina y dermatán sulfato sobre la descondensación in vitro de la cromatina. *Espermatozoides capacitados y no capacitados se incubaron en presencia de H (0,46 µM), DS (46 µM) o una combinación de ambos, siempre en presencia de GSH (10 mM).* ***A****: 15 minutos de incubación.* ***B****: 60 minutos de incubación. La última columna en cada gráfico indica la suma algebraica de los valores de heparina y dermatán sulfato por separado. En ambos casos, la combinación de ambas moléculas (H + DS) resultó en un aumento significativo comparado con los efectos individuales (*p < 0, 05, **P < 0,01, a: H+DS vs. H, p < 0,05, b: H+DS vs DS, p<0,001, c: H+DS vs Suma H+DS; ANOVA + Tukey-Kramer Multiple Comparison Test, n de cada grupo =* ver texto).

1.7 Análisis in silico de las características estructurales de las protaminas y los glicosaminoglicanos (heparina y dermatán sulfato)

Con el objeto de tratar de explicar el comportamiento disímil de los dos glicosaminoglicanos utilizados, se comenzó a estudiar las características moleculares de las moléculas potencialmente involucradas en el proceso de descondensación.

A tal fin, lo primero que se hizo fue obtener de la base de datos Uniprot la secuencia aminoacídica de las protaminas murinas P1 (http://www.uniprot.org/uniprot/P02319) y P2 (http://www.uniprot.org/uniprot/P07978), que se muestran en la figura 39.

Protamina P1 ratón (pI/PM: 12,07 / 6958,41)

MARYRCCRSKSRSRCRRRRRRCRRRRRRCCRRRRRRCCRRRRSYTIRCKKY

Protamina P2 ratón

VRYRMRSPSEGPHQGPGQDHEREEQGQGQGLSPERVEDYGRTHRGHHHHRHR RCSRKRLHRIHKRRRSCRRRRRHSCRHRRRHRRGCRRSRRRRRCRCRKCRRHHH

Protamina P2 procesada (pI/ PM: 12,48 / 8594, 08)

RGHHHHRHRRCSRKRLHRIHKRRRSCRRRRRHSCRHRRRHRRGCRRSRRRRRCRC RKCRRHHH

Figura 39: Secuencia aminoacídica de las protaminas murinas P1 y P2. *Se indican los aminoácidos fuertemente básicos (R= arginina, K= lisina), considerados levemente básicos (H= histidina, fundamentalmente por la presencia de nitrógeno protonable, aunque no debería ser por el pKa de su grupo imidazol) y el aminoácido ácido glutámico (E). También se muestra el punto isoeléctrico de cada uno (pI) y el peso molecular. En la protamina P2, se ha colocado en celeste la porción que se escinde para dejar la forma procesada.*

Este dato permitió poner en evidencia que entre ambas moléculas no existe una diferencia sustancial en la carga neta, aunque sí en el peso molecular.

Con el objeto de estudiar un poco mejor la disposición espacial de las dos protaminas involucradas en la interacción con el ADN, se utilizó el servidor Swiss-Model y, de bibliografía se obtuvo el modelo tridimensional de dos moléculas que aparecen como ligadoras de heparina (Sección 4.6 de MM). Usando el modelado por homología y con estas dos moléculas como templado para las protaminas P1 y P2, se consiguió una aproximación a la disposición espacial tal como se muestra en las figuras 40 y 41.

El análisis preliminar del modelado especial de ambas protaminas, indica que podrían tener una conformación similar a otras proteínas que ligan heparina. Al comparar P1 y P2, se puede observar que la segunda, con un peso molecular mayor, deja “colgando” un extremo hacia el amino terminal, que hace recordar a la cola de las histonas en el nucleosoma.

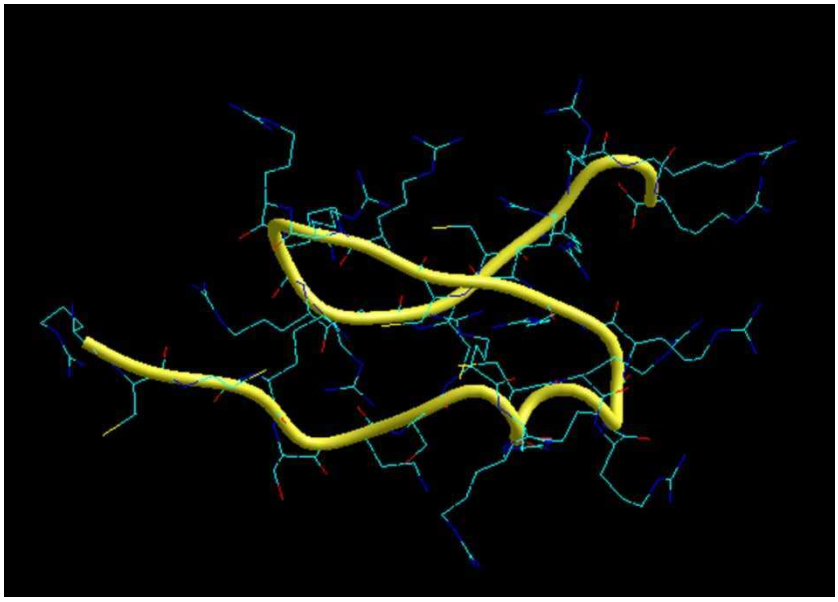


Figura 40. Modelado por homología de la protamina P1. *El molde (templado) para la estructura modelada es el dominio de reconocimiento de heparina en una isoforma alternativa del VEGF-A (el VEGF55)(Zhao et al. 2012).*

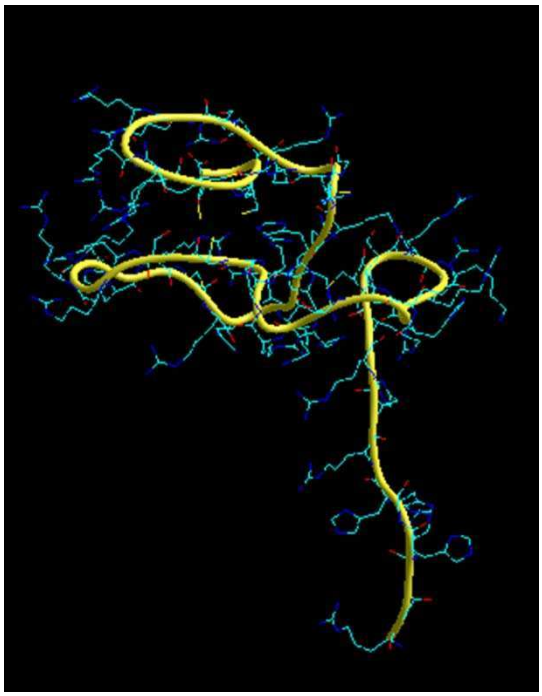


Figura 41. Modelado por homología de la protamina P2. *En esta figura se muestra la similitud de la disposición espacial de esta secuencia procesada con el"RING domain de la synaptotagmin-like protein 4" (Tarantini et al. 1998)*.

Al analizar la carga total de cada una de estas moléculas utilizando el programa HyperChem, pudo observarse (Figura 42 y Figura 43), que las dos protaminas presentan una distribución muy similar, volviendo a quedar en evidencia la "cola" de P2 hacia el extremo amino terminal.

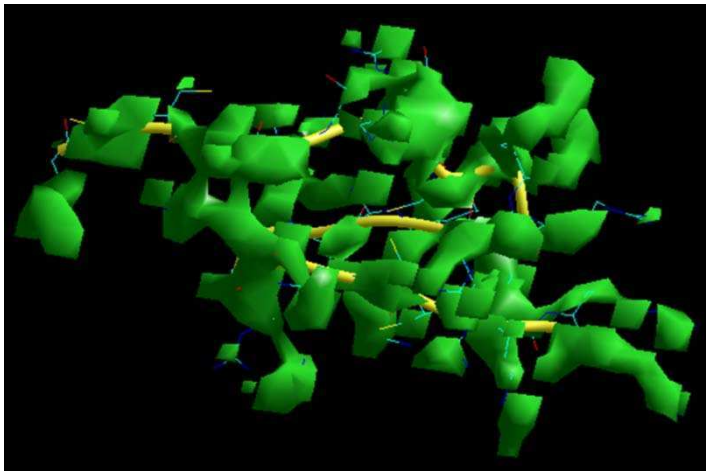


Figura 42. Carga total presente en la molécula de P1. *Las zonas verdes indican la isosuperficie electrostática de la molécula.*

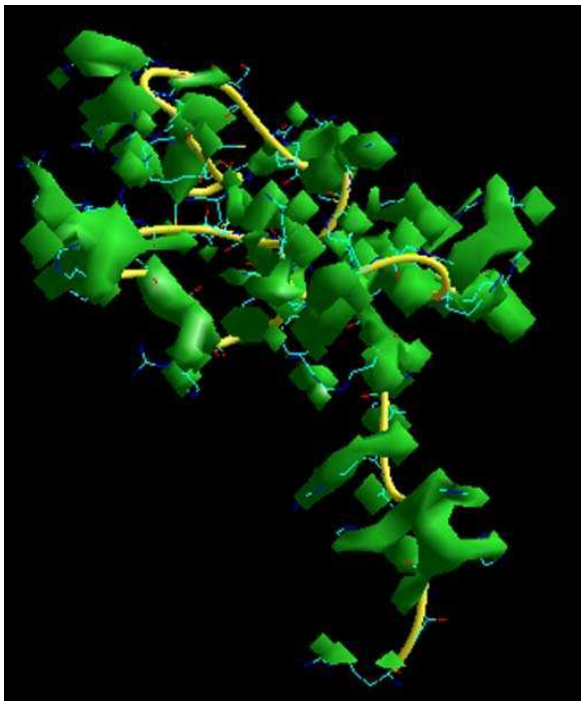


Figura 43. Carga total presente en la molécula de P2. *Las zonas verdes indican la isosuperficie electrostática de la molécula, mostrando que hay una distribución similar de carga a P1, a excepción del extremo que cuelga hacia el extremo amino terminal de P2.*

Cuando se hizo un análisis similar para los GAGs involucrados en la descondensación de la cromatina, la heparina y el dermatán sulfato, se contó con el análisis cristalográfico de estas moléculas en la base de datos PolySac3DB, tal como se describiera en la sección 4.6 de MM.

Usando las coordenadas espaciales para una molécula constituida por 6 unidades disacarídicas en cada caso, el análisis con el programa HyperChem mostró las siguientes características (Figura 44 y Figura 45).

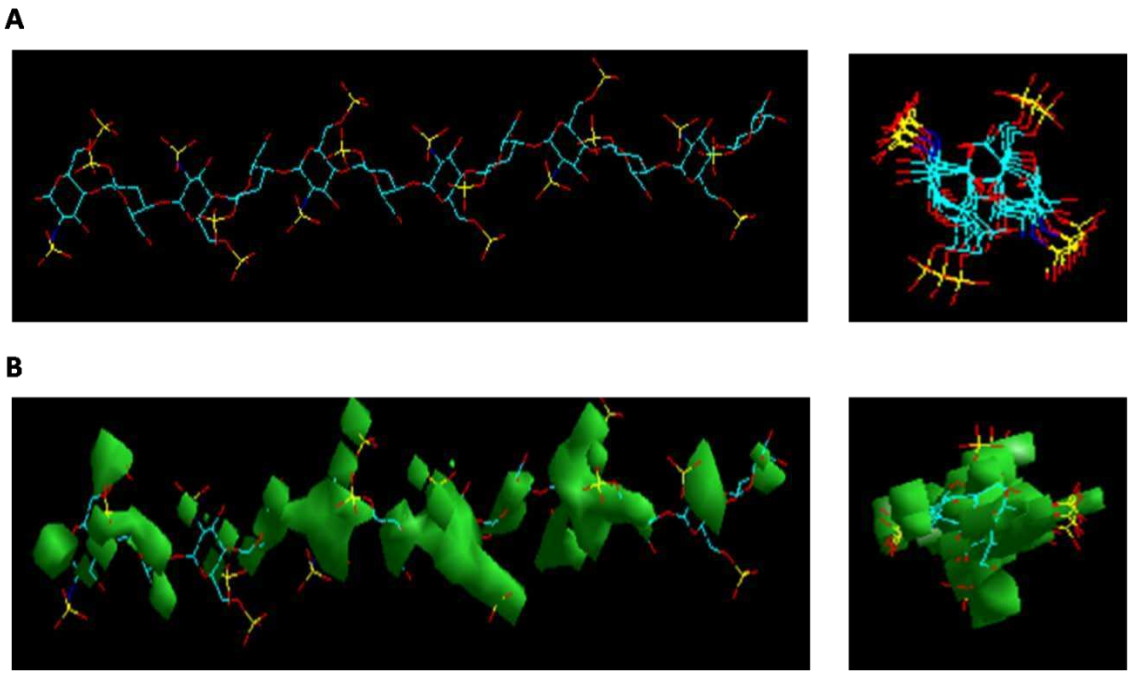


Figura 44. Representación espacial de la distribución de los átomos en un hexadisacárido de heparina. *En el panel superior**, A:** conformación espacial adoptada por la molécula de H en la que se distinguen las cargas negativas (sulfatos en amarillo) en cuatro puntos muy característicos**.** En el panel inferior**, B:** la misma disposición espacial mostrada en A, pero poniendo en evidencia la isosuperficie electrostática, en verde, y mostrando la localización hacia donde se encuentran los grupos sulfato mediante el programa HyperCHem.*

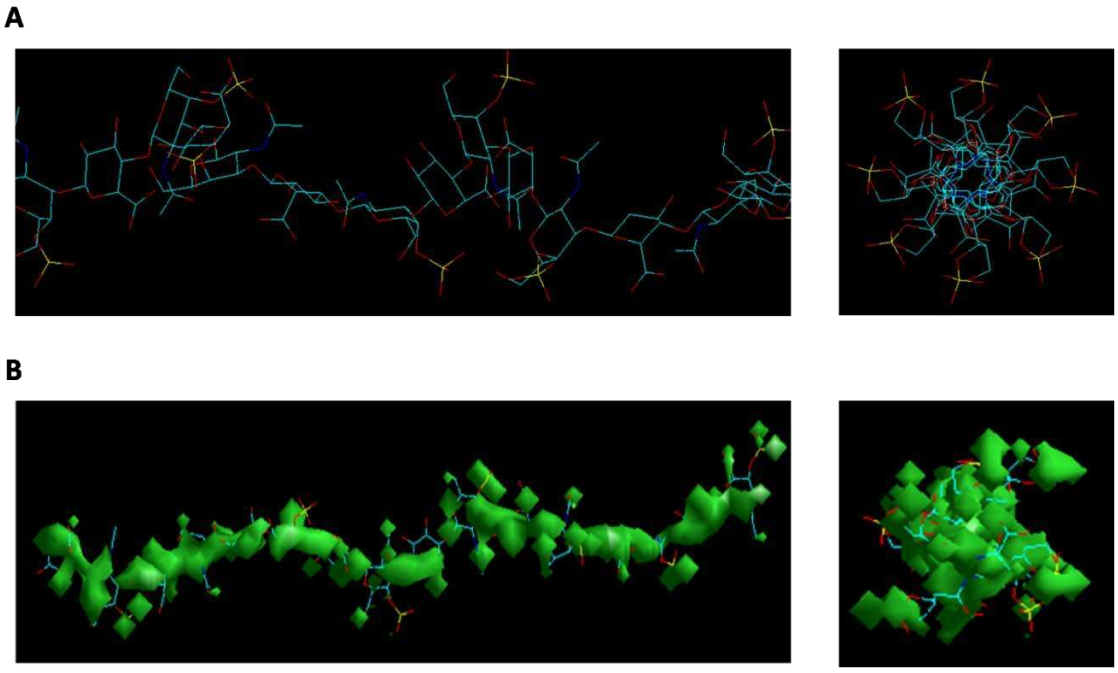


Figura 45. Representación espacial de la distribución de los átomos en un hexadisacárido de dermatán-4-sulfato. A: *conformación espacial adoptada por la molécula de DS: un eje central con una disposición de las cargas negativas (sulfatos en amarillo) muy ordenada y asemejándose a lo que se conoce como la distribución de cargas en el ADN.* ***B:*** *la misma disposición espacial mostrada en A, pero poniendo en evidencia la isosuperficie electrostática, en verde, y mostrando la localización hacia donde se encuentran los grupos sulfato mediante el programa Hyperchem.*

Comparando ambas figuras para los GAGs, puede observarse una distribución más homogénea de cargas en el caso del dermatán sulfato, mientras que para la heparina estarían un poco más localizadas. Si bien lo realizado hasta el momento con estas simulaciones no alcanza para conformar un modelo de interacción ADN-protamina-GAG, permite hipotetizar que cada GAG puede interaccionar con el ADN en puntos de compactación cromatínica diferentes. Por ejemplo, la molécula de P2, que remite a un parecido a las histonas por la "cola" colgante, podría interaccionar con el ADN en forma similar y generar puntos de compactación más laxos, permitiendo una mejor entrada del dermatán sulfato, con una disposición espacial de las cargas más parecida a la del ADN. Por el contrario, la protamina P1, más compacta en su estructura, podría generar una condensación mayor en la cromatina y, por lo tanto, dificultar el ingreso de la molécula descondensante. En esta situación, la heparina con mayor carga negativa por la presencia de más grupos sulfato que en el dermatán y la ubicación espacial más precisa, podría ser la molécula indicada para tal fin.

Si consideramos que la presencia de histonas remanentes es mínima y, probablemente también lo sea el porcentaje de cromatina con condensación más laxa, podría explicarse la diferencia temporal y de efectividad en la acción de cada molécula de GAG.

1.8 Efecto de los agentes descondensantes sobre la integridad de la membrana plasmática y el núcleo del espermatozoide murino.

Una vez caracterizado el sistema de descondensación *in vitro* en presencia de GAGs y GSH en espermatozoides murinos, resultó de interés evaluar el efecto de los agentes descondensantes sobre la ultraestructura del espermatozoide durante este proceso por medio de microscopía electrónica de transmisión. En primer lugar, se incubaron espermatozoides capacitados en presencia de GSH sólo, GSH+H, GSH+DS, o la combinación de estos dos últimos (GSH+H+DS). Luego de la descondensación, las muestras se enviaron al centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (CEGYR) donde fueron procesadas por el Dr. Cristian Alvarez Sedó para su observación al microscopio electrónico de transmisión (figura 46).

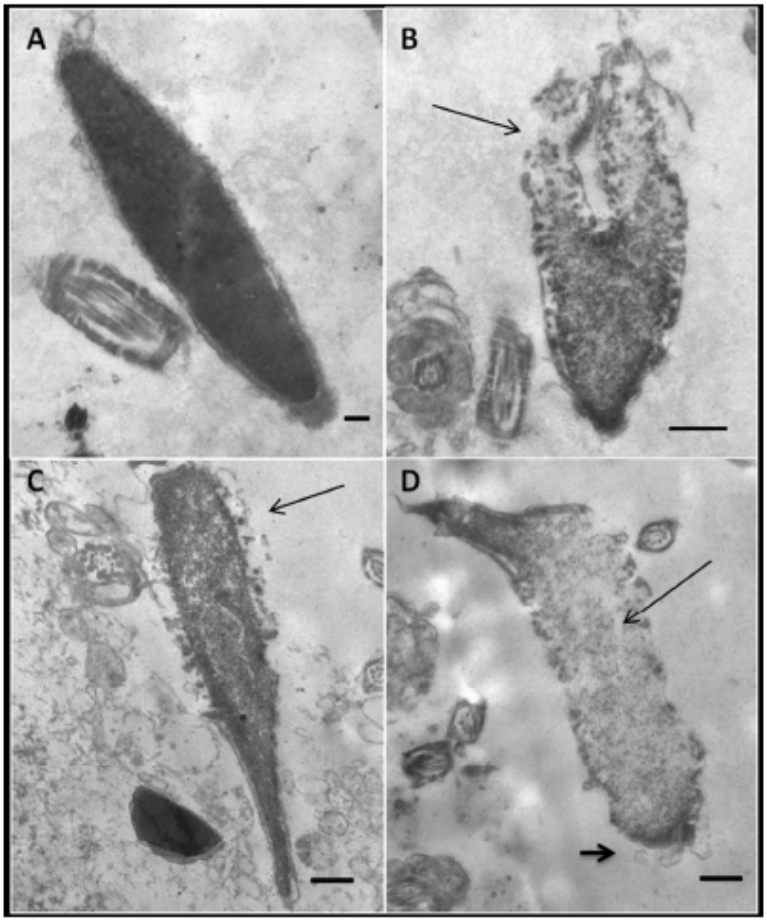


Figura 46. Microscopia electrónica de transmisión de espermatozoides capacitados y descondensados con heparina, dermatán sulfato o ambos. ***A:*** *GSH,* ***B:*** *GSH + H,* ***C:*** *GSH + DS y* ***D:*** *GSH+H+DS. Los espermatozoides tratados con GSH (A) presentaron su núcleo completamente condensado, con la envoltura nuclear y las membranas externas intactas. Luego de la incubación con heparina + GSH (B) se observó que la descondensación comienza desde la región caudal de la cabeza del espermatozoide (Flecha negra), y se hizo evidente el desarreglo en la membrana. Las incubaciones con DS +GSH (C) también produjeron la descondensación desde la zona caudal (Flecha), pero la cromatina se mantuvo más condensada que cuando los espermatozoides se incubaron en presencia de heparina. Cuando se utilizaron ambos GAGs simultáneamente (D) se observó un mayor grado de descondensación (con presencia de áreas gránulo-fibrilares y "lacunares", indicadas con flechas), con las membranas totalmente desorganizadas, incluyendo las membranas acrosomales (flecha pequeña). En la región cefálica, se puede ver que permanecen los residuos de cromatina todavía empaquetada. Barras de escala= A: 0,2; B-D: 0,5 µm*.

Tal como se esperaba, los núcleos de los espermatozoides tratados con GSH sólo, permanecieron condensados y conservaron la envoltura nuclear y el resto de las membranas intactas (Figura 46, panel A). Cuando los espermatozoides se incubaron en presencia de GSH+H, se pudo ver claramente que la descondensación comenzaba desde la zona *caudal* de la cabeza del espermatozoide, en donde se insertaba la cola, y las membranas se desorganizaban (figura 46, panel B). Los espermatozoides descondensados en presencia de GSH+DS, mantuvieron las características observadas en el panel B pero manifestando un grado de descondensación menor que el

observado en presencia de GSH+H (Figura 46, panel C). Finalmente, y confirmando la existencia de un efecto sinérgico entre la heparina y el dermatán sulfato sobre la descondensación cromatínica *in vitro*, al combinar ambos GAGs se pudo observar un mayor grado de descondensación que el correspondiente a cada GAG por separado (figura 46, panel D).

Capítulo II -Estudio del efecto de tóxicos sobre diversos parámetros de la funcionalidad espermática, con especial énfasis en la descondensación cromatínica.

Una vez caracterizado el sistema de descondensación *in vitro* en espermatozoides murinos, se planteó la posibilidad de evaluar el uso del mismo para analizar el efecto *in vitro* del endosulfán e *in vivo* del etanol.

2. ENDOSULFÁN

Se evaluó el efecto del endosulfán sobre distintos aspectos de la cromatina de espermatozoides recuperados de ratones F1 resultante del apareo de las cepas endocriadas Balb/C (♂) x C57 (♀) y sobre espermatozoides humanos.

Efecto del endosulfán sobre los espermatozoides murinos

2.1 Efecto del endosulfán in vitro sobre la motilidad de espermatozoides murinos.

Se evaluó el efecto del endosulfán, tanto del compuesto puro como de dos formulaciones comerciales (Master® y Zebra Ciagro®), sobre la motilidad espermática, incubando espermatozoides en presencia del plaguicida, tal como se describiera en MM (sección 5.1) Los controles incluyeron espermatozoides incubados en medio de cultivo A+B (MC) o DMSO. En la figura 47, se puede ver claramente el efecto negativo del endosulfán (100 µM), sobre la motilidad de los espermatozoides murinos (AI: 6,0 ± 3,0 Master®: 10,0 ± 5,0 Zebra Ciagro®: 1,0 ± 0,3 vs MC: 50,0 ± 4,0 ***p< 0,001; ANOVA+ Tukey-Kramer Multiple Comparison Test, n = 5).

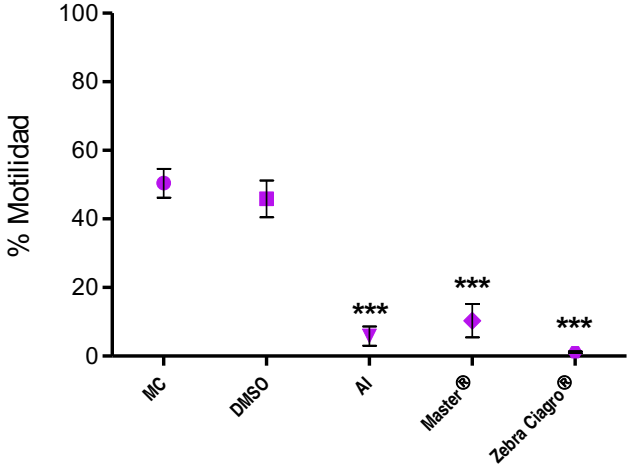


Figura 47. Efecto in vitro del endosulfán sobre la motilidad de espermatozoides murinos. *Se incubaron espermatozoides capacitados en medio A+B (MC), en DMSO, en presencia de principio activo (AI), de endosulfán formulado Master®, y del endosulfán formulado Zebra Ciagro® durante 15 minutos La motilidad se evaluó sobre un total de 200 células (***p < 0,001, ANOVA+ Tukey-Kramer Multiple Comparison Test; n = 7).*

2.2 Efecto del endosulfán sobre la descondensación in vitro de espermatozoides murinos capacitados

Para evaluar el efecto de este tóxico sobre la descondensación *in vitro* se incubaron espermatozoides en medio de cultivo A+B, DMSO o diferentes concentraciones de endosulfán durante 15 minutos, e inmediatamente después se descondensaron en presencia de GSH +H, en las condiciones descriptas anteriormente (MM, Sección 5.2). La exposición de los espermatozoides, tanto a endosulfán puro (Figura 48) como a las dos formulaciones comerciales (Figura 49) en su mayor concentración (100 µM), produjo un aumento significativo sobre la descondensación *in vitro (*AI: 78 ± 4 vs. DMSO: 45,5 ± 4,7, ***p< 0,001; n=6; Master®: 82 ± 4 vs. DMSO: 47,4 ± 6,7, **p< 0,01; n=5; Zebra Ciagro®: 90 ± 3 vs. DMSO: 49,6 ± 6,3, ***p< 0,001; n=5; ANOVA + Tukey-Kramer Multiple Comparison Test) (Figura 48), mientras que el resto de las concentraciones no parecieron modificar la tasa de descondensación cromatínica. Como consecuencia de esto, para realizar los siguientes experimentos y con el fin de evaluar los mecanismos mediante los cuales estaría actuando el plaguicida, se eligió una concentración de endosulfán igual a 100 µM.

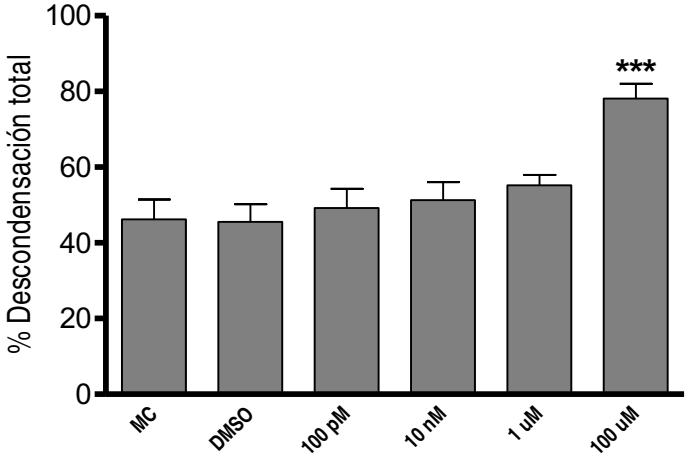
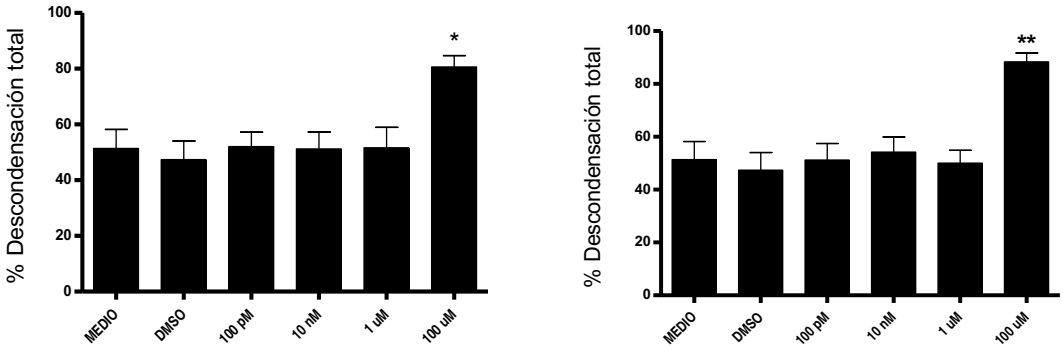


Figura 48. Curva dosis - respuesta de endosulfán puro con respecto a la descondensación cromatínica in vitro de espermatozoides murinos capacitados. *Los espermatozoides se expusieron durante 15 minutos a distintas concentraciones de endosulfán puro (100 pM, 10 nM, 1 µM, 100 µM), antes de ser descondensados en presencia de H y GSH durante 30 minutos. MC: espermatozoides incubados en medio de cultivo A+B (control), DMSO: espermatozoides incubados con DMSO (control de solvente). (AI vs DMSO: ***p < 0,001, ANOVA + Tukey-Kramer Multiple Comparison Test; n = 6).*



.

Figura 49. Curvas dosis – respuesta de endosulfán formulado con respecto a la descondensación cromatínica in vitro de espermatozoides murinos capacitados. *Los espermatozoides se expusieron durante 15 minutos a distintas concentraciones del plaguicida formulado Master® o Zebra Ciagro® (100 pM, 10 nM, 1 µM, 100 µM) antes de ser descondensados en presencia de H (4,6 µM) y GSH (10 mM) durante 30 minutos. MC: espermatozoides incubados en medio de cultivo (control), DMSO: espermatozoides incubados con DMSO (control de solvente) (Master® vs DMSO: **

formulaciones comerciales tal como se describiera anteriormente, se descondensaron luego en presencia de H (2,3 µM) y GSH (10 mM) de la forma habitual (MM Sección 4.1), y se evaluó el grado de fragmentación del ADN espermático mediante la técnica de TUNEL (MM Sección 5.4). Los espermatozoides positivos para TUNEL mostraron marca intensa fluorescente mientras que los espermatozoides negativos tuvieron marca tenue o nula, tal como se puede observar en la Figura 50. La figura 51 (C y E), muestra que el porcentaje de TUNEL fue significativamente mayor que el control, luego de la incubación de los espermatozoides capacitados en presencia tanto de endosulfan Master® (Master®: 47 ± 12 vs. DMSO: 19 ± 5, *p< 0,05; n=5) como de endosulfán Zebra Ciagro® (Zebra Ciagro®: 35 ± 7 vs. DMSO: 17 ± 5, *p< 0,05; n=5). En el caso en que los espermatozoides fueron incubados con el principio activo no se encontraron diferencias significativas entre el % de TUNEL de estos y el control de DMSO (Figura 51A) (ANOVA + Tukey-Kramer Multiple Comparison Test). En la figura, además, se pone de manifiesto (Figura 51 B, D y F), que el nivel de descondensación fue significativamente mayor al de los controles en espermatozoides incubados en presencia de endosulfán puro (AI: 56 ± 5 vs. DMSO: 41 ± 3, *p< 0,05; n=5) (Figura 51 B) o de Zebra Ciagro® (Zebra Ciagro®: 85 ± 5 vs. DMSO: 41 ± 3, ***p< 0,001; n=5) (Figura 51 F). Si bien, en presencia de endosulfán Master® se observó un posible aumento en el nivel de descondensación en las condiciones realizadas (Figura 51 D), éste no fue significativo comparado con el control (ANOVA + Tukey-Kramer Multiple Comparison Test).

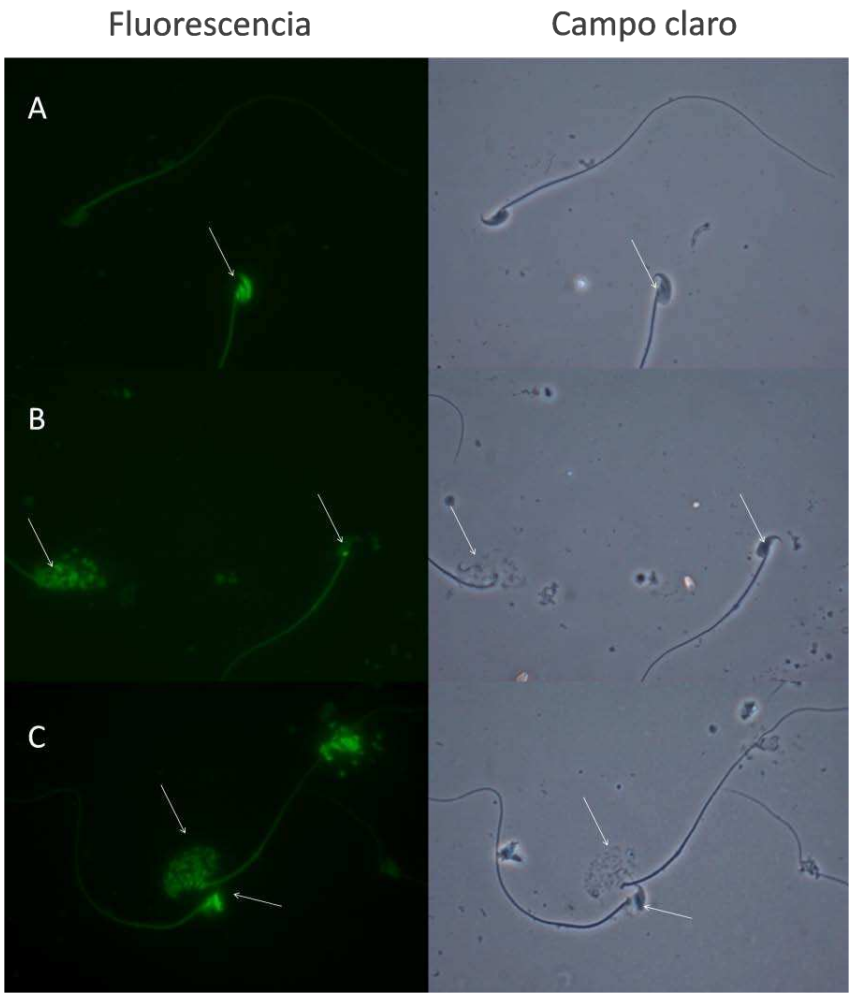


Figura 50. Ensayo de TUNEL sobre espermatozoides murinos previamente expuestos al plaguicida y descondensados*. Espermatozoides murinos capacitados se preincubaron 15 minutos en presencia de medio A+B (A), DMSO (B) o endosulfán (C) puro o sus formulaciones comerciales y se descondensaron en presencia de heparina (2,3 µM) y GSH (10 mM) durante 30 minutos. Luego, se realizó un ensayo de TUNEL sobre las muestras y se determinó el porcentaje del mismo en el microscopio de fluorescencia. Las flechas indican la tinción positiva en espermatozoides intactos o descondensados (Magnificación original 400X).*

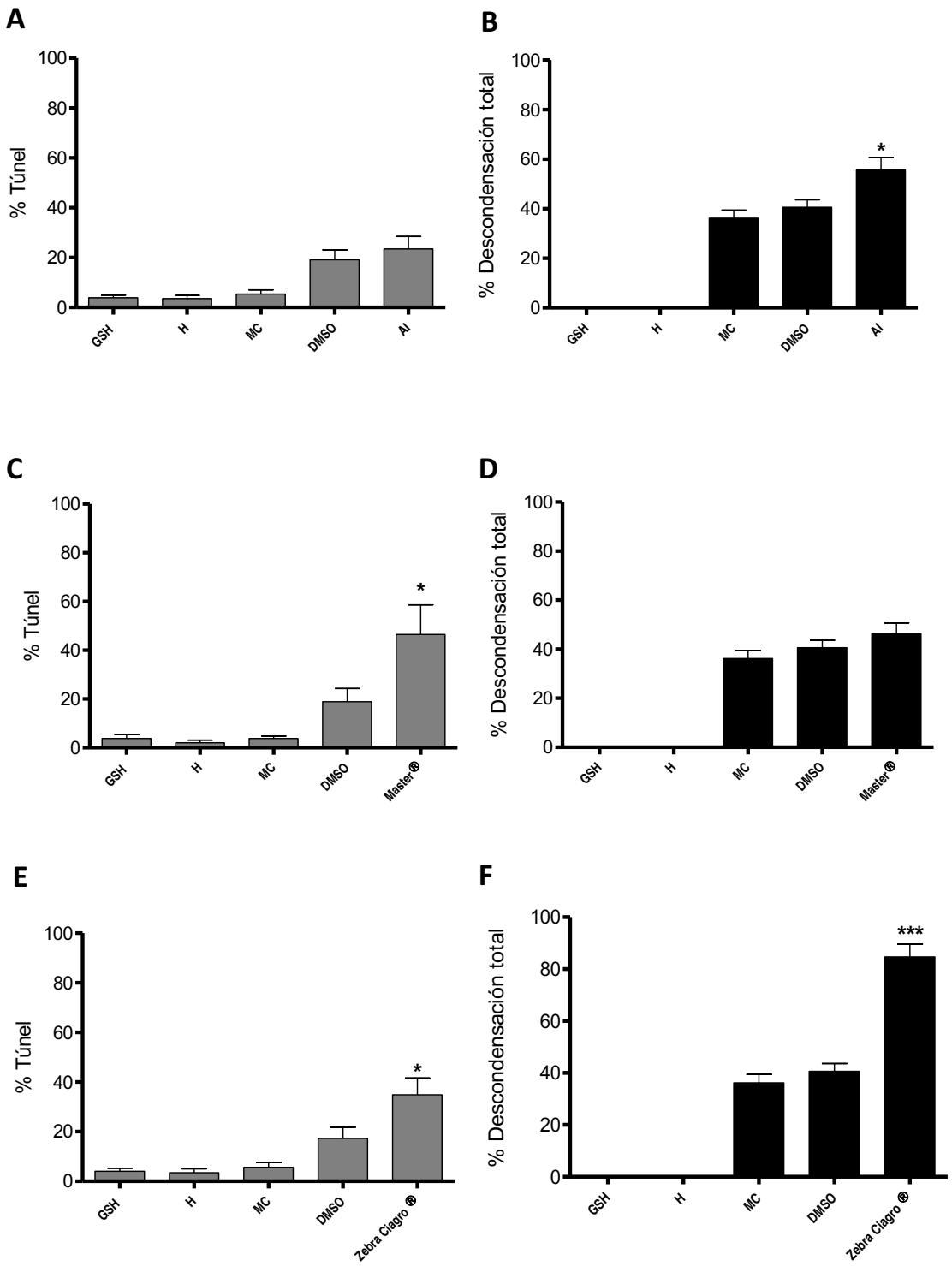


Figura 51. Grado de fragmentación del ADN de espermatozoides murinos expuestos a endosulfán y luego descondensados en presencia de H y GSH. *Espermatozoides murinos capacitados se preincubaron con endosulfán puro (AI) o sus dos formulaciones comerciales y se descondensaron luego, en presencia de H (2,3 µM) y GSH (10 mM). Se evaluó la fragmentación del ADN espermático mediante la técnica de TUNEL (A, C y E) y el % descondensación (B, D y F) de la manera habitual.* ***A y B:*** *espermatozoides preincubados con endosulfán puro,* ***C y D:*** *espermatozoides preincubados con Master®,* ***E y F:*** *espermatozoides preincubados con Zebra Ciagro® MC: medio de cultivo, H: heparina. (*P< 0, 05, ***p<0, 001, ANOVA+ Tukey-Kramer Multiple Comparison Test, n = 5).*

2.4 Correlación entre la descondensación de la cromatina espermática y la fragmentación del ADN

Dado que la fragmentación del ADN se evaluó en espermatozoides murinos incubados en condiciones descondensantes, fue necesario descartar que la descondensación *in vitro per se* fuera la responsable del aumento en el porcentaje de TUNEL observado luego de la preincubación con endosulfán. Para ello se evaluó la posible existencia de una correlación entre el porcentaje de descondensación total de la cromatina y la fragmentación del ADN espermático.

Tal como se muestra en la figura 52, en todas las condiciones experimentales los porcentajes de espermatozoides con TUNEL positivo fueron independientes del porcentaje de descondensación de la cromatina (Endosulfán puro (B): r^2 = -0,08824 p = 0,9194: Endosulfán Master® (C): r^2 = 0,6000 p = 0,3500; Endosulfán Zebra Ciagro® (D): r^2 = -0,1000 p = 0.9500); correlación de Spearman). En la figura, panel A, si bien la correlación parece alta no resultó significativo, probablemente por un n pequeño, r^2 = 0,7000 (Spearman) p=0,2333). Este resultado es interesante y merece ser investigado más en detalle porque podría indicar una diferencia debida a la presencia de las sustancias que acompañan al principio activo.

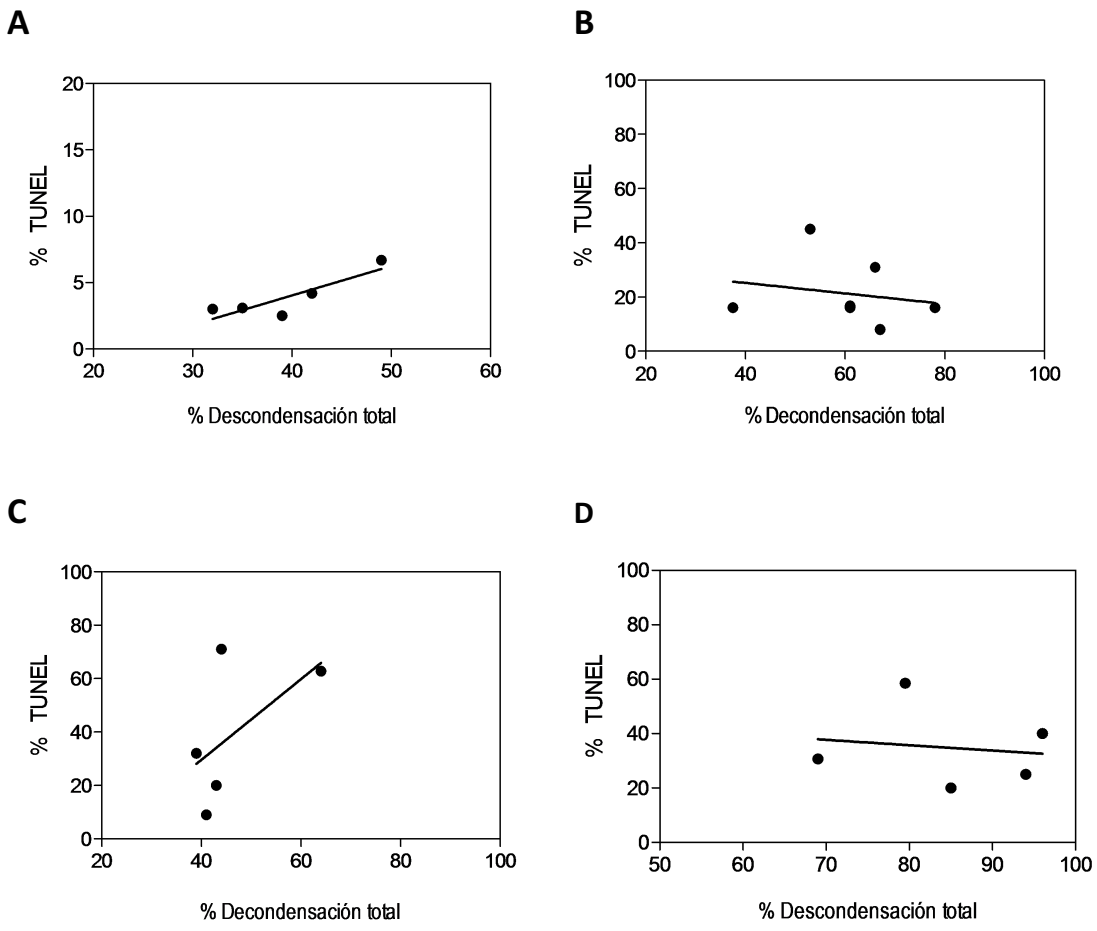


Figura 52. Correlación entre la descondensación in vitro de la cromatina y la fragmentación del ADN de espermatozoides murinos capacitados, preincubados con endosulfán e incubados en presencia de H y GSH. *Se evaluó la posible correlación entre el grado de descondensación de la cromatina y el nivel de fragmentación del ADN en espermatozoides murinos capacitados que fueron preincubados con endosulfán y, luego, descondensados en presencia de GSH+H.* ***A:*** *espermatozoides preincubados en medio de cultivo,* ***B:*** *espermatozoides preincubados con endosulfán puro* ***C:*** *espermatozoides incubados con Master® y* ***D:*** *espermatozoides incubados con Zebra Ciagro® (Correlación de Spearman, n=5).*

2.5 Evaluación del estado redox de los grupos tiol de los espermatozoides en presencia de endosulfán puro por marcación con monobromobimane.

Dado que el endosulfán incrementó la descondensación cromatínica en respuesta a H y GSH, se evaluó la posibilidad de que este efecto se llevara a cabo a través del incremento de la cantidad de tioles libres en las protaminas, a través de la tinción con el reactivo tiólico fluorescente monobromobimane (mBBr), como se describiera en MM (Sección 5.4) (Figura 53). Se cuantificó la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (UA) para cada espermatozoide y se calculó la media de intensidad de fluorescencia en cada condición experimental. Tal como puede verse en la figura 54, no se observaron diferencias significativas en la intensidad de la marca en aquellos espermatozoides incubados en presencia del plaguicida, comparado con los controles (Medio A+B/GSH (A): 53 ± 16; Medio A+B/GSH+H (B): 148 ± 7, DMSO/GSH+H (C): 166 ±

6, AI/GSH+H (D): 140 ± 18). ANOVA con medidas repetidas + Prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, NS, n=3). Tampoco se modificó el tamaño de las cabezas de los espermatozoides a los 5 minutos de incubación, sugiriendo que, a la concentración utilizada, el plaguicida no presenta actividad redox sobre los grupos tiol libres o sobre los puentes disulfuro de las protaminas.

En cuanto a la descondensación, a pesar de que la incubación con endosulfán mostró niveles mayores con respecto a los controles, los mismos no fueron significativos en las condiciones analizadas.

Hay que considerar que estos resultados se refieren al estado redox de los tioles de los espermatozoides en general y no solamente de las protaminas en el núcleo, dado que no se utilizaron núcleos aislados (Seligman et al. 1994).

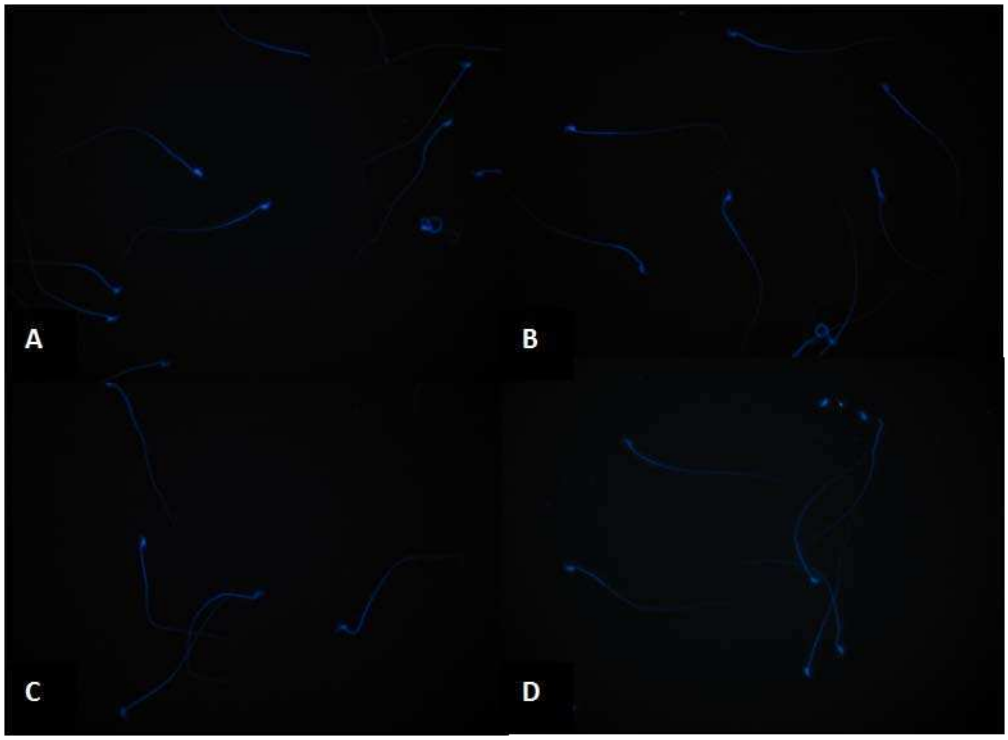


Figura 53. Efecto del endosulfán puro sobre el estado redox de los tioles en espermatozoides murinos. *Espermatozoides preincubados con endosulfán y luego descondensados en presencia de H y GSH durante 5 minutos se marcaron con monobromobimane y se observaron al microscopio de fluorescencia.* ***A:*** *medio A+B y GSH 5 min,* ***B****: medio A+B y GSH+H 5 min,* ***C****: DMSO y GSH+H 5 min,* ***D****: endosulfán puro y GSH+H 5 min. Al menos 200 espermatozoides fueron analizados en cada condición experimental. (Magnificación original 400X)*

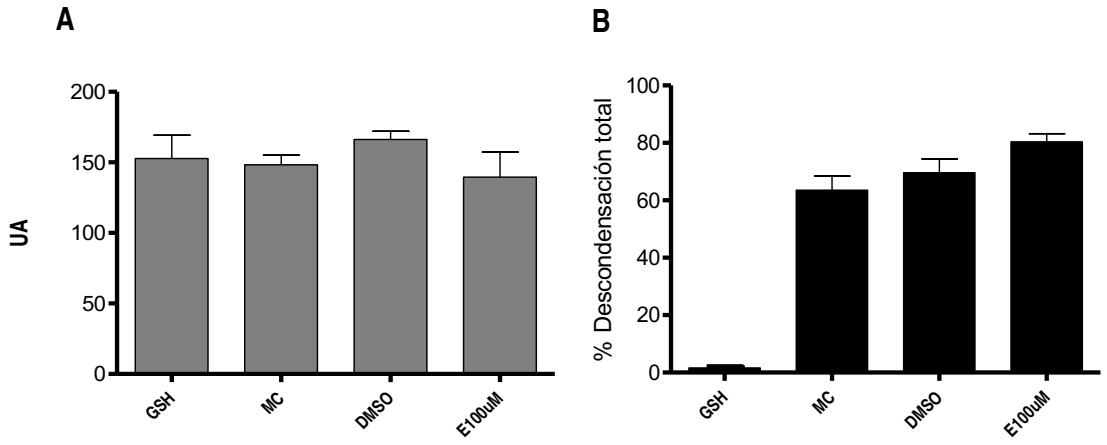


Figura 54. Estado redox de los tioles en espermatozoides en presencia de endosulfán, comparado con el porcentaje de descondensación. A: *intensidad de fluorescencia media (medida en Unidades Arbitrarias, UA) de espermatozoides luego de ser tratados con endosulfán durante 15 minutos, descondensados con GSH y heparina durante 5 minutos y teñidos con monobromobimane. MC: medio de cultivo, E: Endosulfán. Al menos 200 espermatozoides fueron analizados en cada condición experimental.* ***B:*** *controles de descondensación para cada condición. Los resultados están expresados como la media ± EE para n=3, *p< 0,05, ANOVA + Tukey-Kramer Multiple Comparison Test. Aumento 400X.*

2.6 Estrés oxidativo

Se evaluó el efecto *in vitro* del endosulfán puro y las dos formulaciones comerciales sobre la actividad de GST y SOD, el contenido de GSH y la peroxidación lipídica mediante TBARs. Tal como se muestra en la figura 55, no se encontraron diferencias significativas entre las condiciones evaluadas al realizar las distintas determinaciones.

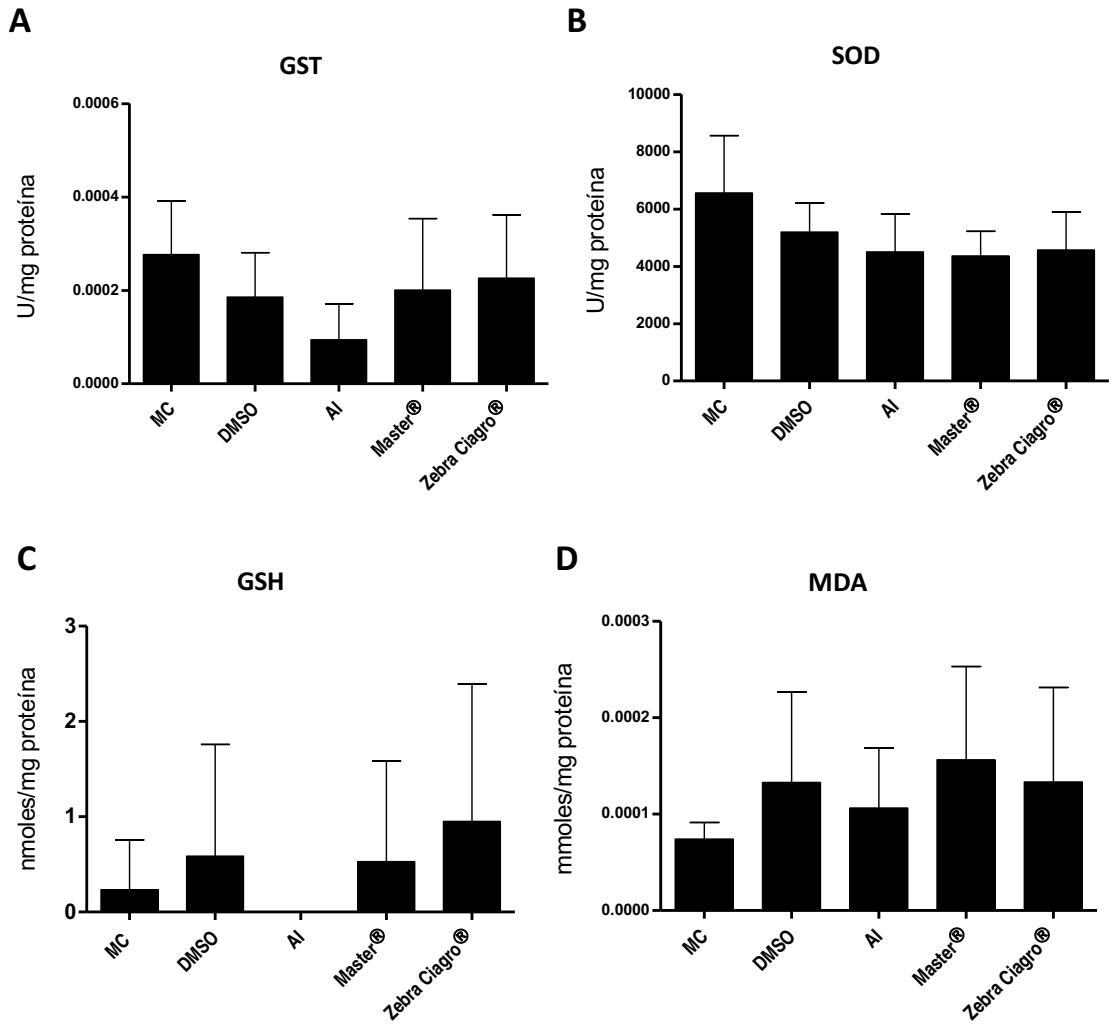


Figura 55. Efecto del endosulfán sobre el estrés oxidativo en espermatozoides murinos capacitados. *Espermatozoides capacitados fueron incubados en medio A+B (MC), DMSO, y endosulfán puro (AI) o sus formulaciones comerciales durante 15 minutos. Las muestras se congelaron y sonicaron 3 veces durante 5 segundos antes de hacer las distintas mediciones.* ***A y B:*** *actividad de GST y SOD,* ***C:*** *contenido de GSH y* ***D:*** *malondialdehído.*

Efecto del endosulfán sobre los espermatozoides humanos

Habiendo observado un efecto *in vitro* del endosulfán sobre espermatozoides murinos y con miras a evaluar la posibilidad de extender los hallazgos a otras especies, resultó interesante evaluar el efecto del endosulfán en su forma pura o a través de sus formulaciones, sobre espermatozoides humanos provenientes de donantes normospérmicos con descondensación cromatínica normal comprobada previamente.

2.7 Efecto in vitro del endosulfán de sobre la viabilidad y motilidad

La figura 56 muestra los resultados obtenidos al evaluar la motilidad y viabilidad de espermatozoides humanos capacitados incubados en presencia de distintas concentraciones de endosulfán Zebra Ciagro® durante 30 minutos. Puede verse claramente que la viabilidad no se vio afectada (Panel A), mientras que se observó una disminución significativa de la motilidad (Panel B) con la mayor concentración del plaguicida (100 µM: 40 ± 6 vs. MC: 66 ± 3, *p < 0,05; ANOVA + Tukey-Kramer Multiple Comparison Test, n = 4).

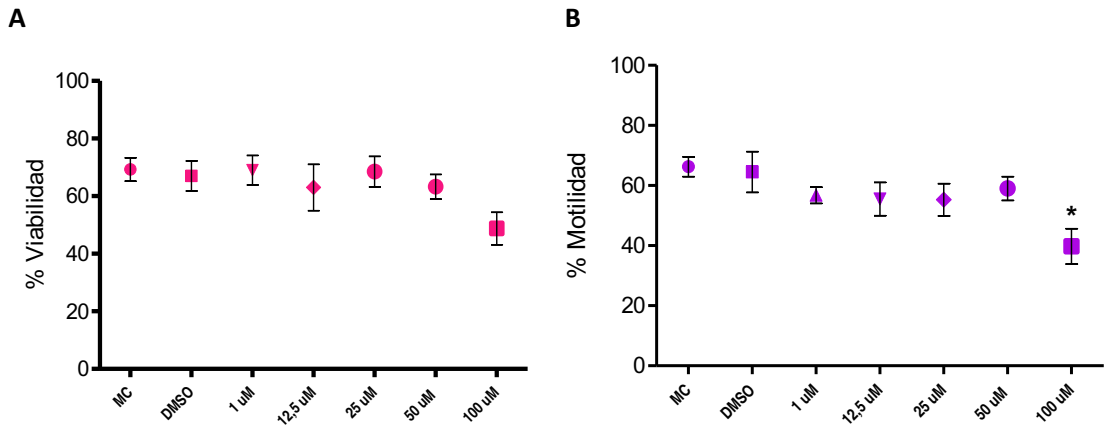


Figura 56. Efecto del endosulfán sobre la viabilidad y la motilidad de espermatozoides humanos. *Se incubaron espermatozoides capacitados en medio HTF (MC), en DMSO, o en presencia de distintas concentraciones de endosulfán Zebra Ciagro® durante 30 minutos. Posteriormente, se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos (Panel A) y mótiles (Panel B), sobre un total de 200 células evaluadas (*p < 0,05, ANOVA + Tukey-Kramer Multiple Comparison Test; n = 4).*

2.8 Efecto del endosulfán sobre la descondensación in vitro de espermatozoides

Se evaluó el efecto de la preincubación con endosulfán puro y las dos formulaciones comerciales sobre la descondensación *in vitro* de espermatozoides humanos capacitados, como se detallara en MM (Sección 5.9). La exposición de los espermatozoides al plaguicida produjo un aumento significativo en el porcentaje de descondensación de los espermatozoides preincubados en presencia de Zebra Ciagro® (Zebra Ciagro®: 63 ± 14 vs MC: 23 ± 5 *p< 0,05; n=5; ANOVA+ Tukey-Kramer Multiple Comparison Test), mientras que no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de descondensación para el Master® o el endosulfán puro (Master®: 20 ± 5, AI: 39 ± 12 vs MC: 23 ± 5; n=5; ANOVA+ Tukey-Kramer Multiple Comparison Test) (Figura 57).

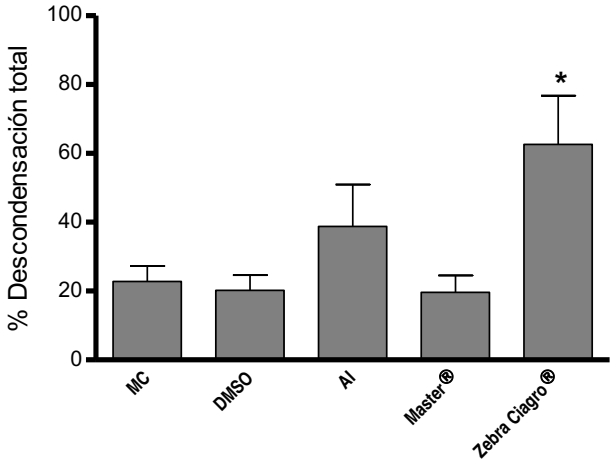


Figura 57. Efecto del endosulfán sobre la descondensación cromatínica de espermatozoides humanos capacitados. *Espermatozoides capacitados se preincubaron en presencia de endosulfán (100 µM) o sus respectivos controles para luego ser descondensados en presencia de GSH (10 mM) + H (46 µM). MC: espermatozoides preincubados en medio de cultivo HTF, DMSO: espermatozoides preincubados con DMSO; las 3 columnas restantes corresponden a espermatozoides incubados en presencia de endosulfán puro (AI), Master® o Zebra Ciagro®. (ANOVA+ Tukey-Kramer Multiple Comparison Test, *p < 0,05; n = 5).*

3. ETANOL

Con el fin de evaluar el efecto del etanol sobre algunos parámetros espermáticos y los eventos postfusión del espermatozoide murino en cuanto a la formación del pronúcleo masculino (descondensación nuclear), se expusieron al etanol mediante la ingesta en el agua de bebida ratones macho CF-1 provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA tal como se describió en la sección 6.1 de MM, y se realizaron los experimentos que se detallan a continuación.

3.1 Efecto del consumo de etanol sobre los parámetros seminales de espermatozoides murinos

Se determinaron, durante la capacitación *in vitro,* la morfología espermática, motilidad, hiperactivación y reacción acrosomal en espermatozoides provenientes de ratones intoxicados y control.

En primer lugar, se evaluó la morfología espermática, tal como se puede ver en la figura 58. Se encontraron principalmente, anormalidades en la morfología de la cabeza y el flagelo cuando se compararon los espermatozoides tratados con los controles (Figura 58, 1a y 1b). Las cabezas anormales tenían el acrosoma anormal (pequeños o ausentes), menor tamaño en la cabeza y formas alteradas (Figura 58, 2a y 3a). También se observaron anormalidades de flagelo (Figura 58, 2b y 3b). Las gotas citoplasmáticas, un signo de inmadurez, también fueron consideradas como anomalías del flagelo (Figura 3b). La cuantificación de las distintas morfologías observadas (Tabla 2) resultó

en un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides anormales en los animales intoxicados comparado con los control, tanto cuando se evaluaron las anormalidades de cabeza (Alcoholizados: 10,5 ± 1,52 vs. Control: 6,9 ± 0,07;*p< 0,05; n=9; test de Student), como de flagelo (Alcoholizados: 16,8 ± 2,1 vs. Control: 8,9 ± 0,8; **p< 0,01; n=9; test t de Student).

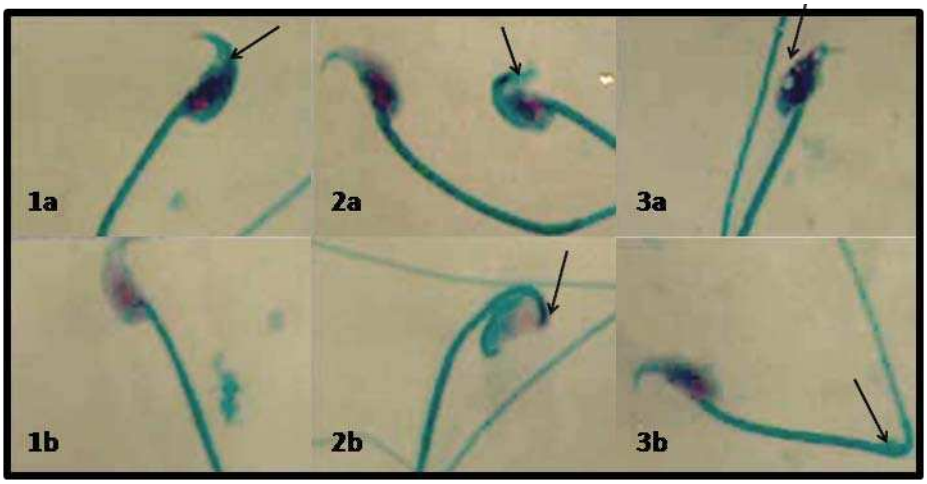


Figura 58. Distintas morfologías observadas al analizar espermatozoides recuperados de animales control e intoxicados con etanol (Coloración de Spermac). 1a: *espermatozoide con morfología normal, con acrosoma intacto (banda azul,).* ***1b:*** *Espermatozoide con morfología normal reaccionado (sin acrosoma, cabeza rosa).* ***2a:*** *espermatozoide normal y con morfología anormal de cabeza (intacto o no reaccionado).* ***2b:*** *espermatozoide con morfología anormal de cabeza y cuello.* ***3a:*** *espermatozoide con morfología anormal de cabeza.* ***3b:*** *espermatozoide con morfología anormal de flagelo: quebrado, con gota citoplasmática (signo de inmadurez). Las características descriptas se indicaron con flechas. (Magnificación original 1000X)*

Grupos	N	Normales	Anormalidades de cabeza	Anormalidades de flagelo
Control	9	84,13 ± 1,63	6,90 ± 0,07	8,90 ± 0,80
Alcoholizados	9	72,50 ± 2,60**	10,50 ± 1,52*	16,80 ± 2,10**

Tabla 2. Efecto del etanol sobre la morfología de espermatozoides murinos. *Se evaluó y cuantificó, en cada grupo experimental, mediante microscopía óptica la cantidad de espermatozoides con morfología normal, espermatozoides que presentaban anormalidades en su cabeza o en la cola (**p< 0, 01, *p<0,05; test t de Student, n = 9).*

Tal como se muestra en la figura 59, si bien el porcentaje de espermatozoides mótiles determinado inmediatamente después del *"swim out"* (tiempo 0), a los 60 y 120 minutos, aparenta ser mayor en el caso de los espermatozoides provenientes de animales alcoholizados con respecto a los controles, esta diferencia no fue significativa en ninguno de los tiempos evaluados.

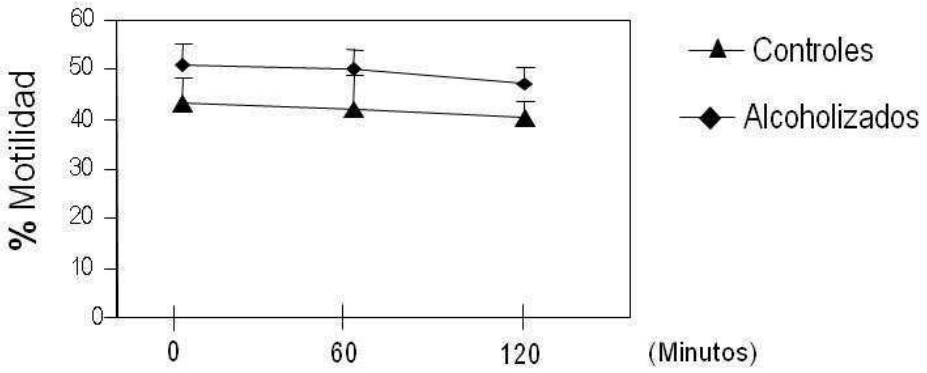


Figura 59. Efecto del consumo de etanol sobre la motilidad de espermatozoides murinos. *Se evaluó la motilidad de espermatozoides tanto de ratones control como de animales intoxicados con etanol al 15% en el agua de bebida durante 15 días.*

También se evaluó el efecto *in vivo* del etanol sobre la hiperactivación de los espermatozoides a tiempos 0, 60 y 120 minutos y se observó que la misma fue significativamente menor en los espermatozoides provenientes de animales alcoholizados comparándolos con los controles tanto a los 60 (Alcoholizados: 10,6 ± 2,2 vs. Control: 19,4 ± 2,8; *p< 0,05; n=6; test t de Student) como a los 120 minutos (Alcoholizados: 14,1 ± 2,5 vs. Control: 23,7 ± 2,6; *p< 0,05; n=6; test t de Student) luego del "*swim out" (*Figura 60).

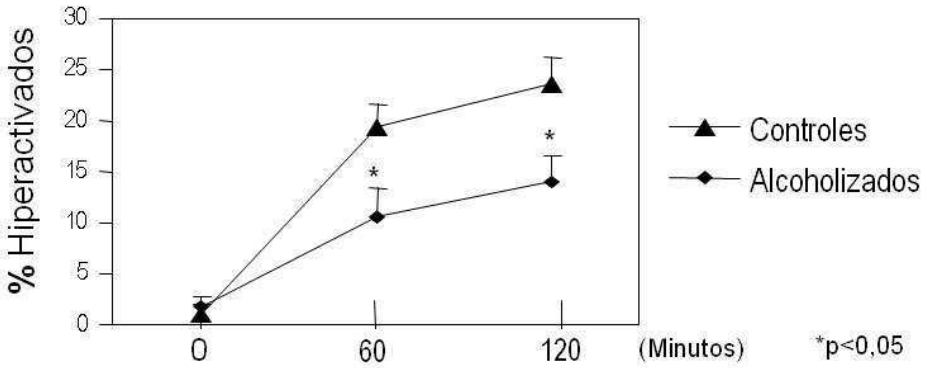


Figura 60. Efecto del consumo de etanol sobre la hiperactivación de espermatozoides murinos. *Se evaluó la hiperactivación de espermatozoides recuperados tanto de ratones control como de animales alcoholizados durante 15 días con etanol al 15% en el agua de bebida (*p<0, 05; n = 6; test t de Student).*

Finalmente, se evaluó el efecto *in vivo* del etanol sobre la reacción acrosomal en espermatozoides capacitados *in vitro.* Los resultados se muestran en la figura 61, donde se puede observar que la reacción acrosomal espontánea fue significativamente menor a los 120 minutos en las espermatozoides provenientes de animales alcoholizados que en los espermatozoides de animales control (Alcoholizados: 17,9 ± 2,5 vs 32,9 ± 6,1, *p<0,05; n=6; test t de Student). Nuevamente, al inducir la reacción acrosomal incubando espermatozoides de ambos grupos con P_4 durante 30 minutos adicionales (150 + P_4), se alcanzaron valores de reacción significativamente menores en el grupo de animales intoxicados con respecto al grupo control (Alcoholizados: 43,3 ± 4,5 vs Control: 73,1 ± 1,1 **p< 0,01; n=6; test t de Student).

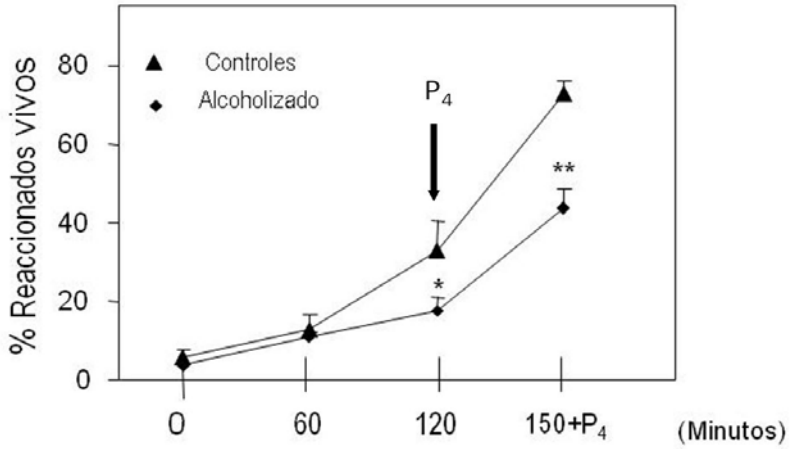


Figura 61. Efecto del etanol sobre la reacción acrosomal de espermatozoides murinos. *Se recuperaron espermatozoides de ratones control y alcoholizados a los cuales se les determinó la reacción acrosomal espontánea a los 60 y 120 minutos posteriores al "swim out". En este último tiempo (120 minutos), se incubaron los espermatozoides con progesterona (P_4) para determinar la reacción acrosomal inducida a los 150 minutos luego del "swim out" (*p<0, 05, **p<0, 01; n = 6; test t de Student).*

3.2 Efecto del consumo de etanol sobre la descondensación in vitro de la cromatina de espermatozoides murinos

Habiendo observado un efecto significativo del etanol sobre la morfología, la motilidad, la hiperactivación y la reacción acrosomal de los espermatozoides murinos, se buscó evaluar el efecto de la exposición *in vivo* de etanol sobre la descondensación de la cromatina. Para llevar a cabo estos experimentos, se administró etanol al 15% en el agua de bebida, a ratones macho de sesenta días de edad durante 15 días y, luego, se realizó la descondensación de los espermatozoides de manera estándar, en presencia de GSH y heparina. Si bien se observó una aparentemente mayor descondensación en los espermatozoides provenientes de animales intoxicados a los 30 minutos, la diferencia no fue significativa comparada con los controles (Figura 62), mientras que sí se observaron diferencias significativas a los 60 minutos (Etanol: 59,09 ± 2,40 vs Control: 50,22 ± 2,30; *p<0,05; n= 7; test t de Student) (Figura 62 B).

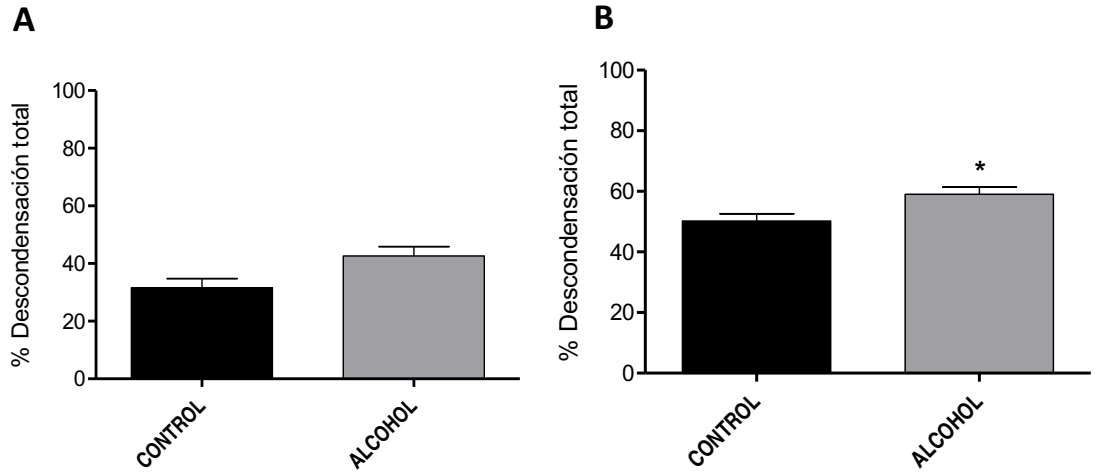


Figura 62. Efecto del etanol sobre la descondensación de espermatozoides murinos. *Espermatozoides provenientes de animales control o alcoholizados, incubados en presencia de GSH y heparina durante* ***A:*** *30 minutos y* ***B****: 60 minutos. (*p<0,05, n = 7; test t de Student).*

3.3 Efecto del consumo del etanol sobre la dinámica de la descondensación nuclear post-fertilización in vitro

Como consecuencia de los distintos efectos encontrados al intoxicar ratones macho con etanol al 15% en el agua de bebida, se quiso investigar cuál sería el resultado de este consumo sobre la fertilización *in vitro*. Para ello, se determinó la cinética de descondensación a las 2,5 (T1); 3,5 (T2) y 4,5 horas (T3) posteriores a la FIV y se analizó el porcentaje de descondensación, formación de pronúcleos y tasa de fecundación en los oocitos coincubados con espermatozoides provenientes de animales intoxicados o animales control. Tal como se muestra en la figura 63, se clasificaron 3 categorías distintas: oocitos en MII sin fecundar (Me II); oocitos fecundados, con cabeza descondensada en el ooplasma (II CP + PNf + CD) y oocitos fecundados, con pronúcleo materno y paterno (II CP + PNf + PNm). El resultado de fecundación se calculó como la suma de las dos últimas categorías, sobre el total de oocitos recuperados luego de la FIV.

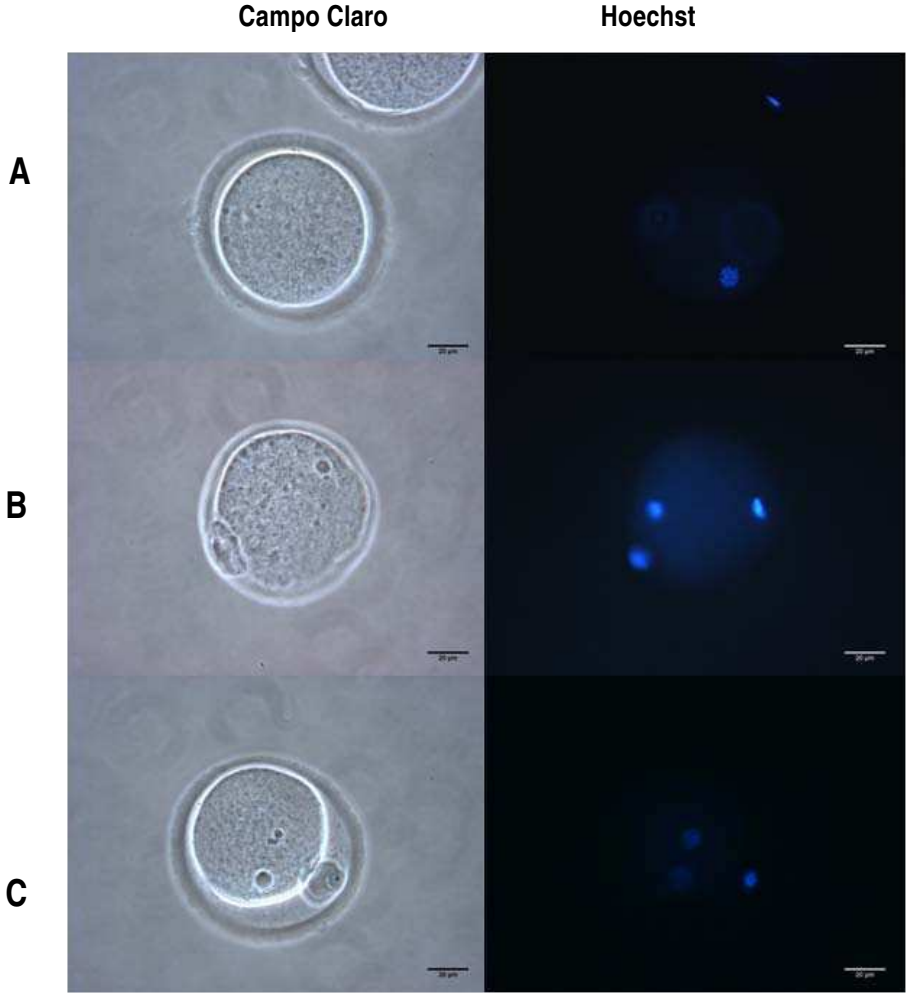


***Figura 63**. **Caracterización de los oocitos posterior a la FIV.** Microscopía de fluorescencia de los oocitos observados con Hoechst o mediante contraste de fase (Campo claro) a distintos tiempos luego de la FIV. **A**: Me II (oocitos en Me II, sin fecundar), **B**: II CP + PNf + CD (oocitos fecundados, con cabeza descondensada en el ooplasma) y **C**: II CP + PNf + PNm (oocitos fecundados, con pronúcleo materno y paterno). Los oocitos fecundados se tomaron como la suma de B + C sobre el total de oocitos recuperados luego de la FIV.*

El porcentaje de oocitos con una cabeza de espermatozoide descondensada en su citoplasma fue mayor en los animales intoxicados respecto a los animales control, en T1 (Figura 64), (*p< 0,05, Control: 46 ± 1 vs. Etanol: 67 ± 6, test de Fisher, n = 2). Esta diferencia se invirtió a las 3,5 horas posteriores a la FIV (*p< 0,05, Control: 14 ± 13 vs. Etanol: 1 ± 0, test de Fisher, n = 2). Tal como se esperaba, el porcentaje de descondensación *in vivo* fue disminuyendo a medida que avanzaron las horas luego de la FIV.

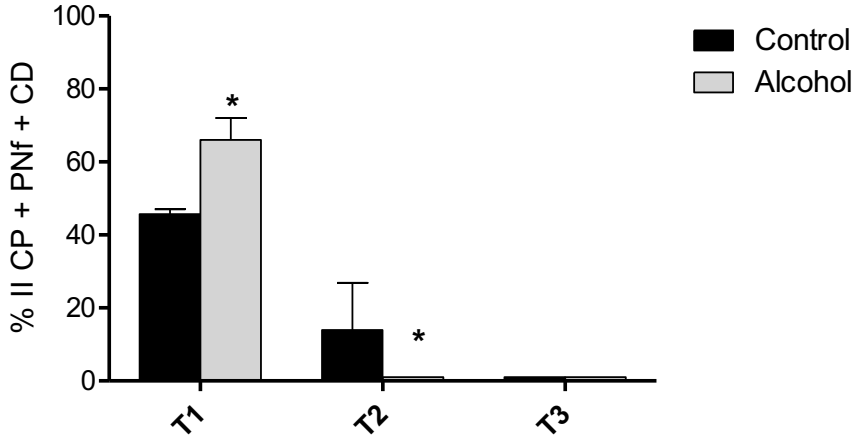


Figura 64. Efecto del consumo de etanol sobre la descondensación del núcleo espermático in vivo. *Cinética de descondensación posterior a la FIV de oocitos de ratones control coincubados con espermatozoides provenientes de ratones intoxicados con etanol al 15% en el agua de bebida, durante quince días.* ***T1:*** *2,5 horas,* ***T2:*** *3,5 horas y* ***T3:*** *4,5 horas posteriores a la FIV. Se evaluó el número de oocitos con una cabeza de espermatozoide descondensada en su citoplasma (*p< 0,05, test de Fisher, n = 2).*

En cuanto a la formación de pronúcleos luego de la FIV (Figura 65), tal como era de esperar, no se observó prácticamente formación de los mismos en T1. Sin embargo, tanto en T2 como en T3, la formación de pronúcleos se hizo evidente y fue significativamente mayor en el caso del grupo de animales intoxicados comparado al control (*p<0,05, Etanol: 81 ± 2 vs. Control: 61 ± 3; test de Fisher, n=2 para ambos tiempos). Este dato explica la caída en presencia de cabezas descondensadas, con el paso del tiempo, observada en la figura anterior.

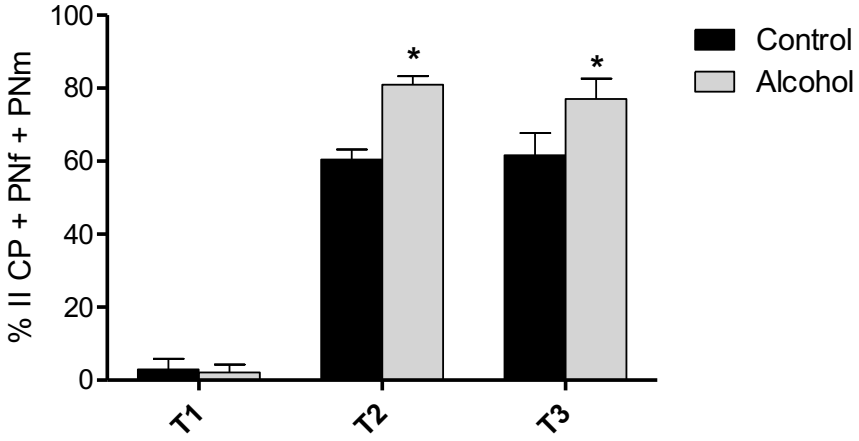


Figura 65. Efecto del consumo de etanol sobre la formación de pronúcleos in vivo. *Cinética de la formación de pronúcleos posterior a la fertilización in vitro de oocitos de ratones control coincubados con espermatozoides provenientes de ratones intoxicados con etanol al 15% en el agua de bebida, durante quince días.* ***T1:*** *2,5 horas,* ***T2:*** *3,5 horas y* ***T3:*** *4,5 horas posteriores a la FIV. Se evaluó el número de oocitos con un pronúcleo materno y un pronúcleo paterno en su citoplasma (*p< 0,05; test de Fisher, n = 2).*

Por último, cuando se cuantificaron los porcentajes de fecundación obtenidos con el fin de evaluar si existía diferencia entre ambos grupos, los porcentajes de oocitos fecundados fueron siempre mayores en el grupo de animales intoxicados comparado al control, siendo significativamente mayores tanto en T1 como en T3 (T1 Control: 49 ± 4 vs. T1 Etanol: 73; T3 Control: 62 ± 6 vs. T3 Etanol: 77 ± 6; *p<0,05, test de Fisher, n = 2) (figura 66).

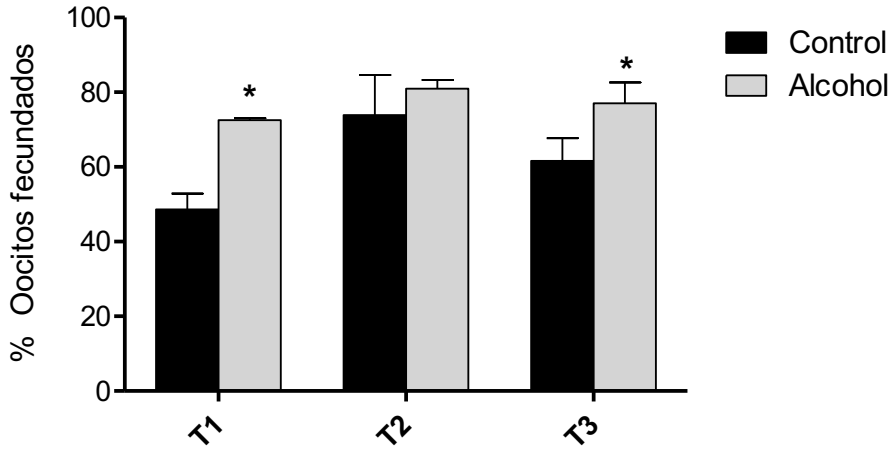


Figura 66. Efecto del consumo de etanol sobre la fecundación in vitro*. Se fecundaron oocitos de ratones control con espermatozoides provenientes de ratones a los que se les administro etanol al 15% en el agua de bebida.* ***T1:*** *2,5 horas,* ***T2:*** *3,5 horas y* ***T3:*** *4,5 horas posteriores a la FIV (*p< 0,05, test de Fisher, n = 2).*

3.4 Estrés oxidativo

Se evaluó el efecto *in vivo* del etanol sobre la actividad de GST y SOD, el contenido de GSH y la peroxidación lipídica mediante TBARs (Figura 67). En ninguna de las condiciones evaluadas se encontró una diferencia significativa.

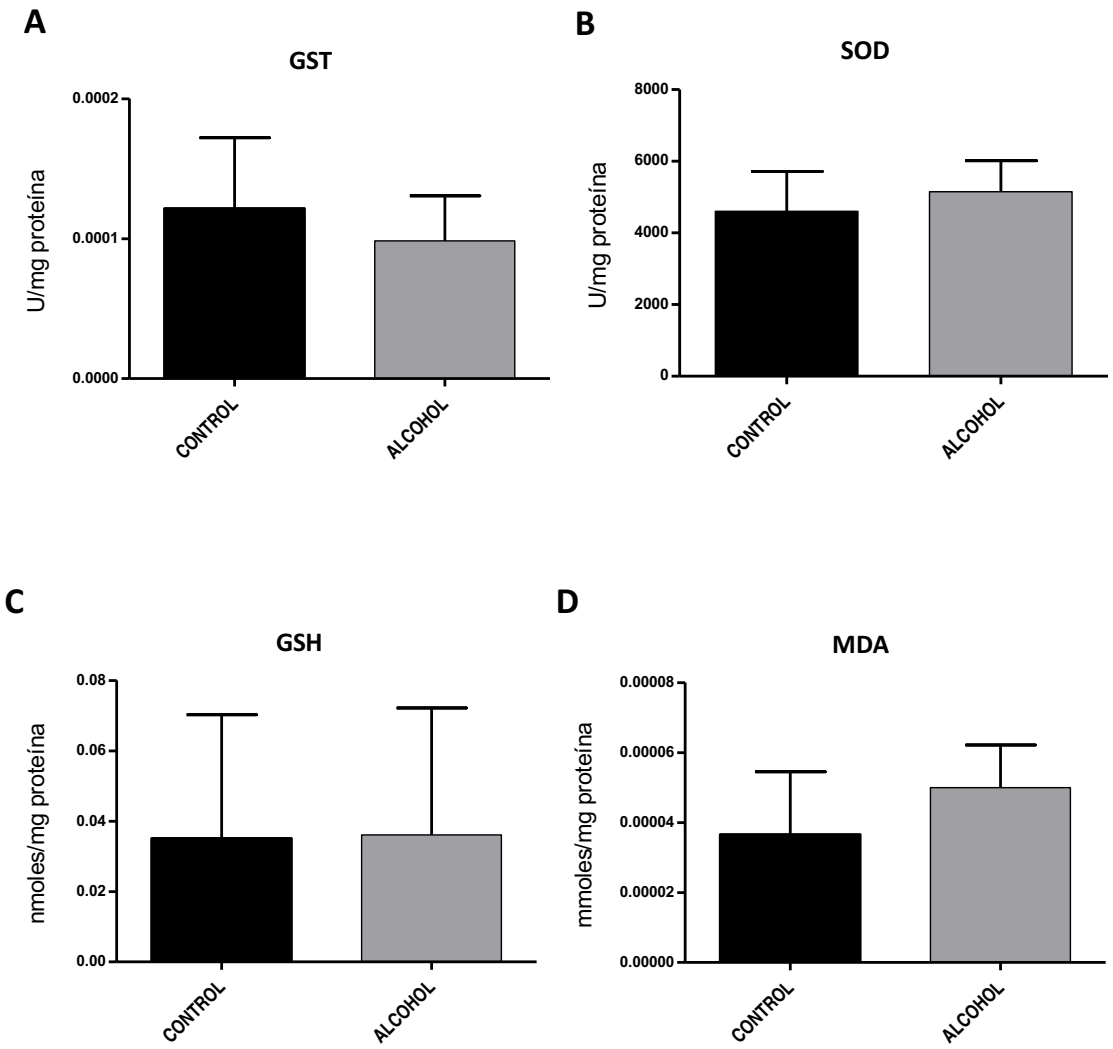


Figura 67. Efecto del etanol sobre el estado redox de espermatozoides murinos capacitados. *Se recuperaron espermatozoides provenientes de animales control o intoxicados con etanol, se capacitaron y, posteriormente, las muestras se congelaron y sonicaron 3 veces durante 5 segundos antes de hacer las distintas mediciones.* ***A y B****: actividad de GST y SOD,* ***C:*** *contenido de GSH y* ***D:*** *malondialdehído.*

DISCUSIÓN

Una vez puesto en marcha el proceso evolutivo, con la aparición de la primera célula, el mantenimiento de las especies resultó una finalidad primordial en sí misma. Es por esto que los individuos debían lograr reproducirse en forma eficaz y con la menor incidencia de mutaciones genéticas. Con los errores propios de la duplicación del ADN y la posterior transcripción y traducción del ARN mensajero resultante, la aparición de la reproducción sexual, una alternativa a la fisión binaria de los procariotas, permitió la recombinación del material genético de ambos parentales asegurando la diversidad genética y dando respuesta a esa finalidad de permanencia. Por supuesto, la diversificación y complejidad de los individuos trajo consigo no solamente una mayor regulación sino, también, un mayor número de instancias en las que pudiese ocurrir algún error que impidiese ese logro reproductivo.

La formación de gametas, con el consiguiente transporte desde un cuerpo al otro en aquellos organismos que poseen reproducción interna, implica necesariamente que el material genético sea protegido, para impedir su modificación antes de producirse la singamia. En los espermatozoides esto se tradujo en una mayor condensación de la cromatina, mediante la remoción de las histonas y su reemplazo por proteínas más pequeñas, las protaminas, las cuales presentan una elevada carga positiva por tener una mayor proporción de aminoácidos básicos (lisina y arginina) y participan en la formación intra e intercatenaria de puentes disulfuro, a través de su elevado contenido de cisteínas. Este reemplazo de la mayoría de las histonas espermáticas (aproximadamente en un 85% en el espermatozoide humano) por protaminas durante la espermiogénesis (Ward & Coffey 1991) lleva a que la cromatina espermática esté 6 a 8 veces más condensada que la cromatina de las células somáticas.

Luego de la fecundación, resulta indispensable que esta cromatina extremadamente compactada se descondense para interactuar con el ADN del oocito, posibilitando así la singamia. El proceso de descondensación espermática dentro del oocito involucra la reducción intra e intermolecular de los puentes disulfuro presentes en las protaminas mediante el GSH endógeno y la remoción de las protaminas reducidas con la ayuda de una molécula “aceptora” (Nota: el término aceptor/a se indicará entre comillas dado que al momento no se pudo demostrar que realmente ocurra una interacción directa entre las protaminas y el glicosaminoglicano, aunque se conoce que matrices de heparina-sepharosa son capaces de unir protaminas y, de hecho, es un método utilizado para la purificación de estas proteínas básicas) (Piepkorn et al. 1978). En nuestro laboratorio postulamos que esta molécula sería el heparán sulfato, presente tanto en el ooplasma de oocitos murinos como humanos (Romanato et al. 2008). Las bases moleculares de este proceso permanecen aún desconocidas en muchas especies, incluyendo ratón y humano (Romanato et al. 2008; Julianelli et al. 2012a).

Estudios previos de nuestro laboratorio describieron el papel de los glicosaminoglicanos en la descondensación de espermatozoides humanos (Romanato et al. 2003). Este trabajo de tesis doctoral, partió con la premisa de estudiar el efecto

de tóxicos ambientales e ingeridos como posibles responsables de la alteración del proceso reproductivo en especies mamíferas.

Tal como se dijera al comienzo de esta sección, la capacidad reproductiva y su éxito son requisitos necesarios para asegurar la permanencia de una especie; y este éxito requiere de la participación eficaz y coordinada de un gran número de eventos fisiológicos. Estos eventos tienen lugar a escala "macroscópica", como puede ser la producción y transporte de las gametas, como también a escala "molecular", como son todos los procesos que llevan a la maduración y capacitación de los espermatozoides y su interacción con el oocito. En particular, nos propusimos estudiar la acción de estos tóxicos sobre la descondensación de la cromatina espermática.

Teniendo en cuenta la importancia de estudiar este efecto sobre la reproducción humana, pero conscientes de la dificultad que podría conllevar el desarrollo de la tesis basándose exclusivamente en este modelo, aprovechamos el vacío de conocimiento todavía imperante con respecto a la descondensación cromatínica en espermatozoides murinos; y, tomando como base de partida la experiencia adquirida en el humano, nos dedicamos a establecer las condiciones óptimas para este modelo. Esto nos permitiría contar con un modelo y sistema en los que se pudiese estudiar el efecto de los tóxicos sobre los espermatozoides tanto, *in vitro* como *in vivo*, sin tener los problemas éticos del manejo de espermatozoides humanos.

En este punto, es importante aclarar que el estudio del proceso de descondensación de la cromatina en espermatozoides, tanto murinos como humanos, profundizando los mecanismos moleculares que tienen lugar, representa una posible vinculación translacional con la clínica reproductiva en el manejo de la fertilidad humana. Debido a que las técnicas de reproducción asistida han logrado pasar por alto una gran cantidad de barreras, el estudio tan detallado de este proceso podría parecer sin utilidad inmediata. Sin embargo, los datos indican que de todos los procesos que fallan utilizando la técnica del ICSI (inyección intracitoplasmática del espermatozoide) un 15%, aproximadamente, muestra un núcleo con la cromatina todavía condensada en el ooplasma. Es por esto que un estudio más detallado del proceso de descondensación y el papel que el heparán sulfato/heparina tiene en el mismo, como así también la interacción entre este glicosaminoglicano y las protaminas, podría resultar en una oferta clínica para un estudio adicional, como también en una posible acción terapéutica para aquellos pacientes cuyos espermatozoides permanecen condensados dentro del oocito.

Tomando en cuenta todo esto, dividiremos la discusión en dos partes: 1- Descripción del proceso de descondensación en espermatozoides murinos; 2- Estudio del posible uso de este proceso u otros vinculados con la fisiología espermática como indicadores de la acción de tóxicos reproductivos, en particular, endosulfán y etanol.

Descripción y estudio del proceso de descondensación en espermatozoides murinos.

Tomando como base los hallazgos de nuestro laboratorio respecto de la descondensación de la cromatina de espermatozoides humanos, lo primero que se hizo fue analizar la capacidad descondensante de diversos GAGs que, al igual que lo que ocurre en humanos, están presentes tanto en el oocito como en el fluido folicular.
Comenzando con el candidato más probable, el heparán sulfato, y usando heparina como análogo molecular, se logró descondensar la cromatina de espermatozoides de ratón en las mismas condiciones que se utilizaron para espermatozoides humanos (Figura 32). Cabe resaltar que la concentración de GSH utilizada en todos los experimentos es fisiológica y corresponde al valor encontrado en el oocito de mamíferos en el momento periovulatorio (Calvin et al. 1986). Sin embargo, la concentración de heparina no se puede establecer en forma fisiológica dado que no sería el componente natural a encontrar en el lugar de la fecundación. La experiencia indica que posee efectos similares al heparán sulfato en los distintos sistemas estudiados (a excepción de su capacidad anticoagulatoria que el heparán sulfato no posee) y se encuentra dentro del rango que ha sido determinado experimentalmente para el heparán sulfato en el fluido folicular de oocitos humanos obtenidos de mujeres que llevan a cabo tratamientos de fecundación asistida (Bellin et al. 1986).
Como resultado de la descondensación de la cromatina y de los cambios morfológicos producidos en la cabeza del espermatozoide murino, se observaron los mismos estadios ya descriptos por Bedford en el año 1973 (Bedford et al. 1973), por lo que los resultados pudieron ser expresados de la misma manera que para humanos, como la suma de las formas M y G, (M+G), en forma porcentual.
El análisis del efecto de los diferentes GAGs en la descondensación *in vitro* de espermatozoides murinos resultó ser un hallazgo importante. Contrariamente a lo observado previamente en la descondensación de espermatozoides humanos (Romanato et al. 2003), el DS resultó ser tan activo como la H bajo las condiciones estándar de descondensación de 46 µM, GSH 10 mM y 60 minutos de incubación (Figura 32). Como consecuencia de esto, de todos los GAGs utilizados en este experimento, las moléculas que tendrían potencial para actuar como “aceptoras” de protaminas en la especie murina, serían la heparina/heparán sulfato y el dermatán sulfato. Esto lleva a la pregunta de si esta respuesta diferencial entre ambas especies podría estar relacionada al porcentaje de histonas y/o a la cantidad relativa de protamina 1 y protamina 2 presentes en los espermatozoides maduros de ambas especies. Los espermatozoides murinos organizan alrededor de 1-2% de su genoma en nucleosomas (Balhorn et al. 1977; Brykczynska et al. 2010), mientras que en los espermatozoides humanos más del 15% del ADN esta empaquetado de esta manera (Gatewood et al. 1990; Johnson et al. 2011; Tanphaichitr et al. 1978).
La capacidad descondensante diferencial del DS y la H en ratón y humano podría explicarse en términos de las características moleculares de las protaminas P1 y P2,

además de la proporción P1/P2 en ambas especies. Las protaminas de ratón y humanos tienen características fisicoquímicas similares, tales como el porcentaje del aminoácido arginina, el punto isoeléctrico y el número total de residuos (están conservados en el humano y el ratón a pesar de que difieren en secuencia), con P2 que incluye a la histidina en su estructura primaria. La mayor diferencia entre las especies es la proporción de P1/P2 encontrada en el núcleo de los espermatozoides humanos comparado con la proporción de P1/P2 del núcleo de espermatozoides de ratón. La proporción relativa de P2:P1 en el espermatozoide de ratón y humano varía de 2:1 a 1:1, respectivamente (Corzett et al. 2002a). Anteriormente, mencionamos que P2 tiene un menor contenido de residuos de cisteína que P1, con una menor posibilidad de formación de puentes disulfuro. Además, el precursor de P2 tiene una cantidad mayor del aminoácido glutamato, que incorpora una carga negativa a su estructura y, entonces, podría disminuir su interacción con la molécula del ADN cargada negativamente. Como todo esto hasta el momento es meramente especulativo, dado que no se conoce exactamente cómo es la estructura de la cromatina condensada o la interacción de las protaminas con los glicosaminoglicanos, se comenzó un estudio *in silico* de las proteínas y del dermatán y heparán sulfato/heparina.

Al no contar con un modelo para las protaminas (independientemente de la especie), se realizó una búsqueda bibliográfica de moléculas que interactúan con heparán sulfato y, luego, se las utilizó como templado para hacer un modelado por homología, utilizando la plataforma Swiss-Model (es un servidor para realizar modelado por homología, completamente automatizado, accesible a través del servidor Web Expasy.org) (Arnold et al. 2006; Biasini et al. 2014; Guex et al. 2009; Kiefer et al. 2009). Utilizando esta metodología, se logró modelar la protamina P1 con el templado del dominio de reconocimiento de heparina en una isoforma alternativa del VEGF-A (el VEGF55) (Zhao et al. 2012) y la protamina P2 con similitud al "RING domain" de la synaptotagmin-like protein 4 (Tarantini et al. 1998) donde se indica: "*…el análisis de la secuencia proteica reveló que esta proteína que une heparina corresponde al dominio extravesicular de la synaptotagmin (Syn)-1 bovina, un componente transmembrana de vesículas sinápticas involucrado en la regulación del tráfico de organelas…*". Cuando se analizó ambas proteínas con el programa HyperChem (HyperChem 8.0.8, HyperCube Inc.) se pudo observar que tanto P1 como P2 presentan una isosuperficie de potencial electrostático similar, con la única diferencia de la "cola" que cuelga en la molécula de P2 (Figura 43), lo que podría significar un impedimento estérico al momento de interaccionar con el ADN que, por lo tanto, obligue a P2 a hacerlo de una manera más selectiva y probablemente menos fuerte que P1 (Figura 42). Muy posiblemente, el hecho que ambas moléculas proteicas posean el mismo punto isoeléctrico, sumado a la distribución similar de cargas en su superficie, permiten suponer que la estructura más larga de P2 con respecto a P1 jugaría un papel importante en cuanto a la interacción con el ADN y, posiblemente también con los GAGs. Más aún, si se observa la estructura de P2, puede verse la "cola" que extiende la conformación más que P1 y,

en cierto modo, hace pensar en la "cola" de las histonas que colaboran en el ensamblado de los nucleosomas. Especulando con esta idea, P2 podría ser también responsable de una conformación un poco más laxa en su unión con el ADN y entre las protaminas entre sí, explicando los puntos de menor condensación donde está presente. Analizando la bibliografía, el grupo de Sanchez-Vazquez (Sánchez-Vázquez, R. Reyes, et al. 1996), definió distintas especies de roedores como Clase I (conteniendo exclusivamente P1, rata) o Clase II (conteniendo tanto P1 como P2, ratón). Estos investigadores demostraron que la descondensación de la cromatina en los espermatozoides de animales Clase I necesitaba mucho más tiempo (del orden de 6 horas) que los de los animales Clase II, dado que, en estos últimos, la descondensación máxima se obtenía a los 60 minutos. Estos resultados, que coinciden con lo observado en nuestro laboratorio y en la realización de este trabajo de tesis doctoral (los resultados en rata no se muestran, pero la descondensación ocurrió luego de las 6 horas de incubación con GSH y heparina), parecen indicar con claridad que la protamina P1 participaría en una unión más fuerte, o por lo menos responsable de una condensación mayor de la cromatina, que la protamina P2 (Sánchez-Vázquez, ; R Reyes, et al. 1996).

Utilizando la técnica de microscopía de fuerza atómica, el grupo de Allen (Allen et al. 1993), demostró que la cromatina espermática en diversas especies está organizada en largos "loops", sugiriendo que se mantienen las características estructurales importantes de la organización cromatínica de las células somáticas, aunque se haya reorganizado y empaquetado completamente durante la espermiogénesis. Esto permite pensar en la existencia de una cromatina diferencialmente condensada y organizada, con lugares más accesibles (posiblemente donde se encuentre P2 o histonas remanentes) y otros más compactos, con la presencia sustancial de P1. Para continuar el estudio *in silico* de las moléculas involucradas en la descondensación de la cromatina, se analizó al dermatán sulfato y a la heparina. Ambas moléculas parten con una sulfatación muy diferente, siendo la heparina mucho más sulfatada que el dermatán sulfato y, por consiguiente, con mayor carga neta negativa por igualdad de unidades disacarídicas. Utilizando modelos encontrados en bases de datos de la Web, el análisis espacial de estas moléculas de glicosaminoglicanos mostró una clara distribución diferencial de las cargas negativas. El dermatán sulfato dispone estas cargas negativas en una forma homogénea que se asemeja mucho a la de las del ADN, formando un anillo alrededor de una hélice central (Figura 45). Por el contrario, la heparina concentra las cargas negativas en cuatro puntos muy bien definidos alrededor del eje central de la molécula (Figura 44). Esto permitiría, en principio, localizar mucho mejor la interacción de la heparina, haciendo que la misma sea más específica que la del dermatán sulfato. Como consecuencia, la heparina podría interaccionar con zonas más ocluidas dentro de la cromatina por la presencia de P1 o ausencia de histonas. Por el contrario, el dermatán sulfato entraría más fácilmente en aquellos lugares más accesibles (nucleosomas remanentes y con P2 presente), aunque

no se visualice tan rápidamente por la poca cantidad presente en la cromatina condensada. Las evidencias experimentales de nuestro laboratorio muestran que el dermatán sulfato es capaz de descondensar más eficientemente la cromatina murina que la humana, mientras que la heparina no parecería mostrar diferencia alguna. Considerando todas estas características, nuestros resultados parecerían ser coherentes con que el DS, un glicosaminoglicano menos sulfatado, mostrara una mayor capacidad descondensante que la heparina con la cromatina de ratón (P2:P1 2:1) que con la cromatina de espermatozoides humanos (P2:P1 1:1); y que pudiera producirse un efecto sinérgico entre ambas moléculas, con DS actuando donde P2 es más abundante y heparina/HS actuando en esas regiones de la cromatina más compactada, donde P1 está presente. Una vez más, estas indicaciones son especulativas, pero están sustentadas en los datos experimentales obtenidos. Actualmente, nuestro laboratorio tiene en marcha un proyecto en colaboración para profundizar en este análisis estructural.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis, entonces, sugerirían que la descondensación no ocurre de la misma manera cuando se utiliza la combinación de heparina y DS. El sistema fue más sensible cuando se utilizó H que cuando se utilizó DS (Figuras 36), el máximo de descondensación alcanzado con heparina fue mayor (Figuras 37) y la cinética del proceso indicó una respuesta más rápida a este glicosaminoglicano (Figura 35). Sin duda, estas diferencias podrían estar relacionadas con las características fisicoquímicas de las moléculas, tal como ya mencionamos anteriormente.

Otro aspecto importante que no debe descuidarse, al analizar los resultados de la descondensación *in vitro*, es que las moléculas utilizadas deben atravesar la/las membrana/s de la cabeza del espermatozoide. La H y el DS no solo tienen diferente distribución espacial de cargas, sino que el DS está menos sulfatado que la heparina y, por lo tanto, tiene menos carga neta negativa. Como consecuencia, se puede esperar una habilidad diferencial de las moléculas para atravesar la membrana plasmática e interactuar con la cromatina, pero eso todavía necesita ser estudiado.

A pesar de que la descondensación de la cromatina ocurre de alguna manera más rápidamente en presencia de H que en presencia de DS, cuando ambos compuestos son utilizados en conjunto, la descondensación prácticamente se duplica (Figura 38). Esta observación nos motivó a estudiar un posible sinergismo entre ambas moléculas. Tal comportamiento sinérgico sugeriría que los dos GAGs podrían estar actuando juntos en regiones vecinas de la cromatina espermática en lugar de actuar de manera independiente en regiones alejadas o que, si lo hicieran en regiones no cercanas, la descondensación que se origine en un punto podría extenderse a zonas vecinas, con un efecto permisivo para la acción de la otra molécula. Si el efecto de las moléculas combinadas ocurriese de manera independiente y en zonas alejadas, se podría esperar un simple efecto aditivo en la descondensación cuando ambas moléculas son usadas en simultáneo. Aunque las concentraciones de H y DS utilizadas en este experimento

difieren considerablemente, las mismas fueron seleccionadas con el objetivo de forzar el sistema para revelar un posible comportamiento sinérgico que no podría ser observado de otra manera.

Cuando se analizó el efecto de la incubación simultánea versus secuencial con el agente tiorreductor y la heparina (Figura 34), la adición de H sola o GSH sólo en primer lugar, resultó en una reducción significativa de la descondensación nuclear, con respecto a la observada cuando ambas moléculas se agregaron en forma simultánea. Cuando la cromatina se encuentra en su estado original (protaminas con puentes disulfuro formados), probablemente está tan compacta aún, que no permite la máxima remoción de las protaminas por la heparina si ambas moléculas descondensantes, heparina y GSH, no están presentes al mismo tiempo. Esto sugiere la existencia de un efecto cooperativo entre la heparina y el GSH durante la descondensación de la cromatina de espermatozoides y, a su vez, habla a favor de la ocurrencia simultánea en lugar de secuencial de la reducción y remoción de las protaminas durante la descondensación nuclear *in vivo*. Tal como lo describió Julianelli (Julianelli et al. 2012b) en espermatozoides humanos, los resultados presentados en esta tesis apoyan la hipótesis que, durante la descondensación del espermatozoide humano *in vivo*, el heparán sulfato presente en el oocito no actúa como un simple "aceptor" de las protaminas, sino que también coopera con el GSH para la reducción de los puentes disulfuro de las mismas. Ambos glicosaminoglicanos (DS y HS, el equivalente estructural de la heparina que está fisiológicamente presente en oocitos humanos y murinos) parecen ser sintetizados por las células de la granulosa en respuesta a la hormona folículo estimulante (FSH) (Lenz et al. 1988; Tirone et al. 1993), pero según nuestro conocimiento, no hay información disponible de la cantidad presente en el oocito. Con los resultados discutidos hasta aquí, se puede decir que los mismos representan datos originales con lo que se muestra una acción de dos glicosaminoglicanos en el proceso de descondensación de la cromatina. Si bien fueron obtenidos para un modelo murino, los mismos abren la posibilidad de que estas evidencias puedan extenderse a muestras humanas de pacientes que concurren a la clínica por problemas en su capacidad fecundante, utilizando la combinación de dermatán sulfato y heparina para detectar posibles anomalías en la condensación cromatínica. La presencia de heparán sulfato en oocitos murinos y humanos ya ha sido comprobada en nuestro laboratorio; ahora queda extender esos estudios a la presencia de dermatán sulfato en las células germinales femeninas.

Hasta el momento, los resultados presentados en esta tesis representan la primera evidencia de una posible interacción entre estos glicosaminoglicanos durante el proceso de descondensación de la cromatina espermática.

Considerando que el resultado de la descondensación cromatínica mostró una diferencia sustancial entre espermatozoides capacitados y no capacitados, se puede pensar que probablemente esto sea reflejo de cambios en la composición de la membrana y en la distribución de proteínas espermáticas que se asocian al proceso de

capacitación. Los espermatozoides capacitados tienen mayores niveles de descondensación y también muestran una cinética de descondensación más rápida que los espermatozoides no capacitados, posiblemente como reflejo del papel de la membrana plasmática en la regulación de la entrada de GAGs y/o GSH a la célula (Romanato et al. 2003). Esto estaría sugiriendo que durante el tiempo de capacitación se produciría un reordenamiento de moléculas en la membrana, necesario para que el núcleo sea más propenso a sufrir la descondensación. Otra posible explicación para estas diferencias entre la descondensación de espermatozoides capacitados y no capacitados, involucra la teca perinuclear, una estructura del citoesqueleto intercalada entre la membrana acrosomal interna y la envoltura nuclear de la cabeza del espermatozoide de mamíferos (Sutovsky & Schatten 1997; Oko & Sutovsky 2009). Esta estructura es rica en puentes disulfuro y parece estar involucrada en la estabilización de la cromatina; su desaparición cuando la cabeza del espermatozoide se incorpora al oocito colaboraría con la descondensación de la cromatina. La teca perinuclear tendría un papel en la regulación de este proceso, aunque todavía esto no se ha estudiado con profundidad. Aunque la teca perinuclear parece permanecer inalterada hasta que el espermatozoide penetra en el oocito (Ramalho-Santos et al. 2000), podrían estar ocurriendo modificaciones sutiles en su estructura durante la capacitación, lo cual podría entonces alterar la sensibilidad de los espermatozoides a los agentes descondensantes. Esta es una hipótesis interesante que será analizada en experimentos futuros.

La microscopia electrónica de espermatozoides descondensados permitió entender los cambios ultraestructurales que tienen lugar durante la descondensación nuclear de espermatozoides de ratón (Figura 46). Los resultados obtenidos revelan que la descondensación comienza en la región caudal de la cabeza, donde se inserta la cola y continúa hacia arriba hasta que toda la cromatina esté descondensada. Al analizar las microfotografías electrónicas de los espermatozoides enteros en diferentes estadios de descondensación de la cromatina, resulta evidente la destrucción y desaparición de la membrana plasmática ante la presencia de H/DS + GSH (Figura 46B y 46C), mientras que la incubación con el GSH solo no causa el mismo efecto (Figura 46A). Acompañando al proceso de descondensación cromatínica, resulta también notable el aumento en el volumen nuclear, lo que puede relacionarse con el proceso de oncosis, descrito por primera vez por von Recklinghausen (von Recklinghausen, 1910) y que se acompaña de hinchazón ("swelling") celular junto con un aumento de la permeabilidad (Majno & Joris 1995). Si se tiene en cuenta que la oncosis es causada por la interrupción de las bombas iónicas de la membrana plasmática (Majno & Joris 1995) y que la H está relacionada con diversos receptores proteicos que controlan la homeostasis del Ca^{2+} (Felix et al. 2007) y que podría inhibir la ATPasa dependiente de este catión, se puede especular acerca de un mecanismo que involucre estos dos aspectos. En cuanto al posible papel del GSH en este proceso, se ha demostrado que la suplementación con GSH mejora la calidad de la criopreservación de espermatozoides

cuando se utiliza hasta una concentración de 2 mM, previniendo la peroxidación lipídica como efecto de su carácter antioxidante (Ansari et al. 2012). Entonces, se podría argüir que la combinación de H y GSH tendría un efecto permeabilizante sobre la membrana, con el consiguiente incremento en el volumen nuclear y celular, y la ruptura de las membranas junto con la descondensación de la cromatina. En este caso, el proceso podría permitir la liberación del material genético, retenido por las protaminas, ayudado por las características fisicoquímicas del ADN que le otorgan una viscosidad semejante a la de los complejos de proteoglicanos en las articulaciones. Estos complejos responden al estrés compresivo incorporando o liberando iones y agua, debido a los grupos altamente cargados y fuertemente empaquetados que generan repulsión electrostática. Si bien esto es altamente especulativo, no deja de ser una posible explicación a las imágenes de microscopía electrónica que muestran una destrucción de las membranas, formando posibles "ampollas" ante el aumento significativo del volumen nuclear que acompaña al proceso de descondensación de la cromatina, por un incremento en la permeabilidad de las membranas con ingreso de agua. Resulta llamativo, por otra parte, que a pesar de carecer de membrana plasmática y de protaminas que favorezcan el empaquetamiento, el ADN del espermatozoide descondensado, no se disperse desordenadamente por el resto del preparado. Esto puede relacionarse con que los espermatozoides murinos conservan alrededor de un 1-2% de histonas en su cromatina que, junto con el citoesqueleto, serían las responsables de evitar la total desestabilización y desintegración del núcleo durante la descondensación *in vitro*. En coincidencia con los resultados observados para la cinética de descondensación, utilizar DS + GSH provoca un menor grado de descondensación de la cromatina que la mezcla heparina + GSH; y la suma de ambos GAGs + GSH resulta en una cromatina completamente descondensada (Figura 46D). Estos resultados nuevamente permitirían suponer la existencia de zonas de diferente grado de condensación dentro de la cromatina y distinto acceso a las moléculas, que se harían evidentes cuando se utiliza la combinación de estos dos glicosaminoglicanos para descondensar la cromatina de espermatozoides murinos. Ha sido bien establecido que en células somáticas que están sufriendo la división meiótica, los diferentes grados de condensación a lo largo de la cromatina son responsables de una sincronización desigual cuando los cromosomas se duplican; nuestros hallazgos podrían reflejar una situación similar para la cromatina espermática.

La microscopia electrónica, también reveló que a medida que avanza la descondensación, las membranas se desorganizan y eventualmente desaparecen, dejando altas concentraciones de cromatina condensada en la periferia de la célula. Esta observación es consistente con los descubrimientos realizados por el grupo de Sánchez-Vázquez (Sánchez-Vázquez, R. Reyes, et al. 1996), quienes mostraron resultados similares con H y GSH en espermatozoides de ratón. El hecho que el proceso de descondensación comience en la zona caudal de la cabeza del espermatozoide, probablemente refleja la falta de teca perinuclear en esta región y

apoya los hallazgos de Ramalho-Santos (Ramalho-Santos et al. 2000) quien demostró, usando el modelo del mono Rhesus, que la persistencia de la teca perinuclear luego del ICSI previene la descondensación de la cromatina. Una vez más, estos resultados podrían indicar que la teca perinuclear está involucrada en el proceso de descondensación de la cromatina.

Nuestros resultados apoyan la idea de la existencia de diferencias en la condensación de la cromatina en el núcleo del espermatozoide murino y humano y, probablemente, no solamente debido a la diferencia en la proporción de las protaminas, sino también al porcentaje de histonas que quedan ancladas al ADN en cada especie. Esto, sin duda, confiere características particulares y específicas a la cromatina, con efectos importantes en la epigenética y el desarrollo embrionario (Arpanahi et al. 2009; Miller et al. 2010; Pittoggi et al. 1999). Considerando que la epigenética se refiere a todos aquellos cambios en la cromatina que, sin modificar la secuencia nucleotídica, inciden en la expresión de los genes, tanto una alteración en la proporción de las protaminas P1:P2, como también una alteración en su estado redox, podrían tener una incidencia deletérea en el proceso reproductivo de los mamíferos.

En conclusión, estos resultados presentan por primera vez evidencia de que dos moléculas que están normalmente presentes en el fluido folicular y el CCO y que comparten ciertas características fisicoquímicas, actúan de manera sinérgica en la descondensación *in vitro* del espermatozoide murino. La presencia del DS adentro del oocito no ha sido demostrada todavía, por lo que, hasta ahora, no es posible conocer la relevancia biológica de este efecto sinérgico *in vivo*. De todas maneras, se puede especular que este comportamiento cooperativo, en un evento tan importante como es la descondensación, está posiblemente reflejando distintos grados de condensación cromatínica y por qué no así la posibilidad de introducir un punto regulatorio en el proceso, lo que podría ser de vital relevancia para el embrión.

Posible utilización del análisis de la descondensación de la cromatina espermática murina u otros parámetros de la fisiología espermática, como indicadores del efecto de tóxicos reproductivos ambientales o ingeridos.

De lo expuesto en la primera parte de esta discusión, debe haber quedado en claro la importancia que tiene la condensación de la cromatina espermática y su posterior descondensación, una vez ocurrida la fecundación, para la generación y mantenimiento del embrión y, también, cómo podría resultar alterada ante pequeños cambios en la proporción de protaminas, histonas y/o posible estado redox de las mismas o el material genético en sí mismo.

Se demostró ampliamente que los plaguicidas (organoclorados y organofosforados) pueden dañar la línea germinal y las células somáticas del testículo, y que sus efectos son genotóxicos y teratogénicos (Bonde & Storgaard 2002). Los plaguicidas organoclorados alteran la calidad de los espermatozoides, así como también la

estructura de la cromatina y del ADN en diferentes etapas de la espermatogénesis (Salazar-Arredondo et al. 2008). El endosulfán es un insecticida y acaricida organoclorado utilizado mundialmente. Debido a su alta toxicidad y poder de bioacumulación, su utilización ha sido prohibida en numerosos países, incluida la Argentina. Si bien en nuestro país debió dejar de utilizarse a partir del 2013, no se descartan efectos residuales, no se sabe qué se hará con el material remanente que ya se ha acumulado y, dado que tampoco se conoce en mamíferos el efecto sobre la reproducción, es un punto interesante a estudiar. El espermatozoide, una célula altamente diferenciada, posee una cromatina muy condensada, transcripcionalmente inactiva y un compartimiento citoplasmático metabólicamente poco activo. Debido a que el espermatozoide tiene una proporción superficie/volumen muy grande (más de 50:1) es, posiblemente, propenso a sufrir los efectos de los plaguicidas, pudiendo afectar el resultado de la fecundación debido a sus efectos secundarios sobre la función celular (Selvaraju et al. 2011).

Para esta parte del trabajo de tesis doctoral, la idea original fue estudiar el efecto de dos tipos de tóxicos reproductivos, uno normalmente encontrado en el ambiente como resultado de su utilización para fumigación (endosulfán) y otro, encontrado en el organismo como resultado de su ingesta (etanol) como bebida. Sin embargo, por razones que tuvieron que ver con la utilización del endosulfán en el bioterio, el comité de ética del IBYME no autorizó la realización de experimentos *in vivo* intoxicando animales por vía intraperitoneal. Fue por ello, que nos vimos obligados a realizar experimentos *in vitro* únicamente. Si bien esto puede parecer, en primera instancia, una falla en el estudio, permitió centrar la atención en la posible utilización de espermatozoides murinos y humanos como centinelas, indicadores de la presencia de este tóxico en el ambiente, analizando distintos aspectos de su funcionamiento: viabilidad, motilidad y descondensación cromatínica.

Cabe destacar que, aprovechando la existencia del grupo de trabajo del Dr. Enrique Luque en la Universidad del Litoral, que trabaja sobre los efectos *in vivo* del endosulfán pero en el modelo de rata, concurrimos a su laboratorio para estudiar la descondensación de la cromatina de espermatozoide de rata, en condiciones de intoxicación leve con este compuesto. La necesidad de compatibilización de los experimentos del grupo del Dr. Luque, sumada a la ya mencionada diferencia en el tiempo de descondensación de los espermatozoides de rata comparados con los de ratón, hizo que los resultados obtenidos no pudiesen ser analizados estadísticamente por el bajo número de puntos y, por lo tanto, no forman parte de este manuscrito. Por el contrario, el estudio del efecto del etanol sobre el organismo, ingerido en el agua de bebida, o directamente sobre los espermatozoides en experimentos *in vitro*, sí pudo realizarse con la colaboración de la Dra. Elisa Cebral y permitió evaluar diversos parámetros de la función espermática, tales como viabilidad, motilidad, reacción acrosomal, hiperactivación, descondensación cromatínica y, además, continuar con la evaluación de su efecto sobre la fecundación *in vitro* de oocitos murinos.

Endosulfán

Cuando se utilizan herbicidas o plaguicidas, no es frecuente que se emplee el principio activo en forma pura, porque generalmente sus características fisicoquímicas hacen que no atraviesen libremente o fácilmente las membranas celulares, sino que se utiliza una formulación con diversos excipientes (no siempre conocidos) para facilitar el acceso a los organismos para los que están destinados. Por lo tanto, muchas veces el efecto observado de estos compuestos radica más en la combinación del principio activo con otros compuestos que en el principio activo, siendo los resultados engañosos al mostrar una toxicidad disminuida o nula, por la simple razón de que el compuesto puro no penetró los lugares destinados para su acción.
Por esto, en la medida de lo posible, utilizamos no solamente el principio activo sino también formulaciones comerciales que, normalmente, son las encontradas en el mercado y utilizadas en el tratamiento de los cultivos. Asimismo, se utilizaron las concentraciones que es esperable encontrar en el ambiente o para las que se contó con referencia bibliográfica adecuada.

Espermatozoides murinos

Las evidencias que apuntan a un efecto deletéreo del endosulfán sobre la función espermática, son consistentes con nuestros hallazgos *in vitro* cuando se incubaron espermatozoides con endosulfán en distintas formulaciones, en los que se observó que el porcentaje de motilidad disminuyó drásticamente en presencia del plaguicida.
La motilidad del espermatozoide depende, fundamentalmente, de dos factores: uno es la generación de energía por las mitocondrias y el otro es la posibilidad de las proteínas del flagelo de formar y romper puentes disulfuro. El trabajo de Cabrillana (Cabrillana et al. 2011), indica claramente que durante la maduración epididimaria, se modifican las uniones puentes disulfuro, involucradas no solamente en la condensación de la cromatina sino también en la estabilización de las organelas de la cola. La proteína ODF-1 (outer dense fiber 1) fue relacionada, particularmente, con la motilidad espermática. Como todo cambio macroscópico puede, muy probablemente, ser reflejo de una modificación molecular que obedece a un cambio genético, debe tenerse en cuenta que, dependiendo de la naturaleza del plaguicida, éste puede actuar directamente sobre el ADN, inducir estrés oxidativo o modificar la epigenética.
Se cree que las sustancias con características estrogénicas, generadas como resultado del metabolismo endógeno de los andrógenos dentro del tracto reproductor masculino o como consecuencia de la exposición ambiental, están relacionadas con la producción de ROS y el daño en el ADN (Bennetts et al. 2008). Algunos grupos afirman que el endosulfán produce estrés oxidativo afectando de esta manera al ADN espermático y que el tratamiento con vitamina E revierte efectivamente la disminución en cantidad y calidad de los espermatozoides producida por el plaguicida, protegiendo

la estructura testicular de los daños causados por el endosulfán. Estos efectos podrían deberse al poder antioxidante de la vitamina E que actuaría disminuyendo los efectos negativos del endosulfán sobre el sistema reproductivo (Wang et al. 2012b). Debido a la naturaleza liposoluble de la vitamina E, todo esto apunta a peroxidación de lípidos de membrana. Sin embargo, todavía no se conocen los efectos de este plaguicida sobre la descondensación de la cromatina. Los resultados encontrados en los experimentos realizados en esta tesis indicarían que el endosulfán, *in vitro,* actúa favoreciendo la misma (Figura 48 y Figura 49). Por lo que mencionaré más adelante, muy probablemente este incremento en la descondensación sería el resultado de modificaciones a nivel de la membrana del espermatozoide que permitirían un mejor ingreso de los agentes descondensantes a la célula.

Un aumento en la descondensación de la cromatina, dejaría al ADN más expuesto a ser atacado por especies reactivas de oxígeno, en el caso que este compuesto las hubiese generado. Un ADN más expuesto, podría ser susceptible a ver incrementada su fragmentación y, por lo tanto, se decidió evaluar el efecto del endosulfán sobre este parámetro y los resultados demostraron que hay un aumento significativo del porcentaje de espermatozoides con TUNEL positivo, sugiriendo que existe un aumento de la fragmentación del ADN en presencia del plaguicida (Figura 51). Hay evidencias en la bibliografía que indican que el endosulfán provocaría la apoptosis de células germinales de ratón mediante la desregulación de los canales de Ca^{2+} (Ren et al. 2008) así como también de células mononucleares. Si bien la técnica de TUNEL es un método estandarizado en células intactas y su efectividad es bien conocida, en el año 2010, Mitchell (Mitchell et al. 2011) publicó resultados que indicarían que el ensayo convencional de TUNEL no es un método sensible para analizar la fragmentación del ADN espermático debido a que la alta compactación de la cromatina de los espermatozoides impide el correcto acceso de la enzima TdT a los sitios donde el ADN está clivado. En sus experimentos, Mitchell demostró que el pretratamiento de los espermatozoides con DTT incrementaba significativamente los niveles de daño detectados en el ADN mediante el ensayo de TUNEL. Teniendo en cuenta estos antecedentes, para evaluar los efectos del endosulfán sobre la cromatina de los espermatozoides murinos, la técnica se realizó sobre espermatozoides previamente descondensados. Debido a esta variante en la técnica, es que decidimos analizar si existía alguna correlación entre el grado de descondensación de la cromatina y la fragmentación del ADN (Figura 52). En ninguno de los casos, tanto en los espermatozoides que fueron expuestos al plaguicida como en los que no, se observó correlación alguna entre el grado de descondensación cromatínica y la fragmentación de ADN, expresada como TUNEL positivo. Esto parecería sugerir que la fragmentación del ADN no estaría aumentada como consecuencia de la descondensación, sino que, tal vez, la fragmentación sea una consecuencia de la presencia directa del endosulfán o de especies reactivas generadas por esta molécula, sobre un ADN más libre y susceptible de ser atacado. Por lo tanto, el aumento en la descondensación tal vez

haya sido producto de un mayor y mejor ingreso de las sustancias descondensantes debido al efecto del tóxico de endosulfán sobre la membrana del espermatozoide. Lamentablemente, por problemas ajenos al laboratorio, no fue posible cerrar este trabajo de tesis doctoral con el análisis del estado de las membranas de los espermatozoides tratados con endosulfán y sus formulaciones, mediante microscopía electrónica de transmisión y/o barrido.

De haber podido realizar los estudios *in vivo*, tal vez se hubiese podido demostrar que la fragmentación del ADN no ocurriría como un efecto directo del endosulfán sino como producto de los efectos negativos que el plaguicida produce directamente sobre las células germinales, o a través de la muerte celular de las células de Sertoli, debido a un aumento del daño oxidativo y la consecuente activación de la vía apoptótica intrínseca afectando, eventualmente, la producción de gametas (Rastogi et al. 2014).

Habiendo encontrado un efecto sobre la motilidad espermática y sobre la descondensación, como paso previo al estudio del estado redox de las células, se decidió utilizar la técnica de mBBr para evaluar la presencia de grupos tiol libres en los espermatozoides. Los resultados no mostraron diferencias entre los espermatozoides control y tratados con el endosulfán, aún cuando el endosulfán había incrementado significativamente la descondensación cromatínica (Figura 54).

Para continuar con el estudio de los efectos del endosulfán *in vitro* sobre el estado redox celular, partimos de la base que datos bibliográficos recientes indican que el endosulfán es capaz de incrementar la producción de ROS como resultado de la acción de la NADPH-oxidasa, así como también de la familia de oxidasas NOX. Además, estimularía la vía de señalización Akt/MAPK y la expresión de COX-2 en macrófagos de ratón (Kim et al. 2015). Otros investigadores demostraron que el endosulfán genera rupturas en la doble hebra de ADN por un mecanismo dependiente de ROS en células HaCat (Antherieu et al. 2007). Por otro lado, cuando se estudió su efecto *in vitro* sobre células Jurkat T en concentraciones entre 0 y 100 μM, el endosulfán actuó inhibiendo la enzima SOD y el GSH. La generación de ROS resultó ser dependiente de la dosis y tiempo de incubación (Kannan & Jain 2003). Estudios realizados en el cerebro de ratas demostraron que el endosulfán induce la formación de ROS y peroxidación lipídica. Lo mismo ocurrió cuando se investigó su efecto en *S. cerevisiae* y líneas celulares humanas (Sohn et al. 2004).

En el presente trabajo de tesis, al estudiar la posibilidad que el endosulfán fuera responsable de generar estrés oxidativo en los espermatozoides murinos, midiendo la actividad de sistemas enzimáticos relacionados con la regulación del estado redox de la célula, así como también la generación de GSH y la peroxidación lipídica, no fue posible observar diferencias significativas entre los espermatozoides incubados con endosulfán y los controles (Figura 55). La inspección de esta Figura pone de manifiesto que los errores son bastante elevados, lo cual hace pensar que ameritaría, en un futuro, incrementar el n de estos experimentos o encontrar una manera de mejorar la técnica para disminuir su variabilidad.

Espermatozoides humanos

Teniendo en cuenta que, si bien el modelo murino resulta de gran utilidad para implementar un modelo *in vitro* que permita el estudio de los efectos tóxicos de plaguicidas como el endosulfán, debido a la facilidad de obtención de las gametas, la existencia de personas intoxicadas con este y otros productos similares, ameritó el estudio del efecto del plaguicida *in vitro* sobre los parámetros espermáticos de muestras humanas.

El análisis de la viabilidad y motilidad de los espermatozoides humanos, obtenidos de dadores voluntarios sanos, mostró resistencia a la muerte y una alteración de la motilidad solamente a la concentración más elevada utilizada de endosulfán Zebra Ciagro® (Figura 56).

Al analizar la descondensación de la cromatina espermática en espermatozoides humanos, la única formulación de endosulfán capaz de afectarla fue el Zebra Ciagro® resultando en un incremento de la misma (Figura 57). Queda analizar la fragmentación del ADN y la presencia de especies reactivas de oxígeno que, probablemente y a la luz de los resultados obtenidos en el modelo murino, tampoco resulten en datos concretos, teniendo en cuenta la mayor estabilidad y resistencia de los espermatozoides humanos en comparación con los de ratón.

Tomando todos los resultados en su conjunto, el efecto del plaguicida endosulfán en sus diversas formulaciones, parece afectar la motilidad de los espermatozoides y la descondensación de la cromatina, incrementándola, sin modificar el estado redox de la célula, pero posiblemente, afectando la integridad de la membrana plasmática y, de este modo, permitiendo un mejor ingreso de los agentes descondensantes. Como consecuencia de una cromatina más laxa, se produciría una mayor fragmentación del ADN, con las posibles consecuencias deletéreas en la fecundación y posterior formación y desarrollo embrionario.

Etanol

Hace tiempo se demostró que el etanol podría tener un efecto directo sobre las gónadas (Van Thiel et al. 1978; Dees & Skelley 1990) y el eje hipotálamo- hipofisario (Cicero & Badger 1977; Dees et al.; Välimäki et al. 1990). En los humanos, se mostró que las consecuencias clínicas del etanol desencadenan retraso en la madurez sexual y afectan tanto la fertilidad como el desarrollo de las características sexuales secundarias (Anderson et al. 1987). Sin embargo, a pesar de que el etanol es una sustancia ampliamente usada, sus efectos sobre la función reproductiva masculina siguen siendo controversiales (Auger et al. 2001; Martini et al. 2004; Muthusami & Chinnaswamy 2005; Pajarinen et al. 1996). La especie murina resultó ser particularmente útil para estudiar los efectos del etanol sobre la función reproductiva masculina (Anderson et al. 1981; Anderson et al. 1983; Morton et al. 2014; Weston

et al. 1994; Wieczorek et al. 2015) debido a la similitud entre los núcleos de espermatozoides murinos y humanos.

Para los efectos de este trabajo de tesis doctoral, se simuló un consumo semicrónico de etanol, con un 15% V/V en el agua de bebida. Al analizar los parámetros seminales, se encontró una alta frecuencia de cabezas y colas anormales como consecuencia del consumo semicrónico de etanol en ratones CF-1 (Tabla 2), lo que es consistente con hallazgos previos en humanos (Gaur et al. 2010; Joo et al. 2012). Probablemente esto se deba a los efectos genotóxicos sobre las células somáticas y a las anormalidades morfológicas y aberraciones morfológicas de las espermatogonias y la metafase meiótica encontradas en hombres alcohólicos (Lewis-Jones et al. 2003). La cabeza del espermatozoide se considera normal cuando la membrana plasmática, la envoltura nuclear y la cromatina tienen apariencia normal, junto con los componentes del axonema, las mitocondrias y la membrana plasmática del flagelo.

Si bien el consumo de etanol en las condiciones estudiadas no demostró afectar significativamente el porcentaje de motilidad de los espermatozoides provenientes de animales alcoholizados, resulta llamativo que la misma fue ligeramente mayor que la de los espermatozoides de ratones control, a todos los tiempos estudiados (Figura 59). Estos resultados contrastan con aquellos encontrados en la bibliografía, dado que en general diversos trabajos han reportado una disminución en la motilidad de espermatozoides provenientes de animales intoxicados (Condorelli et al. 2015). De todas maneras, como ya mencionara, las diferencias encontradas en esta tesis no fueron significativas.

Por el contrario, el porcentaje de hiperactivación fue significativamente menor en los espermatozoides que se obtuvieron de animales tratados, con respecto a los espermatozoides provenientes de animales control (Figura 60). Las anomalías en el axonema y el periaxonema son características que se encuentran en los hombres infértiles, y se cree que están relacionadas con la pérdida de motilidad de los espermatozoides de estos pacientes. Además, las malformaciones en ciertas regiones del núcleo de los espermatozoides se han asociado a daño en el ADN (Mauri et al. 2011). En este trabajo encontramos diferencias significativas en el número de espermatozoides con núcleo y flagelo morfológicamente anormal, lo que probablemente esté asociado con las dificultades de los espermatozoides del grupo de animales intoxicados para alcanzar el mismo nivel de hiperactivación que los de los controles.

La reacción acrosomal es requisito para que el espermatozoide pueda fecundar al oocito. Al analizar este evento, se encontró un porcentaje menor de espermatozoides provenientes de ratones alcoholizados capaz de sufrir reacción acrosomal, ya sea espontáneamente o en respuesta al estímulo con progesterona (Figura 61). Muy probablemente esto sea indicativo de modificaciones a nivel de la membrana, con una posible alteración de los receptores para progesterona o, alternativamente, alguna otra alteración que justifique una mayor estabilidad de la membrana y generar una

mayor resistencia a la reacción. También podría relacionarse con la capacidad del etanol de interferir con los mecanismos de transducción de señales que disparan respuestas intracelulares (Hoek & Rubin 1990).

Si tomamos estos resultados en conjunto, el consumo de etanol parecería modificar dos eventos importantes previos a la fecundación: 1) la hiperactivación, que permite que el espermatozoide atraviese la capa de células granulosas y también la zona pelúcida, y 2) la reacción acrosomal, que facilita el ingreso del espermatozoide hacia la zona pelúcida y su llegada al oolema y que a su vez es necesaria para que el espermatozoide adquiera la capacidad de fusionarse con el ooplasma. A este respecto, antecedentes previos sostienen que el etanol afecta la fecundación *in vitro* e *in vivo* (Anderson et al. 1981; Anderson et al. 1983) mediante la inhibición de procesos esenciales (capacitación y reacción acrosomal) que preceden a la penetración del oocito.

Existe evidencia en la literatura, que sugiere que el etanol podría inducir anormalidades en la integridad nuclear de los espermatozoides (Anifandis et al. 2014; Eid et al. 2002). En este trabajo de tesis, cuando se analizó la descondensación cromatínica, la misma se vio ligeramente incrementada en espermatozoides de animales intoxicados, comparada con los valores de espermatozoides control (Figura 62). Estos resultados concuerdan con los reportados en un trabajo realizado en ratas alcoholizadas en el que, utilizando técnicas diferentes de las utilizadas en este trabajo de tesis, se concluye que el consumo de etanol genera espermatozoides con la cromatina más descondensada (a R. Talebi et al. 2011).

El núcleo del espermatozoide murino y humano contiene un 95% y un 85% de protaminas, respectivamente (Bellvé et al. 1988; Bench et al. 1996). Por lo tanto, la cromatina de los espermatozoides humanos está menos compactada que la de los espermatozoides murinos. Por otro lado, en los espermatozoides humanos y murinos, los puentes disulfuro en las protaminas y la condensación de la cromatina están disminuidos con respecto a otras especies que solamente contiene P1, porque P2 tiene menos residuos de cisteína que P1 (Corzett et al. 2002b; Jager 1990). Teniendo esto en cuenta, y considerando las diversas causas de daño en el ADN entre las que se incluye el empaquetamiento anormal de la cromatina durante la espermiogénesis, la apoptosis y la producción excesiva de especies reactivas del oxígeno (Esfahani & Hossein 2008), es tentador pensar en la alteración de la cromatina como consecuencia del consumo del etanol.

Haber encontrado diferencias significativas en el proceso de descondensación *in vitro* de espermatozoides provenientes de machos intoxicados con respecto a los espermatozoides control, permitió sospechar la existencia de efectos adversos del etanol sobre la fecundación. Por otra parte, hay suficiente evidencia en la literatura que afirma que el etanol afecta las tasas y los parámetros asociados a los tratamientos de fecundación *in vitro* (Nicolau et al. 2014; Rossi et al. 2011; Wdowiak et al. 2014). En el año 1983 Anderson (Anderson et al. 1983) analizó el efecto del consumo del etanol

sobre espermatozoides de ratón y observó una reducción de la fertilidad en función de la dosis de etanol y el tiempo de exposición utilizados. Sin embargo, años después, Cebral (Cebral et al. 2007) demostró que el consumo de etanol no disminuía las tasas de fecundación cuando se inseminaban oocitos provenientes de hembras control con espermatozoides provenientes de ratones macho intoxicados. Al evaluar el efecto del etanol *in vivo* sobre la fecundación *in vitro* en este trabajo, se observó que el porcentaje de oocitos con cabezas de espermatozoides descondensadas aumentó en el caso de los animales intoxicados con respecto a los controles en el primer tiempo analizado (Figura 64). Sin embargo, a las 3,5 horas posteriores a la FIV este porcentaje disminuyó conforme la fecundación avanzó y los núcleos descondensados se transformaron en pronúcleos. Consecuentemente, en este tiempo se observó un mayor porcentaje de pronúcleos en los animales tratados con etanol que en los controles (Figura 65). Lo mismo sucedió a las 4,5 horas. Esta diferencia en la cinética de descondensación *in vivo* de ambos grupos estaría indicando una aceleración del proceso de descondensación de la cromatina y formación de pronúcleos en los animales intoxicados con etanol. De la misma manera, cuando se analizó el porcentaje de fecundación total, éste fue mayor en los animales intoxicados que en los animales control (Figura 66). Los resultados revelan que la ingestión semicrónica de etanol afecta la dinámica de la fecundación *in vitro* de ratones macho intoxicados, y sería importante estudiar los mecanismos por los cuales se producen estos cambios, profundizando en las posibles consecuencias que esto podría acarrear en el desarrollo posterior del embrión horas o días después.

Un posible mecanismo responsable del incremento del daño en la cromatina nuclear y el ADN de los espermatozoides provenientes de ratones intoxicados con etanol es el estrés oxidativo. Evidencias previas sugieren que bajos niveles de ROS son capaces de activar vías de señalización importantes responsables de la maduración, capacitación, hiperactivación y reacción acrosomal de los espermatozoides (Du Plessis et al. 2015).

Considerando los cambios observados en los parámetros espermáticos en este trabajo, se planteó analizar el efecto del consumo de etanol sobre el estado redox de las células. Hay muchos trabajos en los que se ha reportado un aumento de los ROS y una disminución de moléculas antioxidantes como consecuencia del consumo de etanol. A tal efecto, estudiamos la actividad de las enzimas GST y SOD, como también el contenido en GSH y la formación de malondialdehído como índice general de formación de especies reactivas de oxígeno. En nuestras condiciones de trabajo, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros analizados, probablemente debido al bajo número de datos incluidos y a la gran variabilidad en los experimentos realizados (Figura 67). Es bien sabido que los ROS son la causa principal de ruptura del ADN y por lo tanto, sería de gran importancia poder continuar estos experimentos a fin de dilucidar el mecanismo y su relación con la mayor descondensación de la cromatina de los espermatozoides.

CONCLUSION

Este trabajo de tesis doctoral permitió caracterizar el proceso de descondensación de la cromatina de espermatozoides murinos, arrojando nueva luz al mecanismo molecular al encontrar un posible efecto sinérgico entre dos glicosaminoglicanos encontrados en el microambiente donde ocurre la fecundación: el dermatán sulfato y el heparán sulfato (mediante el uso de su análogo estructural, la heparina). Esto no solamente resulta un dato novedoso, sino que sugiere una descondensación diferencial en distintas regiones de la cromatina que, en un estudio translacional podría ser aprovechado para el análisis de pacientes que consultan por problemas de fertilidad y cuyos espermatozoides permanecen condensados, aún luego del tratamiento por ICSI.

La posible utilización del análisis de descondensación cromatínica como indicativo de la presencia y efecto de desorganizadores reproductivos como el endosulfán y el etanol, no parece ser muy efectiva dado que su sensibilidad no resultaría adecuada. Sin embargo, el estudio indicó que la exposición a ambos tóxicos resultaba en una mayor descondensación cromatínica. Si bien esto podría tomarse como una señal positiva, existen antecedentes bibliográficos que indican que una mayor descondensación no necesariamente se correlaciona con una mejor velocidad de penetración espermática (Carrell et al. 1998), sino que puede traer como consecuencia una mayor inestabilidad genética con mayor incidencia en la fragmentación del ADN, con el consecuente efecto deletéreo para la formación de un embrión viable.

Considero que este trabajo ha permitido incorporar nueva información al conocimiento y comprensión del complejo proceso de la fecundación en mamíferos, con una posible aplicación a la salud reproductiva humana. Así mismo, ha dado los primeros pasos a una solución *in silico* del todavía no resuelto problema de la interacción nuclear entre ADN, protaminas y los GAGs posiblemente responsables de la descondensación *in vivo*, ese paso fundamental hacia la singamia.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Abazari-Kia, A.H. et al., 2014. Intracellular glutathione content, developmental competence and expression of apoptosis-related genes associated with G6PDH-activity in goat oocyte. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31(3), pp.313–21. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24356867.

Addolorato, G. et al., 1997. Energy expenditure, substrate oxidation, and body composition in subjects with chronic alcoholism: new findings from metabolic assessment. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 21(6), pp.962–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9309302 [Accedido febrero 15, 2016].

Aebi, H. et al., 1964. Separation of catalase and other red cell enzymes from hemoglobin by gel filtration. *Experientia*, 20(2), pp.103–4. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5852152 [Accedido febrero 15, 2016].

Aitken, R.J., 1997. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Molecular human reproduction*, 3(3), pp.169–73. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9237243.

Aitken, R.J. et al., 2003. Multiple forms of redox activity in populations of human spermatozoa. *Molecular human reproduction*, 9(11), pp.645–61. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561808 [Accedido febrero 15, 2016].

Aitken, R.J. & Sawyer, D., 2003. The human spermatozoon--not waving but drowning. *Advances in experimental medicine and biology*, 518, pp.85–98. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12817679 [Accedido febrero 15, 2016].

Ajduk, A., Yamauchi, Y. & Ward, M.A., 2006. Sperm chromatin remodeling after intracytoplasmic sperm injection differs from that of in vitro fertilization. *Biology of reproduction*, 75(3), pp.442–51. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16775225 [Accedido enero 27, 2016].

Allen, M.J. et al., 1993. Atomic force microscopy of mammalian sperm chromatin. *Chromosoma*, 102(9), pp.623–30. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8306824 [Accedido febrero 9, 2016].

Aly, H.A.A. & Khafagy, R.M., 2014. Taurine reverses endosulfan-induced oxidative stress and apoptosis in adult rat testis. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 64, pp.1–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24262488 [Accedido enero 16, 2016].

Alyea, R.A. & Watson, C.S., 2009. Differential regulation of dopamine transporter function and location by low concentrations of environmental estrogens and 17beta-estradiol. *Environmental health perspectives*, 117(5), pp.778–83. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2685841&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 14, 2016].

Anderson, D. et al., 2003. Oestrogenic compounds and oxidative stress (in human sperm and lymphocytes in the Comet assay). *Mutation research*, 544(2-3), pp.173–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644319 [Accedido febrero 16, 2016].

Anderson, M.E., 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in enzymology*, 113, pp.548–55. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4088074 [Accedido febrero 8, 2016].

Anderson, R.A. et al., 1989. Biochemical and structural evidence for ethanol-induced impairment of testicular development: apparent lack of Leydig cell involvement. *Toxicology and applied pharmacology*, 100(1), pp.62–85. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2763303 [Accedido enero 16, 2016].

Anderson, R.A. et al., 1987. Delayed pubertal development of the male reproductive tract associated with chronic ethanol ingestion. *Biochemical pharmacology*, 36(13), pp.2157–67. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3606634 [Accedido febrero 10, 2016].

Anderson, R.A., 1981. Endocrine balance as a factor in the etiology of the fetal alcohol syndrome. *Neurobehavioral toxicology and teratology*, 3(2), pp.89–104. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7019743 [Accedido febrero 5, 2016].

Anderson, R.A. et al., 1983. Ethanol-induced male infertility: impairment of spermatozoa. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 225(2), pp.479–86. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6682442 [Accedido enero 27, 2016].

Anderson, R.A. et al., 1981. Tetratological evaluation of mouse fetuses after paternal alcohol ingestion. *Neurobehavioral toxicology and teratology*, 3(2), pp.117–20. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7254458 [Accedido enero 27, 2016].

Anifandis, G. et al., 2014. The impact of cigarette smoking and alcohol consumption on sperm parameters and sperm DNA fragmentation (SDF) measured by Halosperm(®). *Archives of gynecology and obstetrics*, 290(4), pp.777–82. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24840110 [Accedido enero 26, 2016].

Ansari, M.S. et al., 2012. Glutathione-supplemented tris-citric acid extender improves the post-thaw quality and in vivo fertility of buffalo (Bubalus bubalis) bull spermatozoa. *Reproductive biology*, 12(3), pp.271–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23153697 [Accedido febrero 9, 2016].

Antherieu, S. et al., 2007. Endosulfan Decreases Cell Growth and Apoptosis in Human HaCaT Keratinocytes: Partial ROS-Dependent ERK1/2 Mechanism. *J. Cell. Physiol*, 213, pp.177–186.

Aravin, A.A. & Bourc, D., 2008. Small RNA guides for de novo DNA methylation in mammalian germ cells. *Genes and Development*, 22(8), pp.970–975.

Arnold, K. et al., 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 22(2), pp.195–201. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16301204 [Accedido octubre 8, 2014].

Arpanahi, A. et al., 2009. Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Research*, 19(8), pp.1338–1349.

Astoviza, M.J. et al., 2016. Massive airborne Endosulfan inputs related to intensive agriculture in Argentina's Pampa. *Chemosphere*, 144, pp.1459–66. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26495831 [Accedido febrero 15, 2016].

Aten, R.F., Duarte, K.M. & Behrman, H.R., 1992. Regulation of ovarian antioxidant vitamins, reduced glutathione, and lipid peroxidation by luteinizing hormone and prostaglandin F2 alpha. *Biology of reproduction*, 46(3), pp.401–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1617013 [Accedido febrero 16, 2016].

Auger, J. et al., 2001. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Human reproduction (Oxford, England)*, 16(12), pp.2710–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726600 [Accedido enero 27, 2016].

Austin, C.R., 1951. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Australian journal of scientific research. Ser. B: Biological sciences*, 4(4), pp.581–96. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14895481 [Accedido diciembre 31, 2015].

Austin, C.R. & Braden, A.W.H., 1952. Passage of the sperm and the penetration of the egg in mammals. *Nature*, 170(4335), pp.919–21. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13013256

[Accedido diciembre 31, 2015].

Baker, M.A. et al., 2004. Identification of cytochrome P450-reductase as the enzyme responsible for NADPH-dependent lucigenin and tetrazolium salt reduction in rat epididymal sperm preparations. *Biology of reproduction*, 71(1), pp.307–18. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15031143 [Accedido febrero 15, 2016].

Baker, M.A. & Aitken, R.J., 2004. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216, pp.47–54.

Balhorn, R., 1982. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *The Journal of cell biology*, 93(2), pp.298–305. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2112839&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 2, 2016].

Balhorn, R., 2007. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology*, 8.

Balhorn, R., Gledhill, B.L. & Wyrobek, A.J., 1977. Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. *Biochemistry*, 16(18), pp.4074–80. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/911755 [Accedido enero 29, 2016].

Ball, B.A., Vo, A.T. & Baumber, J., 2001. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *American journal of veterinary research*, 62(4), pp.508–15. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11327456 [Accedido febrero 16, 2016].

Bánfi, B. et al., 2001. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *The Journal of biological chemistry*, 276(40), pp.37594–601. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483596 [Accedido febrero 15, 2016].

Baraona, E. et al., 2001. Gender differences in pharmacokinetics of alcohol. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 25(4), pp.502–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11329488 [Accedido febrero 3, 2016].

Barros, C. & Muñoz, G., 1973. Sperm-egg interaction in immature hamster oocytes. *The Journal of experimental zoology*, 186(1), pp.73–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4754413 [Accedido febrero 14, 2016].

Barry, J.M. & Merriam, R.W., 1972a. Swelling of hen erythrocyte nuclei in cytoplasm from Xenopus eggs. *Experimental Cell Research*, 71(1), pp.90–96. Available at: papers2://publication/uuid/C4878F4E-5005-48DE-AF5A-5D29909FE3CD.

Barry, J.M. & Merriam, R.W., 1972b. Swelling of hen erythrocyte nuclei in cytoplasm from Xenopus eggs. *Experimental cell research*, 71(1), pp.90–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4554575 [Accedido enero 10, 2016].

Beauchamp, C. & Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), pp.276–87. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4943714 [Accedido diciembre 30, 2015].

Beckman, K.B. & Ames, B.N., 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*, 78(2), pp.547–81. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9562038 [Accedido enero 25, 2016].

Bedford, J., Bent, M. & Calvin, H., 1973. Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility*, 33, pp.19–29. Available at: http://www.reproduction-online.org/content/33/1/19.short.

Bedford, J.M., 1998. Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biology of reproduction*, 59(6), pp.1275–87. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9828168.

Bellin, M.E. et al., 1986. Glycosaminoglycans in follicular fluid from women undergoing in vitro fertilization and their relationship to cumulus expansion, fertilization, and development. *Fertility and sterility*, 45(2), pp.244–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2936627 [Accedido febrero 10, 2016].

Bellvé, A.R. et al., 1988. Purification and characterization of mouse protamines P1 and P2. Amino acid sequence of P2. *Biochemistry*, 27(8), pp.2890–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3401454 [Accedido enero 26, 2016].

Bench, G.S. et al., 1996. DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry*, 23(4), pp.263–71. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8900468 [Accedido enero 26, 2016].

Bennetts, L.E. et al., 2008. Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: evidence for cross-linking and redox cycling activities. *Mutation research*, 641(1-2), pp.1–11. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18342339 [Accedido enero 26, 2016].

Berrios, M. & Bedford, J.M., 1979. Oocyte maturation: aberrant post-fusion responses of the rabbit primary oocyte to penetrating spermatozoa. *Journal of cell science*, 39, pp.1–12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/528576 [Accedido enero 6, 2016].

Biasini, M. et al., 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*, 42(Web Server issue), pp.W252–8. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4086089&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido julio 10, 2014].

Bittman, E.L., 2015. Timing in the Testis. *Journal of Biological Rhythms*, XX(X), pp.1–25. Available at: http://jbr.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0748730415618297.

Bizzaro, D. et al., 2000. Sperm decondensation during fertilisation in the mouse: presence of DNase I hypersensitive sites in situ and a putative role for topoisomerase II. *Zygote (Cambridge, England)*, 8(3), pp.197–202. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11014498 [Accedido febrero 15, 2016].

Bonde, J.P. & Storgaard, L., 2002. How work-place conditions, environmental toxicants and lifestyle affect male reproductive function. *International journal of andrology*, 25(5), pp.262–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270022 [Accedido febrero 9, 2016].

Botella, B. et al., 2004. Exposure of women to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environmental research*, 96(1), pp.34–40. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15261782 [Accedido enero 13, 2016].

Bretveld, R.W. et al., 2006. Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 4, p.30. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1524969&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido enero 15, 2016].

Brewer, L., Corzett, M. & Balhorn, R., 2002. Condensation of DNA by Spermatid Basic Nuclear Proteins*.

Brewer, L.R., Corzett, M. & Balhornz, R., 1999. References and Notes 1. , 286(October), pp.3–6.

Brykczynska, U. et al., 2010. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nature structural & molecular biology*, 17(6), pp.679–87. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473313 [Accedido enero 29, 2016].

Buffone, M.G. et al., 2009. Functional consequences of cleavage, dissociation and exocytotic release of ZP3R, a C4BP-related protein, from the mouse sperm acrosomal matrix. *Journal of cell science*, 122(Pt 17), pp.3153–60. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2729263&tool=pmcentrez&renderty

pe=abstract [Accedido enero 5, 2016].

Buffone, M.G. et al., 2012. Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Molecular reproduction and development*, 79(1), pp.4–18. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3240700&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido enero 1, 2016].

Buffone, M.G., Hirohashi, N. & Gerton, G.L., 2014. Unresolved questions concerning Mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Biology of reproduction*, 90(5), p.112. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24671881.

Burns, K.H. et al., 2003. Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5619), pp.633–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12714744 [Accedido febrero 13, 2016].

Bustos Obregon, E. et al., 1975. Morphological appraisal of gametogenesis. Spermatogenetic process in mammals with particular reference to man. *Andrologia*, 7(2), pp.141–163. Available at: http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=1103652&retmode=ref&cmd=prlinks\npapers3://publication/uuid/A8B81287-0677-4225-AC83-D3B6520CD110.

Butinof, M. et al., 2015. Pesticide exposure and health conditions of terrestrial pesticide applicators in Córdoba Province, Argentina. *Cadernos de saúde pública*, 31(3), pp.633–46. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859729 [Accedido enero 16, 2016].

Cabaleiro, T. et al., 2008. Effects of in utero and lactational exposure to endosulfan in prefrontal cortex of male rats. *Toxicology Letters*, 176(1), pp.58–67.

Cabrillana, M.E. et al., 2011. Characterization of flagellar cysteine-rich sperm proteins involved in motility, by the combination of cellular fractionation, fluorescence detection, and mass spectrometry analysis. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 68(9), pp.491–500. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21780308 [Accedido febrero 9, 2016].

Caires, K.C. et al., 2012. Acute ethanol exposure affects spermatogonial stem cell homeostasis in pre-pubertal mice. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 33(1), pp.76–84. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198099 [Accedido enero 16, 2016].

Calvin, H.I. & Bedford, J.M., 1971. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 13, p.Suppl 13:65–75. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5292801 [Accedido noviembre 28, 2015].

Calvin, H.I., Grosshans, K. & Blake, E.J., 1986. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete research*, 14(3), pp.265–275.

Campion, S. et al., 2012. Male reprotoxicity and endocrine disruption. *EXS*, 101, pp.315–60. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3650643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 16, 2016].

Carranco, A. et al., 1983. Heparin-induced nuclei decondensation of mammalian epididymal spermatozoa. *Archives of andrology*, 10(3), pp.213–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6882087 [Accedido enero 8, 2016].

Carrell, D.T., Emery, B.R. & Peterson, C.M., 1998. The correlation of sperm chromatin decondensation following in vitro exposure to heparin and sperm penetration rates. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 15(9), pp.560–4. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3454926&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 10, 2016].

Carrell, D.T. & Liu, L., 2002. Heparin binding sites are present at a higher concentration on sperm of subfertile men than donors of known fertility. *Archives of andrology*, 48(2), pp.147–54. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11868628 [Accedido febrero 13, 2016].

Carrenõ, J. et al., 2007. Exposure of young men to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environmental Research*, 103, pp.55–61.

Ceballos, A. et al., 2009. Spermatozoa capture HIV-1 through heparan sulfate and efficiently transmit the virus to dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 206(12), pp.2717–33. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2806607&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 13, 2016].

Cebral, E. et al., Impaired mouse fertilization by low chronic alcohol treatment. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 32(5), pp.563–72. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9373698 [Accedido enero 16, 2016].

Cebral, E. et al., 2011. Male and female reproductive toxicity induced by sub-chronic ethanol exposure in CF-1 mice. *Cell Biol Toxicol*, 27, pp.237–248.

Cederbaum, A.I., 2012. Alcohol metabolism. *Clinics in liver disease*, 16(4), pp.667–85. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3484320&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido enero 1, 2016].

Chan, R.C., Severson, A.F. & Meyer, B.J., 2004. Condensin restructures chromosomes in preparation for meiotic divisions. *Journal of Cell Biology*, 167(4), pp.613–625.

Chang, M.C., 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168(4277), pp.697–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14882325 [Accedido diciembre 11, 2015].

Chaufan, G., Coalova, I. & Ríos de Molina, M.D.C., 2014. Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: differences with its active ingredient. *International journal of toxicology*, 33(1), pp.29–38. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24434723 [Accedido febrero 8, 2016].

Chen, D.T.N. et al., 2015. ATP consumption of eukaryotic flagella measured at a single-cell level. *Arxiv*, 109(12), pp.2562–2573. Available at: http://arxiv.org/abs/1511.01820.

Chen, M.Y.Y. et al., 2015. Dietary exposure to organochlorine pesticide residues of the Hong Kong adult population from a total diet study. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 32(3), pp.342–51. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25686031 [Accedido enero 16, 2016].

Choudhary, N. & Joshi, S.C., 2003. Reproductive toxicity of endosulfan in male albino rats. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 70(2), pp.285–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12545360 [Accedido enero 16, 2016].

Cicero, T. & Badger, T., 1977. Effects of alcohol on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the male rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 201(2), pp.427–433. Available at: http://jpet.aspetjournals.org/content/201/2/427.short [Accedido febrero 10, 2016].

Clague, N. et al., 1992. The effect of estrous cycle and buthionine sulfoximine on glutathione release from the in vitro perfused rat ovary. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 6(6), pp.533–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1363201 [Accedido febrero 13, 2016].

Cole-Harding, S. & Wilson, J.R., 1987. Ethanol metabolism in men and women. *Journal of studies on alcohol*, 48(4), pp.380–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3613588 [Accedido febrero 5, 2016].

Condorelli, R.A. et al., 2015. Chronic consumption of alcohol and sperm parameters: our experience and

the main evidences. *Andrologia*, 47(4), pp.368–379. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24766499 [Accedido enero 12, 2016].

Cook, C.S., Nowotny, A.Z. & Sulik, K.K., 1987. Fetal alcohol syndrome. Eye malformations in a mouse model. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 105(11), pp.1576–81. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3675291 [Accedido febrero 15, 2016].

Corzett, M., Mazrimas, J. & Balhorn, R., 2002a. Protamine 1: Protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Molecular Reproduction and Development*, 61(February 2001), pp.519–527.

Corzett, M., Mazrimas, J. & Balhorn, R., 2002b. Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Molecular reproduction and development*, 61(4), pp.519–27. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11891924 [Accedido enero 26, 2016].

Coskun, R. et al., 2012. Effects of endosulfan intoxication on pituitary functions. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 50(5), pp.441–3. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22468982 [Accedido febrero 14, 2016].

Cummings, S.A. & Thorgaard, G.H., 1994. Extraction of DNA from fish blood and sperm. *BioTechniques*, 17(3), pp.426, 428, 430. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7818889 [Accedido febrero 15, 2016].

D 'occhio, M.J., Hengstberger, K.J. & Johnston, S.D., 2007. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Animal Reproduction Science*, 101(101), pp.1–17.

Dean, J., 1983. Decondensation of mouse sperm chromatin and reassembly into nucleosomes mediated by polyglutamic acid in vitro. *Developmental biology*, 99(1), pp.210–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6194029 [Accedido febrero 13, 2016].

Dees, W.L. et al., Actions of ethanol on hypothalamic and pituitary hormones in prepubertal female rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 7(1), pp.21–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1968748 [Accedido febrero 5, 2016].

Dees, W.L. & Skelley, C.W., 1990. Effects of ethanol during the onset of female puberty. *Neuroendocrinology*, 51(1), pp.64–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2106089 [Accedido febrero 5, 2016].

Delgado, M. V & Zoller, L.C., 1987. A quantitative and qualitative cytochemical analysis of glycosaminoglycan content in the zona pellucida of hamster ovarian follicles. *Histochemistry*, 87(3), pp.279–87. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3654277 [Accedido enero 11, 2016].

Delgado, N.M. et al., 2001. Heparin and glutathione II: correlation between decondensation of bull sperm cells and its nucleons. *Archives of andrology*, 47(1), pp.47–58. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11442335 [Accedido febrero 13, 2016].

Delgado, N.M. et al., 1982. Heparin binding sites in the human spermatozoa membrane. *Archives of andrology*, 8(2), pp.87–95. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7073393 [Accedido enero 10, 2016].

Delgado, N.M. et al., 1980. Species specific decondensation of human spermatozoa nuclei by heparin. *Archives of andrology*, 4(4), pp.305–13. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7416850 [Accedido enero 10, 2016].

Demott, R.P. & Suarez, S.S., 1992. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biology of reproduction*, 46(5), pp.779–785.

Devi, N.L. et al., 2015. Spatial distribution, source apportionment and ecological risk assessment of residual organochlorine pesticides (OCPs) in the Himalayas. *Environmental science and pollution*

research international, 22(24), pp.20154–66. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26300363 [Accedido enero 16, 2016].

Dietrich, C.P. et al., 1987. A relationship between the inhibition of heparan sulfate and chondroitin sulfate synthesis and the inhibition of molting by selenate in the hemipteran Rhodnius prolixus. *Biochemical and biophysical research communications*, 146(2), pp.652–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2956948 [Accedido febrero 13, 2016].

Donnelly, E.T., McClure, N. & Lewis, S.E., 1999. The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis*, 14(5), pp.505–12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10473655 [Accedido febrero 15, 2016].

Ecklund, P.S. & Levine, L., 1975. Electrophoretic Characterization and Fate after Fertilization In Vivo Sperm Labeling Histological and A utoradiographic Methods. , 66.

Eid, N. a S. et al., 2002. Involvement of Fas system and active caspases in apoptotic signalling in testicular germ cells of ethanol-treated rats. *International journal of andrology*, 25(3), pp.159–67. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12031044.

Esfahani, N. & Hossein, M., 2008. Ar ch ive ive. *International Journal of Fertility and Sterility*, 2(1), pp.1–8.

Evenson, D.P. et al., 1978. Ultrastructure of partially decondensed human spermatozoal chromatin. *Journal of ultrastructure research*, 63(2), pp.178–87. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/671582 [Accedido febrero 13, 2016].

Fang, Y. et al., 2015. Human health risk assessment of pesticide residues in market-sold vegetables and fish in a northern metropolis of China. *Environmental science and pollution research international*, 22(8), pp.6135–43. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25395327 [Accedido enero 16, 2016].

Felix, C.F. et al., 2007. Inhibition of plasma membrane Ca2+-ATPase by heparin is modulated by potassium. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(3), pp.586–96. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17113336 [Accedido febrero 9, 2016].

Fernandez, M.F. et al., 2007. Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. *Environmental health perspectives*, 115 Suppl , pp.8–14. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2174399&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 14, 2016].

Fléchon, J.-E., 2015. The acrosome of eutherian mammals. *Cell and Tissue Research*, (Bedford 2014). Available at: http://link.springer.com/10.1007/s00441-015-2238-0.

Flesch, F.M. & Gadella, B.M., 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 1469(3), pp.197–235.

Foresta, C. et al., 2011. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PloS one*, 6(3), p.e15036. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3051064&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 13, 2016].

Foster, J. a et al., 1997. AM67, a secretory component of the guinea pig sperm acrosomal matrix, is related to mouse sperm protein sp56 and the complement component 4-binding proteins. *The Journal of biological chemistry*, 272(19), pp.12714–22. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9139729.

Frazier, L.M., 2007. Reproductive Disorders Associated with Pesticide Exposure. *Journal of*

Agromedicine, 12(1), pp.27–37. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18032334 [Accedido enero 12, 2016].

Gabriel, K. et al., 1998. The hormonal effects of alcohol use on the mother and fetus. *Alcohol health and research world*, 22(3), pp.170–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15706792 [Accedido febrero 13, 2016].

Gall, W.E. & Ohsumi, Y., 1976. Decondensation of sperm nuclei in vitro. *Experimental cell research*, 102(2), pp.349–58. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/987915 [Accedido febrero 13, 2016].

Gallagher, J.T. & Walker, A., 1985. Molecular distinctions between heparan sulphate and heparin. Analysis of sulphation patterns indicates that heparan sulphate and heparin are separate families of N-sulphated polysaccharides. *The Biochemical journal*, 230(3), pp.665–74. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1152670&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 13, 2016].

Gatewood, J.M. et al., 1990. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *The Journal of biological chemistry*, 265(33), pp.20662–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2243112 [Accedido enero 29, 2016].

Gaur, D., Talekar, M. & Pathak, V.P., 2010. Alcohol intake and cigarette smoking: Impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 53(1), p.35. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20090219 [Accedido octubre 20, 2015].

Gosden, R.G. et al., 1988. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *Journal of reproduction and fertility*, 82(2), pp.813–25. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3283348 [Accedido febrero 11, 2016].

Graham, C.F., 1966. The regulation of DNA synthesis and mitosis in multinucleate frog eggs. *Journal of cell science*, 1, pp.363–374.

Green, D.P., 1988. The head shapes of some mammalian spermatozoa and their possible relationship to the shape of the penetration slit through the zona pellucida. *Journal of reproduction and fertility*, 83(1), pp.377–87. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3397948.

Grimek, H.J., Bellin, M.E. & Ax, R.L., 1984. Characteristics of proteoglycans isolated from small and large bovine ovarian follicles. *Biology of reproduction*, 30(2), pp.397–409. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6423006 [Accedido febrero 13, 2016].

Griswold, M.D., 2016. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological Reviews*, 96(1), pp.1–17. Available at: http://physrev.physiology.org/lookup/doi/10.1152/physrev.00013.2015.

Guex, N., Peitsch, M.C. & Schwede, T., 2009. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis*, 30 Suppl 1, pp.S162–73. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19517507 [Accedido agosto 16, 2015].

Gutteridge, J.M. & Halliwell, B., 1989. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillière's clinical haematology*, 2(2), pp.195–256. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2660928 [Accedido febrero 16, 2016].

Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B., 1976. Glutathione S-transferase AA from rat liver. *Archives of biochemistry and biophysics*, 175(2), pp.710–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/958327 [Accedido febrero 8, 2016].

Hammoud, S.S. et al., 2009. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature*, 460(7254), pp.473–8. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2858064&tool=pmcentrez&renderty

pe=abstract [Accedido enero 10, 2016].

Harikrishnan, R. et al., 2013. Protective effect of ascorbic acid against ethanol-induced reproductive toxicity in male guinea pigs. *The British journal of nutrition*, 110(4), pp.689–98. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23336340 [Accedido enero 16, 2016].

Heard, M., 2012. Transgenerational epigenetic inheritance: myths ans mechannisms. *Changes*, 29(6), pp.997–1003.

van der Heijden, G.W. et al., 2008. Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC developmental biology*, 8, p.34. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2358879&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido noviembre 30, 2015].

van der Heijden, G.W. et al., 2006. Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Developmental biology*, 298(2), pp.458–69. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16887113 [Accedido enero 29, 2016].

Herrero, M.B., Franchi, A.M. & Gimeno, M.A., 1995. Mouse spermatozoa can synthesize PGE2 and 5-HETE in vitro: stimulatory action of nitric oxide. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 53(5), pp.347–50. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8596773 [Accedido febrero 8, 2016].

Hill, R.M., Hegemier, S. & Tennyson, L.M., 1989. The fetal alcohol syndrome: a multihandicapped child. *Neurotoxicology*, 10(3), pp.585–95. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2696901 [Accedido febrero 15, 2016].

Hirai, M., 1988. Effects of alcohol-drinking on mouse chromosomes. II. Sister-chromatid exchange and chromosome dissociation in male germ cells of mice administered ethanol. *Arukōru kenkyū to yakubutsu izon = Japanese journal of alcohol studies & drug dependence*, 23(3), pp.243–51. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3207409 [Accedido enero 16, 2016].

Ho, H.C. & Suarez, S.S., 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*, 122(4), pp.519–526. Available at: http://www.reproduction-online.org/content/122/4/519.full.pdf\nhttp://www.reproduction-online.org/content/122/4/519.long.

Hoek, J.B. & Rubin, E., 1990. Alcohol and membrane-associated signal transduction. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 25(2-3), pp.143–56. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2198031 [Accedido febrero 5, 2016].

Hsu, J.M., Buddemeyer, E. & Chow, B.F., 1964. Role of pyridoxine in glutathione metabolism. *The Biochemical journal*, 90(1), pp.60–4. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1202519&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 15, 2016].

Huang, T. et al., 2014. Assessing spatial distribution, sources, and human health risk of organochlorine pesticide residues in the soils of arid and semiarid areas of northwest China. *Environmental science and pollution research international*, 21(9), pp.6124–35. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24474559 [Accedido enero 16, 2016].

Jager, S., 1990. Sperm nuclear stability and male infertility. *Archives of andrology*, 25(3), pp.253–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2285348 [Accedido enero 26, 2016].

Jager, S., Wijchman, J. & Kremer, J., 1990. Studies on the decondensation of human, mouse, and bull sperm nuclei by heparin and other polyanions. *The Journal of experimental zoology*, 256(3), pp.315–22. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2250165 [Accedido enero 6, 2016].

Jaiswal, A. et al., 2005. 5-Aminosalicylic acid reverses endosulfan-induced testicular toxicity in male rats. *Mutation research*, 585(1-2), pp.50–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002328 [Accedido enero 16, 2016].

Jang, M. et al., 2011. Effects of red ginseng extract on the epididymal sperm motility of mice exposed to ethanol. *International journal of toxicology*, 30(4), pp.435–42. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21772020 [Accedido enero 16, 2016].

Jenkins, T.G. & Carrell, D.T., 2012. Dynamic alterations in the paternal epigenetic landscape following fertilization. *Frontiers in Genetics*, 3(JUL), pp.1–8.

Jensen, T.K. et al., 2014. Habitual alcohol consumption associated with reduced semen quality and changes in reproductive hormones; a cross-sectional study among 1221 young Danish men. *BMJ Open*, 4(9), pp.e005462–e005462. Available at: http://bmjopen.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmjopen-2014-005462.

Jin, M. et al., 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization.

Johnson, G.D. et al., 2011. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction*, 141(1), pp.21–36.

Johnson, L., Thompson, D.L. & Varner, D.D., 2008. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Animal Reproduction Science*, 105(1-2), pp.23–51. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037843200700379X.

Joo, K.J. et al., 2012. The effects of smoking and alcohol intake on sperm quality: light and transmission electron microscopy findings. *The Journal of international medical research*, 40(6), pp.2327–35. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23321190 [Accedido enero 26, 2016].

Joshi, C.S., Khan, S. a & Khole, V. V, 2014. Regulation of acrosome reaction by Liprin α3, LAR and its ligands in mouse spermatozoa. *Andrology*, 2(2), pp.165–74. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24327330.

Julianelli, V. et al., 2012a. Heparin enhances protamine disulfide bond reduction during in vitro decondensation of human spermatozoa. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27(7), pp.1930–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22552691 [Accedido enero 11, 2016].

Julianelli, V. et al., 2012b. Heparin enhances protamine disulfide bond reduction during in vitro decondensation of human spermatozoa. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27(7), pp.1930–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22552691.

Kannan, K. & Jain, S.K., 2003. Oxygen radical generation and endosulfan toxicity in Jurkat T-cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 247(1-2), pp.1–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12841624 [Accedido enero 29, 2016].

Kataoka, R. & Takagi, K., 2013. Biodegradability and biodegradation pathways of endosulfan and endosulfan sulfate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(8), pp.3285–3292.

Kawasaki, K. et al., 1994. Chromatin decondensation in Drosophila embryo extracts. *The Journal of biological chemistry*, 269(13), pp.10169–76. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8144519 [Accedido febrero 13, 2016].

Kiefer, F. et al., 2009. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic acids research*, 37(Database issue), pp.D387–92. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2686475&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido enero 31, 2015].

Kim, E. et al., 2008. Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), pp.677–682.

Kim, H.G. et al., 2015. Endosulfan induces COX-2 expression via NADPH oxidase and the ROS, MAPK, and Akt pathways. *Archives of toxicology*, 89(11), pp.2039–50. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25199686 [Accedido enero 29, 2016].

Kim, K.-S. et al., 2011. Transitional states of acrosomal exocytosis and proteolytic processing of the acrosomal matrix in guinea pig sperm. *Molecular reproduction and development*, 78(12), pp.930–41. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3220745&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido enero 5, 2016].

Kim, K.-S. & Gerton, G.L., 2003. Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Developmental biology*, 264(1), pp.141–52. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14623237 [Accedido enero 5, 2016].

Knezovich, J.G. et al., 2012. The effect of preconception paternal alcohol exposure on epigenetic remodeling of the H19 and Rasgrf1 imprinting control regions in mouse offspring.

Kopecný, V. & Pavlok, A., 1975. Autoradiographic study of mouse spermatozoan arginine-rich nuclear protein in fertilization. *The Journal of experimental zoology*, 191(1), pp.85–96. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/234143 [Accedido enero 6, 2016].

Kumar, S. et al., 2014. Environmental & lifestyle factors in deterioration of male reproductive health. *The Indian journal of medical research*, 140 Suppl(Suppl 1), pp.S29–35. Available at: /pmc/articles/PMC4345749/?report=abstract [Accedido enero 12, 2016].

Kundu, T.K. et al., 1996. Zinc dependent recognition of a human CpG island sequence by the mammalian spermatidal protein TP2. *Biochemistry*, 35(49), pp.15626–15632.

Kwist, U. & Eliasson, R., 1980. Influence of Seminal Plasma on the Chromatin Stability of Ejaculated Human Spermatozoa. , 3, pp.130–142.

de Lamirande, E., Leclerc, P. & Gagnon, C., 1997a. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular human reproduction*, 3(3), pp.175–94. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9237244 [Accedido diciembre 31, 2015].

de Lamirande, E., Leclerc, P. & Gagnon, C., 1997b. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular human reproduction*, 3(3), pp.175–194.

Lan, N. et al., 2006. Prenatal ethanol exposure alters the effects of gonadectomy on hypothalamic-pituitary-adrenal activity in male rats. *Journal of neuroendocrinology*, 18(9), pp.672–84. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16879166 [Accedido febrero 13, 2016].

Larkby, C. & Day, N., 1997. The effects of prenatal alcohol exposure. *Alcohol health and research world*, 21(3), pp.192–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15706768 [Accedido febrero 13, 2016].

Laskey, R.A. et al., 1978. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*, 275(5679), pp.416–20. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/692721 [Accedido enero 10, 2016].

Lawrence, L.J. & Casida, J.E., 1984. Interactions of lindane, toxaphene and cyclodienes with brain-specific t-butylbicyclophosphorothionate receptor. *Life sciences*, 35(2), pp.171–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6204183 [Accedido febrero 14, 2016].

Lee, C.N. & Ax, R.L., 1984. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *Journal of dairy science*, 67(9), pp.2006–9. Available at:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6436345 [Accedido febrero 13, 2016].

Lenz, R.W. et al., 1988. Predicting fertility of dairy bulls by inducing acrosome reactions in sperm with chondroitin sulfates. *Journal of dairy science*, 71(4), pp.1073–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3134477 [Accedido febrero 9, 2016].

Lévesque, D. et al., 1998. Architectural DNA-binding properties of the spermatidal transition proteins 1 and 2. *Biochemical and biophysical research communications*, 252(3), pp.602–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9837753.

Lewis-Jones, I. et al., 2003. Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities. *Fertility and sterility*, 79(1), pp.212–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12524092 [Accedido febrero 10, 2016].

Liang, F. et al., 2015. Chronic exposure to ethanol in male mice may be associated with hearing loss in offspring. *Asian journal of andrology*, 17(6), pp.985–90. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26262775 [Accedido enero 16, 2016].

Liang, F. et al., 2014. Paternal ethanol exposure and behavioral abnormities in offspring: associated alterations in imprinted gene methylation. *Neuropharmacology*, 81, pp.126–33. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24486713 [Accedido enero 12, 2016].

Lieber, C.S., 1991. Perspectives: do alcohol calories count? *The American journal of clinical nutrition*, 54(6), pp.976–82. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1957830 [Accedido febrero 15, 2016].

Liu, D.Y. & Baker, H.W., 1992. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertility and sterility*, 58(6), pp.1178–84. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1281117 [Accedido febrero 13, 2016].

Lohka, M.J. & Masui, Y., 1983. The germinal vesicle material required for sperm pronuclear formation is located in the soluble fraction of egg cytoplasm. *Experimental cell research*, 148(2), pp.481–91. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6605256 [Accedido enero 10, 2016].

Lopez-Espinosa, M.-J. et al., 2007. Organochlorine pesticides in placentas from Southern Spain and some related factors. *Placenta*, 28(7), pp.631–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109956 [Accedido febrero 14, 2016].

Luberda, Z., 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reproductive biology*, 5(1), pp.5–17. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821775 [Accedido febrero 13, 2016].

Luo, L.-F., Hou, C.-C. & Yang, W.-X., 2015. Small non-coding RNAs and their associated proteins in spermatogenesis. *Gene*, 578(2), pp.141–157. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111915014924.

Machlin, L.J. & Bendich, A., 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1(6), pp.441–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3315807 [Accedido febrero 13, 2016].

Mahi, C.A. & Yanagimachi, R., 1973. The effects of temperature, osmolality and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility*, 35(1), pp.55–66. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4126362 [Accedido febrero 13, 2016].

Majno, G. & Joris, I., 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*, 146(1), pp.3–15. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1870771&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Maneesh, M. et al., Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. *Indian journal of physiology and pharmacology*, 50(3), pp.291–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17193902 [Accedido enero 16, 2016].

Manuscript, A., 2014. Alteration of poly(ADP-ribose) metabolism affects murine sperm nuclear architecture by impairing pericentric heterochromatin condensation. , 122(4), pp.319–335.

Maqbool, F. et al., 2016. Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. *Life sciences*, 145, pp.265–73. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26497928 [Accedido febrero 8, 2016].

Marjonen, H. et al., 2015. Early maternal alcohol consumption alters hippocampal DNA methylation, gene expression and volume in a mouse model. *PloS one*, 10(5), p.e0124931. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4430308&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 12, 2016].

Martini, A.C. et al., 2004. Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality. *Fertility and sterility*, 82(2), pp.374–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15302286 [Accedido enero 27, 2016].

Marushige, Y. & Marushige, K., 1978. Dispersion of mammalian sperm chromatin during fertilization: an in vitro study. *Biochimica et biophysica acta*, 519(1), pp.1–22. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/566558 [Accedido febrero 13, 2016].

Marushige, Y. & Marushige, K., 1975. Enzymatic unpacking of bull sperm chromatin. *Biochimica et biophysica acta*, 403(1), pp.180–91. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1174544 [Accedido febrero 13, 2016].

Mauri, A.L. et al., 2011. Significance of extruded nuclear chromatin (regional nuclear shape malformation) in human spermatozoa: implications for ICSI. *International journal of andrology*, 34(6 Pt 1), pp.594–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20969600 [Accedido enero 26, 2016].

May, P.A. & Gossage, J.P., 2001. Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome. A summary. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 25(3), pp.159–67. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11810953 [Accedido febrero 12, 2016].

McCord JM, F.I., 1969. The utility of superoxide Dismutase in studyng free Radicals Reactions. *The Journal of biological chemistry*, 244(25), pp.6056 – 63.

McPherson, S.M. & Longo, F.J., 1992. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Molecular reproduction and development*, 31(4), pp.268–79. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1315143 [Accedido febrero 15, 2016].

Meister, A. & Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Annual Review of biochemistry*, 52, pp.711–760.

Meister, A. & Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Annual review of biochemistry*, 52, pp.711–60. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6137189 [Accedido noviembre 9, 2015].

Meizel, S. & Turner, K.O., 1986. Glycosaminoglycans stimulate the acrosome reaction of previously capacitated hamster sperm. *The Journal of experimental zoology*, 237(1), pp.137–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3753998 [Accedido febrero 16, 2016].

Meneghetti, M.C.Z. et al., 2015. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 12(110), p.0589. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4614469&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido enero 11, 2016].

Merriam, R.W., 1969. Movement of cytoplasmic proteins into nuclei induced to enlarge and initiate DNA or RNA synthesis. *Journal of cell science*, 5(2), pp.333–49. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5391401 [Accedido enero 10, 2016].

Milesi, M.M. et al., 2012. Neonatal exposure to low doses of endosulfan disrupts the expression of proteins regulating uterine development and differentiation. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 33(1), pp.85–93. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198180 [Accedido febrero 14, 2016].

Milesi, M.M. et al., 2015. Neonatal exposure to low doses of endosulfan induces implantation failure and disrupts uterine functional differentiation at the pre-implantation period in rats. *Molecular and cellular endocrinology*, 401, pp.248–59. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25486513 [Accedido febrero 14, 2016].

Miller, D., Brinkworth, M. & Iles, D., 2010. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction (Cambridge, England)*, 139(2), pp.287–301. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19759174 [Accedido enero 19, 2016].

Mitchell, L.A., De Iuliis, G.N. & Aitken, R.J., 2011. The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology. *International journal of andrology*, 34(1), pp.2–13. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20158539 [Accedido enero 25, 2016].

Morgan, M.Y. & Levine, J.A., 1988. Alcohol and nutrition. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 47(2), pp.85–98. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3054901 [Accedido febrero 15, 2016].

Morse-Gaudio, M. & Risley, M.S., 1994. Topoisomerase II expression and VM-26 induction of DNA breaks during spermatogenesis in Xenopus laevis. *Journal of cell science*, 107 (Pt 1, pp.2887–98. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7876355 [Accedido febrero 15, 2016].

Morton, R.A. et al., 2014. Construction of vapor chambers used to expose mice to alcohol during the equivalent of all three trimesters of human development. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (89). Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4132936&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 10, 2016].

Mulloy, B., Gray, E. & Barrowcliffe, T.W., 2000. Characterization of unfractionated heparin: comparison of materials from the last 50 years. *Thrombosis and haemostasis*, 84(6), pp.1052–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11154113 [Accedido febrero 13, 2016].

Multhaupt, H.A.B. & Couchman, J.R., 2012. Heparan sulfate biosynthesis: methods for investigation of the heparanosome. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 60(12), pp.908–15. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3527879&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 13, 2016].

Muratori, M. et al., 2015. Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 21(1), pp.109–122.

Murray, T.J. et al., 2001. Endocrine disrupting chemicals: effects on human male reproductive health. *Early pregnancy (Online)*, 5(2), pp.80–112. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11753523 [Accedido enero 12, 2016].

Muthusami, K.R. & Chinnaswamy, P., 2005. Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertility and sterility*, 84(4), pp.919–24. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028205012513.

Nicolau, P. et al., 2014. Alcohol consumption and in vitro fertilization: a review of the literature. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 30(11), pp.759–63. Available at: http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84910038194&partnerID=tZOtx3y1.

Noland, T.D. et al., 1994. The sperm acrosomal matrix contains a novel member of the pentaxin family of calcium-dependent binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 269(51), pp.32607–32614.

Norberg, A. et al., 2003. Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and forensic applications. *Clinical pharmacokinetics*, 42(1), pp.1–31. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12489977 [Accedido febrero 15, 2016].

Ohanian, C., 1985. Nuclear chromatin decondensation of spermatozoa in vitro : a method for evaluating the fertilizing ability of ovine semen. , 8, pp.147–158.

Ohsumi, K. & Katagiri, C., 1991. Characterization of the ooplasmic factor inducing decondensation of and protamine removal from toad sperm nuclei: involvement of nucleoplasmin. *Developmental biology*, 148(1), pp.295–305. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1936566 [Accedido febrero 13, 2016].

Oko, R. & Sutovsky, P., 2009. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *Journal of reproductive immunology*, 83(1-2), pp.2–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19883945.

Oliw, E.H. & Sprecher, H., 1989. Metabolism of polyunsaturated fatty acids by an (n - 6)-lipoxygenase associated with human ejaculates. *Biochimica et biophysica acta*, 1002(3), pp.283–91. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2496760 [Accedido febrero 15, 2016].

Onikubo, T. et al., 2015. Developmentally Regulated Post-translational Modification of Nucleoplasmin Controls Histone Sequestration and Deposition. *CellReports*, 10, pp.1735–1748. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.038.

Ozen, S. et al., 2012. Effects of pesticides used in agriculture on the development of precocious puberty. *Environmental monitoring and assessment*, 184(7), pp.4223–32. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21805074 [Accedido febrero 14, 2016].

Ozmen, O. & Mor, F., 2012. Apoptosis in adult rabbit testes during subacute endosulfan toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102, pp.129–133.

Ozmen, O. & Mor, F., 2015. Effects of vitamin C on pathology and caspase-3 activity of kidneys with subacute endosulfan toxicity. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission*, 90(1), pp.25–30. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25151990 [Accedido febrero 14, 2016].

Pajarinen, J. et al., 1996. Moderate alcohol consumption and disorders of human spermatogenesis. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 20(2), pp.332–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8730226 [Accedido enero 27, 2016].

Pal, R. et al., 2009. Protective effects of different antioxidants against endosulfan-induced oxidative stress and immunotoxicity in albino rats. *Indian journal of experimental biology*, 47(9), pp.723–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19957884 [Accedido febrero 14, 2016].

Papadakis, E.N. et al., 2015. A pesticide monitoring survey in rivers and lakes of northern Greece and its human and ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 116, pp.1–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25733189 [Accedido enero 16, 2016].

Perreault, S.D., Barbee, R.R. & Slott, V.L., 1988. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Developmental biology*, 125(1), pp.181–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3334716.

Perreault, S.D., Naish, S.J. & Zirkin, B.R., 1987. The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content. *Biology of Reproduction*, 36(1), pp.239–244. Available at: papers3://publication/doi/10.1095/biolreprod36.1.239.

Perreault, S.D., Wolff, R.A. & Zirkin, B.R., 1984. The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Developmental biology*, 101(1), pp.160–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6692970 [Accedido enero 6, 2016].

Philpott, A., Krude, T. & Laskey, R.A., 2000. Nuclear chaperones. *Seminars in cell & developmental biology*, 11(1), pp.7–14. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10736259 [Accedido febrero 13, 2016].

Philpott, A. & Leno, G.H., 1992. Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in Xenopus egg extracts. *Cell*, 69(5), pp.759–67. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1591776 [Accedido febrero 13, 2016].

Philpott, A., Leno, G.H. & Laskey, R.A., 1991. Sperm decondensation in Xenopus egg cytoplasm is mediated by nucleoplasmin. *Cell*, 65(4), pp.569–78. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2032284 [Accedido enero 10, 2016].

Piepkorn, M.W., Schmer, G. & Lagunoff, D., 1978. Isolation of high-activity heparin by DEAE-Sephadex and protamine-Sepharose chromatography. *Thrombosis research*, 13(6), pp.1077–87. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/571151 [Accedido febrero 10, 2016].

Pittoggi, C. et al., 1999. A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *Journal of cell science*, 112 (Pt 2(NOVEMBER), pp.3537–3548.

Du Plessis, S.S. et al., 2015. Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(4), pp.509–20. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25646893 [Accedido noviembre 30, 2015].

Popov, V.B., Protasova, G.A. & Radilov, A.S., 1998. [Embryo- and genotoxic effects of two endosulfan forms in the culture of rat and mouse pre- and postimplantation embryos]. *Ontogenez*, 29(2), pp.104–12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9608956 [Accedido enero 16, 2016].

Rahimipour, M. et al., 2013. Effects of different doses of ethanol on sperm parameters, chromatin structure and apoptosis in adult mice. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 170(2), pp.423–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23871382 [Accedido enero 8, 2016].

Ramalho-Santos, J. et al., 2000. ICSI choreography: fate of sperm structures after monospermic rhesus ICSI and first cell cycle implications. *Human reproduction (Oxford, England)*, 15(12), pp.2610–20. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11098035 [Accedido febrero 9, 2016].

Rao, M. et al., 2005. L-ascorbic acid ameliorates postnatal endosulfan induced testicular damage in rats. *Indian journal of physiology and pharmacology*, 49(3), pp.331–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16440852 [Accedido enero 16, 2016].

Rastogi, D. et al., 2014. Endosulfan induced cell death in Sertoli-germ cells of male Wistar rat follows intrinsic mode of cell death. *Chemosphere*, 94, pp.104–15. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24125708 [Accedido enero 16, 2016].

von Recklinghausen, 1910. Untersuchungen über rachitits und osteomalacie. *Text und atlas. 2 bde.* Available at: http://www.zvab.com/buch-suchen/titel/untersuchungen-%FCber-rachitits-und-osteomalacie-text-und-atlas-2-bde-all-publ/autor/recklinghausen-friedrich-daniel-v/ [Accedido febrero 9, 2016].

Ren, N. et al., 2008. [Induced apoptosis and mechanism of endosulfan in mouse germ cells]. *Huan jing ke xue= Huanjing kexue / [bian ji, Zhongguo ke xue yuan huan jing ke xue wei yuan hui "Huan jing ke xue" bian ji wei yuan hui.]*, 29(2), pp.386–90. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18613510 [Accedido enero 16, 2016].

Reyes, R. et al., 1984. Glycosamineglycan sulfate as acrosomal reaction-inducing factor of follicular fluid. *Archives of andrology*, 12(2-3), pp.203–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6508428 [Accedido febrero 16, 2016].

Rice, P. et al., 1995. Nucleoplasmin-mediated decondensation of Mytilus sperm chromatin. Identification and partial characterization of a nucleoplasmin-like protein with sperm-nuclei decondensing activity in Mytilus californianus. *Biochemistry*, 34(23), pp.7563–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7779801 [Accedido febrero 13, 2016].

Rodman, T.C. et al., 1981. Turnover of basic chromosomal proteins in fertilized eggs: a cytoimmunochemical study of events in vivo. *The Journal of cell biology*, 90(2), pp.351–61. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2111884&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 13, 2016].

Romanato, M. et al., 2005. Further evidence on the role of heparan sulfate as protamine acceptor during the decondensation of human spermatozoa. *Human Reproduction*, 20(10), pp.2784–2789.

Romanato, M. et al., 2003. Heparan sulphate: a putative decondensing agent for human spermatozoa in vivo. *Human reproduction (Oxford, England)*, 18(9), pp.1868–73. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12923141 [Accedido enero 29, 2016].

Romanato, M. et al., 2008. The presence of heparan sulfate in the mammalian oocyte provides a clue to human sperm nuclear decondensation in vivo. *Human Reproduction*, 23(5), pp.1145–1150. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18287106 [Accedido enero 11, 2016].

Rosenberg, R.D. & Lam, L., 1979. Correlation between structure and function of heparin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(3), pp.1218–22. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=383221&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 13, 2016].

Rossi, B. V et al., 2011. Effect of alcohol consumption on in vitro fertilization. *Obstetrics and gynecology*, 117(1), pp.136–42. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4487775&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido enero 27, 2016].

Rougier, N. et al., 2013. Changes in DNA fragmentation during sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection over time. *Fertility and Sterility*, 100, pp.69–74. Available at: http://.

Rouiller-Fabre, V., Habert, R. & Livera, G., 2014. Effects of endocrine disruptors on the human fetal testis. *Annales d'endocrinologie*, 75(2), pp.54–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24793993 [Accedido febrero 16, 2016].

Roy, J.R., Chakraborty, S. & Chakraborty, T.R., 2009. Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans--a review. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 15(6), pp.RA137–45. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19478717 [Accedido agosto 13, 2015].

Russell, D.L. & Salustri, A., 2006. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. *Seminars in reproductive medicine*, 24(4), pp.217–27. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16944419 [Accedido enero 6, 2016].

Saiyed, H. et al., 2003. Effect of endosulfan on male reproductive development. *Environmental health perspectives*, 111(16), pp.1958–62. Available at:

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1241773&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido enero 13, 2016].

Sakkas, D. et al., 1995. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biology of reproduction*, 52(5), pp.1149–55. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7626715 [Accedido febrero 15, 2016].

Salaspuro, M.P. & Lieber, C.S., 1978. Non-uniformity of blood ethanol elimination: its exaggeration after chronic consumption. *Annals of clinical research*, 10(5), pp.294–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/104651 [Accedido febrero 15, 2016].

Salazar-Arredondo, E. et al., 2008. Sperm chromatin alteration and DNA damage by methyl-parathion, chlorpyrifos and diazinon and their oxon metabolites in human spermatozoa. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 25(4), pp.455–60. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18595656 [Accedido febrero 9, 2016].

Saleh, R.A. et al., 2003. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertility and sterility*, 79 Suppl 3, pp.1597–605. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12801566 [Accedido febrero 15, 2016].

Saling, P.M., Sowinski, J. & Storey, B.T., 1979. An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction. *The Journal of experimental zoology*, 209(2), pp.229–38. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/512592 [Accedido enero 4, 2016].

Sampaio, L.O., Markus, R.P. & Nader, H.B., 1985. The effect of sexual hormones on the sulfated glycosaminoglycan pattern of male genital accessory organs. *Archives of biochemistry and biophysics*, 240(1), pp.470–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4015112 [Accedido febrero 13, 2016].

Sanchez, M.C. et al., 2013. Dermatan sulfate synergizes with heparin in murine sperm chromatin decondensation. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 59(2), pp.82–90. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23301776 [Accedido enero 9, 2016].

Sánchez-Vázquez, M.L., Reyes, R., et al., 1996. Differential decondensation of class I (rat) and class II (mouse) spermatozoa nuclei by physiological concentrations of heparin and glutathione. *Archives of andrology*, 36(3), pp.161–76. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8743348 [Accedido febrero 13, 2016].

Sánchez-Vázquez, M.L., Reyes, ; R, et al., 1996. Systems Biology in Reproductive Medicine Differential Decondensation of Class I (Rat) and Class II (Mouse) Spermatozoa Nuclei by Physiological Concentrations of Heparin and Glutathione. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 36(3), pp.161–176. Available at: http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713664683.

Santi, S. et al., 1994. Nuclear matrix involvement in sperm head structural organization. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 81(1), pp.47–57. Available at: papers3://publication/uuid/7AE754CC-840F-4F7C-8D67-E0A37A4F83F2.

Saowaros, W. & Panyim, S., 1979. The formation of disulfide bonds in human protamines during sperm maturation. *Experientia*, 35(2), pp.191–2. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/421827 [Accedido febrero 14, 2016].

Schoeters, G. et al., 2008. Endocrine disruptors and abnormalities of pubertal development. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 102(2), pp.168–175.

Schulte, R.T. et al., 2010. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 27(1), pp.3–12. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2826626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Seitz, H.K. & Stickel, F., 2007. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), pp.599–612. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nrc2191 [Accedido junio 25, 2015].

Seligman, J. et al., 1994. Thiol-disulfide status of human sperm proteins. *Journal of reproduction and fertility*, 101(2), pp.435–43. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7932379 [Accedido febrero 13, 2016].

Selvaraju, S. et al., 2011. Effects of Heavy Metals and Pesticides on Buffalo (Bubalus bubalis) Spermatozoa Functions In Vitro. *Reproduction in domestic animals*, 46(5), pp.807–13.

Shalgi, R., Seligman, J. & Kosower, N.S., 1989. Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Biology of reproduction*, 40(5), pp.1037–45. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2765609.

Shao, C. et al., 2013. Comparative glycomics of leukocyte glycosaminoglycans. *The FEBS journal*, 280(10), pp.2447–61. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3651794&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 16, 2016].

Sharma, A., Gill, J.P.S. & Bedi, J.S., 2015. Monitoring of pesticide residues in human blood from Punjab, India. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 94(5), pp.640–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25773703 [Accedido enero 16, 2016].

Sharma, S.K., Johnstone, R.M. & Quastel, J.H., 1964. Corticosteroids and ascorbic acid transport in adrenal cortex in vitro. *The Biochemical journal*, 92(3), pp.564–73. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1206102&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 15, 2016].

Shayakhmetova, G.M. et al., 2014. Chronic alcoholism-mediated metabolic disorders in albino rat testes. *Interdisciplinary toxicology*, 7(3), pp.165–72. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4434111&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 16, 2016].

Siervo, G.E.M.L. et al., 2015. Spermatic and testicular damages in rats exposed to ethanol: influence of lipid peroxidation but not testosterone. *Toxicology*, 330, pp.1–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25637669 [Accedido febrero 16, 2016].

Silva, M.H. & Gammon, D., 2009. An Assessment of the Developmental, Reproductive, and Neurotoxicity of Endosulfan. *Birth Defects Res (Part B)*, 86, pp.1–28.

Singh, S.K. & Pandey, R.S., 1990. Effect of sub-chronic endosulfan exposures on plasma gonadotrophins, testosterone, testicular testosterone and enzymes of androgen biosynthesis in rat. *Indian journal of experimental biology*, 28(10), pp.953–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2279768 [Accedido enero 13, 2016].

Sinha, N. et al., 1999. Cytotoxic effect of endosulfan on rat Sertoli-germ cell coculture. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 13(4), pp.291–4. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10453913 [Accedido enero 13, 2016].

Sinha, N., Adhikari, N. & K Saxena, D., 2001. Effect of endosulfan during fetal gonadal differentiation on spermatogenesis in rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 10(1-2), pp.29–32. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11382554 [Accedido febrero 15, 2016].

Sohn, H.-Y. et al., 2004. Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidants against endosulfan-induced oxidative damage. *Toxicology letters*, 151(2), pp.357–65. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15183460 [Accedido enero 29, 2016].

Soltaninassab, S.R. et al., 2000. Multi-faceted regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase. *Journal*

of cellular physiology, 182(2), pp.163–70. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10623879 [Accedido febrero 13, 2016].

Sommer, D. et al., 2000. Modulation of the phosphatase activity of calcineurin by oxidants and antioxidants in vitro. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267(8), pp.2312–22. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10759856 [Accedido febrero 15, 2016].

Soto, A.M., Chung, K.L. & Sonnenschein, C., 1994. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environmental health perspectives*, 102(4), pp.380–3. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1566957&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 14, 2016].

Stewart, D.K. & Cairns, K.G., Endosulfan persistence in soil and uptake by potato tubers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 22(6), pp.984–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4430810 [Accedido febrero 15, 2016].

Stouder, C., Somm, E. & Paoloni-Giacobino, A., 2011. Prenatal exposure to ethanol: a specific effect on the H19 gene in sperm. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 31(4), pp.507–12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21382472 [Accedido febrero 5, 2016].

Streissguth, A.P. et al., 1980. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. *Science (New York, N.Y.)*, 209(4454), pp.353–61. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6992275 [Accedido febrero 12, 2016].

Stringer, S.E. et al., 1999. Heparin is a unique marker of progenitors in the glial cell lineage. *The Journal of biological chemistry*, 274(36), pp.25455–60. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10464276 [Accedido febrero 13, 2016].

Suarez, S.S., 2008. Control of hyperactivation in sperm. *Human reproduction update*, 14(6), pp.647–57. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18653675 [Accedido enero 1, 2016].

Suarez, S.S., 2008. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *The International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), pp.455–462. Available at: http://www.intjdevbiol.com/paper.php?doi=072527ss.

Suarez, S.S., 2005. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, 12(1), pp.23–37. Available at: http://humupd.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/humupd/dmi047.

Sun, H. et al., 2016. Concentrations, distribution, sources and risk assessment of organohalogenated contaminants in soils from Kenya, Eastern Africa. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 209, pp.177–85. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26686059 [Accedido enero 16, 2016].

Sutovsky, P. & Schatten, G., 1997. Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biology of reproduction*, 56(6), pp.1503–1512.

Svechnikov, K. et al., Similar causes of various reproductive disorders in early life. *Asian journal of andrology*, 16(1), pp.50–9. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3901882&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 16, 2016].

Takhshid, M.A. et al., 2012. Protective Effect of Vitamins E and C on Endosulfan-Induced Reproductive Toxicity in Male Rats. *Iran J Med Sci September*, 37(3).

Talebi, a R. et al., 2011. Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. *Alcohol*, 45(4), pp.403–409. Available at:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21145692 [Accedido julio 3, 2015].

Talebi, A.R. et al., 2011. Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 45(4), pp.403–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21145692 [Accedido enero 16, 2016].

Tanphaichitr, N. et al., 1978. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Experimental cell research*, 117(2), pp.347–56. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/720415 [Accedido enero 29, 2016].

Tarantini, F. et al., 1998. The extravesicular domain of synaptotagmin-1 is released with the latent fibroblast growth factor-1 homodimer in response to heat shock. *The Journal of biological chemistry*, 273(35), pp.22209–16. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712834 [Accedido febrero 9, 2016].

Tarkowski, A.K. & Bałakier, H., 1980. Nucleo-cytoplasmic interactions in cell hybrids between mouse oocytes, blastomeres and somatic cells. *Journal of embryology and experimental morphology*, 55, pp.319–30. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7373200 [Accedido febrero 14, 2016].

Tecle, E. & Gagneux, P., 2015. Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Molecular Reproduction and Development*, 650, p.n/a–n/a. Available at: http://doi.wiley.com/10.1002/mrd.22500.

Textbook, A., 1987. Vertebrate reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 66, p.298.

Thadani, V.M., 1979. Injection of sperm heads into immature rat oocytes. *The Journal of experimental zoology*, 210(1), pp.161–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/536711 [Accedido enero 10, 2016].

Van Thiel, D.H. et al., 1978. Evidence for autonomous secretion of prolactin in some alcoholic men with cirrhosis and gynecomastia. *Metabolism: clinical and experimental*, 27(12), pp.1778–84. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/723631 [Accedido febrero 10, 2016].

Tirone, E. et al., 1993. Oocytes preserve the ability of mouse cumulus cells in culture to synthesize hyaluronic acid and dermatan sulfate. *Developmental biology*, 160(2), pp.405–12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8253273 [Accedido febrero 9, 2016].

Toft, G. et al., 2004. Epidemiological evidence on reproductive effects of persistent organochlorines in humans. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 19(1), pp.5–26. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15336708 [Accedido enero 15, 2016].

Tulsiani, D.R. et al., 1998. The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Experimental cell research*, 240(2), pp.151–164.

Tulsiani, D.R.P. et al., 1998. REVIEW The Biological and Functional Significance of the Sperm Acrosome and Acrosomal Enzymes in Mammalian Fertilization. *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH*, 240, pp.151–164.

Turner, K.O., Syvanen, M. & Meizel, S., 1997. The human acrosome reaction is highly sensitive to inhibition by cyclodiene insecticides. *Journal of andrology*, 18(6), pp.571–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9432128 [Accedido enero 13, 2016].

Twigg, J.P., Irvine, D.S. & Aitken, R.J., 1998. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(7), pp.1864–71. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9740440.

Ulutaş, O.K. et al., 2015. Blood concentrations and risk assessment of persistent organochlorine compounds in newborn boys in Turkey. A pilot study. *Environmental science and pollution*

research international, 22(24), pp.19896–904. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26289328 [Accedido enero 16, 2016].

Urimoto, K.A.K. & Aitou, M.I.S., 2015. Mechanism and Reconstitution In Vitro of Germ Cell Development in Mammals. , LXXX.

Usui, N. & Yanagimachi, R., 1976. Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization, and early development. The appearance and disappearance of factors involved in sperm chromatin decondensation in egg cytoplasm. *Journal of ultrastructure research*, 57(3), pp.276–88. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1003595 [Accedido enero 10, 2016].

Välimäki, M. et al., 1990. The pulsatile secretion of gonadotropins and growth hormone, and the biological activity of luteinizing hormone in men acutely intoxicated with ethanol. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 14(6), pp.928–31. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2128439 [Accedido febrero 10, 2016].

Varghese, A.C., du Plessis, S.S. & Agarwal, A., 2008. Male gamete survival at stake: causes and solutions. *Reproductive biomedicine online*, 17(6), pp.866–80. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079972 [Accedido enero 15, 2016].

Viggiano, J.M. et al., 1996. Analysis of the effect of nitric oxide synthase inhibition on mouse sperm employing a modified staining method for assessment of the acrosome reaction. *Journal of andrology*, 17(6), pp.692–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9016400 [Accedido febrero 8, 2016].

Vilar-Rojas, C., Guzman-Grenfell, A.M. & Hicks, J.J., 1996. Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins. *Archives of medical research*, 27(1), pp.1–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8867359 [Accedido febrero 15, 2016].

De Vries, M. et al., 2012. Chromatin remodelling initiation during human spermiogenesis. *Biology Open*, 1(5), pp.446–457. Available at: http://bio.biologists.org/cgi/doi/10.1242/bio.2012844.

Wade, M.G. et al., 1997. Interactions between endosulfan and dieldrin on estrogen-mediated processes in vitro and in vivo. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 11(6), pp.791–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9407589 [Accedido enero 13, 2016].

Wagner, T.E. & Yun, J.S., 1979. Fine structure of human sperm chromatin. *Archives of andrology*, 2(4), pp.291–4. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/496507 [Accedido febrero 13, 2016].

Wang, N. et al., 2012a. Mitochondrial energy metabolism dysfunction involved in reproductive toxicity of mice caused by endosulfan and protective effects of vitamin E. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 82, pp.96–103.

Wang, N. et al., 2012b. Mitochondrial energy metabolism dysfunction involved in reproductive toxicity of mice caused by endosulfan and protective effects of vitamin E. *Ecotoxicology and environmental safety*, 82, pp.96–103. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22705290 [Accedido enero 14, 2016].

Ward, W.S., 1993. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biology of reproduction*, 48(6), pp.1193–201. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8318776\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8318576.

Ward, W.S., 2010. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Molecular Human Reproduction*, 16(1), pp.30–36. Available at: http://www.molehr.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/molehr/gap080.

Ward, W.S. & Coffey, D.S., 1991. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of reproduction*, 44(4), pp.569–74. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2043729.

Wdowiak, A. et al., 2014. Alcohol consumption and quality of embryos obtained in programmes of in vitro fertilization. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 21(2), pp.450–3. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24959808 [Accedido enero 27, 2016].

Weston, W.M. et al., 1994. Ethanol effects on embryonic craniofacial growth and development: implications for study of the fetal alcohol syndrome. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 18(1), pp.177–82. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8198217 [Accedido febrero 10, 2016].

Wieczorek, L. et al., 2015. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and behavioral dysfunction following early binge-like prenatal alcohol exposure in mice. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 49(3), pp.207–17. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25709101 [Accedido febrero 2, 2016].

Wiesel, S. & Schultz, G.A., 1981. Factors which may affect removal of protamine from sperm DNA during fertilization in the rabbit. *Gamete Research*, 4(1), pp.25–34. Available at: http://doi.wiley.com/10.1002/mrd.1120040105 [Accedido febrero 13, 2016].

Wigle, D.T. et al., 2008. Epidemiologic evidence of relationships between reproductive and child health outcomes and environmental chemical contaminants. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, 11(5-6), pp.373–517. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18470797 [Accedido diciembre 12, 2015].

Wilson, V.S. & LeBlanc, G.A., 1998. Endosulfan elevates testosterone biotransformation and clearance in CD-1 mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 148(1), pp.158–68. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9465275 [Accedido enero 16, 2016].

Witkin, S.S., Korngold, G.C. & Bendich, A., 1975. Ribonuclease-sensitive DNA-synthesizing complex in human sperm heads and seminal fluid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(9), pp.3295–9. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=432978&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 13, 2016].

Wozniak, A.L., Bulayeva, N.N. & Watson, C.S., 2005. Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca2+ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environmental health perspectives*, 113(4), pp.431–9. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1278483&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 16, 2016].

Xu, Y. et al., 2015. The mechanism study of endosulfan-induced spermatogenic cell apoptosis of mouse in vitro. *Toxicology and industrial health*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25647812 [Accedido enero 16, 2016].

Yanagimachi, R. & Phillips, D.M., 1984. The Status of Acrosomal Caps of Hamster Spermatozoa Immediately Before Fertilization In Vivo. *New York*, 19, pp.1–19.

Yanagishita, M., Rodbard, D. & Hascall, V.C., 1979. Isolation and characterization of proteoglycans from porcine ovarian follicular fluid. *The Journal of biological chemistry*, 254(3), pp.911–20. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/762100 [Accedido febrero 13, 2016].

Yoshida, S., 2008. Spermatogenic stem cell system in the mouse testis. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 73, pp.25–32. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19150967 [Accedido febrero 10, 2016].

Young, R.J., 1979. Rabbit sperm chromatin is decondensed by a thiol-induced proteolytic activity not

endogenous to its nucleus. *Biology of reproduction*, 20(5), pp.1001–4. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/476237 [Accedido febrero 13, 2016].

Zajac, C.S. & Abel, E.L., 1992. Animal models of prenatal alcohol exposure. *International journal of epidemiology*, 21 Suppl 1, pp.S24–32. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1399216 [Accedido febrero 15, 2016].

Zhang, X., Sliwowska, J.H. & Weinberg, J., 2005. Prenatal alcohol exposure and fetal programming: effects on neuroendocrine and immune function. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 230(6), pp.376–88. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956767 [Accedido febrero 10, 2016].

Zhao, W. et al., 2012. Binding affinities of vascular endothelial growth factor (VEGF) for heparin-derived oligosaccharides. *Bioscience reports*, 32(1), pp.71–81. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3190640&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accedido febrero 9, 2016].

Zirkin, B.R. et al., 1985. In vitro and in vivo studies of mammalian sperm nuclear decondensation. *Gamete Research*, 11(4), pp.349–365. Available at: http://doi.wiley.com/10.1002/mrd.1120110403.

Zirkin, B.R. & Chang, T.S., 1977. Involvement of endogenous proteolytic activity in thiol-induced release of DNA template restrictions in rabbit sperm nuclei. *Biology of reproduction*, 17(1), pp.131–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/884180 [Accedido febrero 13, 2016].

Zirkin, B.R., Soucek, D.A. & Chang, T.S., 1982. Sperm nuclear packing and regulation during spermatogenesis and fertilization. *The Johns Hopkins medical journal*, 151(3), pp.101–12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6810011 [Accedido enero 6, 2016].

Zuelke, K.A. et al., 2003. Glutathione (GSH) Concentrations Vary With the Cell Cycle in Maturing Hamster Oocytes , Zygotes , and Pre-Implantation Stage Embryos. , 112(August 2002), pp.106–112.

de Zwart, L.L. et al., 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free radical biology & medicine*, 26(1-2), pp.202–26. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9890655 [Accedido febrero 15, 2016].

REFERENCIAS DE LIBROS

Barratt, CLR. Spermatogenesis. En: Gametes: the spermatozoon. Cambridge University Press 1995. Capitulo 13: 250-267. ISBN 0-521-47996-7

Bedford JM, Hoskins DD. The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. En: Lamming GE, ed. Mashall´s Physiology of Reproduction, 4ta.ed. Vol2. Edingurgh: Churchill Livingstone, 1990: 379-568.

Curry, MR; Watson, PF. Sperm structure and function. En: Gametes: the Spermatozoon. Cambridge University Press 1995. Capitulo 3: 45-69. ISBN 0-52147996-7

Hicks JJ. Bioquímica. Mc Grawn-Hill. 2001. México.

Ware GW. Insecticides en “The pesticide book” Thompson publication. Fresno, CA. Chapter 4: 44 – 46

Yanagimachi R. Stability of the mammalian sperm nucleus. Zygote 1994; 2(4): 383-4.

ANEXO

Receta medio de cultivo A+B:

Solución A (50 ml):

Componente	**Cantidad**	**PM/Concentración**
NaCl		

Receta medio de cultivo HTF:

Solución A (1L):

Componente	Cantidad
NaCl	53,31g
KCl	3,5g
$MgSO_4$7H2O	0,49g
KH_2PO4	0,5g
Lactato de Na	37 ml
Glucosa	5g
$CaCl_2$2H_2O	3g

Solución B (100 ml):

Componente	Cantidad
$NaHCO_3$	2,1g

Solución C (100 ml):

Componente	Cantidad
Piruvato	0,37g

Preparación para 1L de medio HTF:

Solución A	100 ml
Solución B	100 ml
Solución C	10 ml
H_2O Roux	790 ml

Receta de medio hipoosmótico (MHOS)*: para preparar 1L, con agua destilada.*

Componente	Cantidad (g)
Citrato de sodio	7.35
Fructosa	13.51

Reactivos utilizados para realizar los distintos experimentos de esta tesis:

Aceite mineral: Sigma Aldrich Co, Cat N° M5904

Alcohol etílico (graduación 96°): PUROCOL.

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

Condroitín sulfato 90%: Sigma Aldrich Co, Cat N° C-4384

Dermatán sulfato: Syntex S.A., Buenos Aires, Argentina.

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

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

Eosina Y: Sigma Aldrich Co, Cat N° 230251

Glutaraldehído: Sigma Aldrich Co, Cat N° G6257

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

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

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

Hoechst 33342: Sigma Aldrich Co, Cat N° 14533

Metanol: Merck & Co., Inc.

Monobromobimane: Sigma Aldrich Co, Cat N° 69898

Paraformaldehído 37%: Anedra, Cat N° 673925

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

Tinción de Spermac: Stain Enterprises, Onderstepoort, Sudáfrica.

TÚNEL: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany

Vectashield: Laboratorios Vector, U.S.A.