



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

El epigenoma del espermatozoide: su relación con parámetros espermáticos y de fecundación in vitro en el humano y su efecto sobre la descendencia en el ratón.

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

Maite Yael Cambiasso

Director de tesis: Dr. Juan Carlos Calvo

Director asistente: Dra. Marina Romanato

Consejero de estudios: Dr. Eduardo Tomás Cánepa

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

Buenos Aires, 22 de diciembre de 2021.

El epigenoma del espermatozoide: su relación con parámetros espermáticos y de fecundación *in vitro* en el humano y su efecto sobre la descendencia en el ratón.

Al hablar de herencia podemos hablar de eventos transgeneracionales para hacer referencia a alteraciones del fenotipo de los organismos como consecuencia de la exposición de los progenitores al ambiente. Estos eventos están siendo ampliamente estudiados tanto en machos como en hembras con el fin de evaluar cómo el ambiente actúa sobre las generaciones futuras. Sin embargo, principalmente se basan en el estudio de la transferencia materna a la descendencia y poco se sabe de cómo el ambiente, actuando a través de los padres, puede influir en los hijos. Se ha reportado que las marcas epigenéticas del espermatozoide están implicadas en la funcionalidad del cigoto post-fecundación y que pueden contribuir al desarrollo embrionario. En particular, en este trabajo de tesis se plantearon dos objetivos principales: (1) evaluar en el modelo murino, el efecto del consumo paterno de etanol sobre la línea germinal y el epigenoma espermático y cómo estas posibles variaciones generan daños a la salud reproductiva de la descendencia masculina y, (2) evaluar cómo las variaciones en las marcas epigenéticas de los espermatozoides pueden alterar el éxito de las técnicas de reproducción asistida (TRA) en el modelo humano. En primer lugar, encontramos que el consumo paterno de etanol podría provocar cambios histológicos y epigenéticos, así como también daños en la integridad del DNA en la línea germinal testicular y en los espermatozoides. Estas alteraciones dieron lugar a cambios testiculares y espermáticos en la descendencia. En segundo lugar, observamos que las modificaciones epigenéticas analizadas en el modelo humano se correlacionaron con la calidad espermática y con diferentes indicadores de éxito en las TRA. En conjunto, los resultados descritos en esta Tesis aportan nuevos conocimientos de la herencia epigenética por parte del padre a la descendencia, tanto a nivel embrionario como adulto. Estos resultados podrían resultar fundamentales para dar a conocer la importancia de la exposición ambiental sobre los hombres, previo a la concepción y los efectos de dicha exposición sobre la descendencia.

Palabras claves: Espermatozoides, descendencia, marcas epigenéticas, consumo paterno de etanol, desarrollo embrionario.

The sperm epigenome: its relationship with sperm and in vitro fertilization parameters in humans and its effect on offspring in mice.

When speaking of inheritance, we can speak of transgenerational events to refer to alterations in the phenotype of the organisms as a consequence of the exposure of the parents to the environment. These events are being widely studied in both males and females in order to evaluate how the environment acts on future generations. However, they are mainly based on the study of the maternal transfer to the offspring and little is known about how the environment, acting through the parents, can influence the children. Sperm epigenetic markings have been reported to be involved in post-fertilization zygote functionality and may contribute to embryonic development. In particular, in this thesis work, two main objectives were proposed: (1) to evaluate in the murine model, the effect of paternal ethanol consumption on the germ line and the sperm epigenome and how these possible variations generate damage to the reproductive health of male offspring and, (2) evaluate how variations in sperm epigenetic markings can alter the success of assisted reproductive techniques (ART) in the human model. First, we found that paternal ethanol consumption could cause histological and epigenetic changes, as well as damage to DNA integrity in the testicular germ line and sperm. These alterations gave rise to testicular and sperm changes in the offspring. Second, we observed that the epigenetic modifications analyzed in the human model were correlated with sperm quality and with different indicators of success in ART. Together, the results described in this Thesis provide new knowledge of epigenetic inheritance by the father to the offspring, both at the embryonic and adult levels. These results could be essential to raise awareness of the importance of environmental exposure on men prior to conception and the effects of such exposure on offspring.

Key words: Sperm, offspring, epigenetic marks, paternal ethanol consumption, embryonic development.

A mi familia...

Qué difícil y gratificante es estar escribiendo estas palabras, en este último paso de la tesis de doctorado, que ocupó gran parte de mi vida, con sus momentos de angustia, de no saber para dónde correr, cómo seguir, pero, por otro lado, de tantos momentos gratificantes, de tanto descubrimiento, de autoconocimiento y de saber y confirmar, que si uno quiere puede, sobre todo estando acompañado. Y es en este punto que creo que se basa este apartado de la tesis que son los agradecimientos, porque durante este camino fueron muchos los que estuvieron junto a mí.

En primer lugar, quería agradecer a la FCEN, que me formó durante la carrera, dándome las herramientas necesarias para resolver, que poco a poco fui poniendo en práctica durante todo el doctorado.

Luego quería agradecer al IBYME y toda su comunidad, siempre solidaria y presente.

Y principalmente quería agradecerle al Laboratorio de Química de Proteoglicanos y Matriz Extracelular. Este laboratorio que me acompañó desde los inicios, allá por el 2014 cuando siendo estudiante empecé mi Tesis de Licenciatura y que me viene acompañando hasta el día de hoy. En primer lugar, quería agradecerle infinitamente a JC, por abrirme las puertas del laboratorio, por apoyarme siempre que lo necesité, por dejarme volar y acompañarme en el proceso, por aceptar cuando mis “no” aparecían en escena. Por siempre tener buena predisposición frente a todo. También quería agradecerle a Lucre, por sentarse junto a mí, tardes enteras a resolver problemas, a analizar resultados, a encontrar errores que a simple vista no se veían (porque tiene un ojo que ve más allá). Gracias Mari, por acompañarme durante este proceso, por hacerme ver que las cosas no son tan complejas como parecen, por enseñarme a ser independiente, a no tener miedo a “hacer”, a compartirme todo tu saber y por hacerme ver que podía. Gracias Meli, por enseñarme la importancia de los detalles, por estar siempre que necesité, por tus sabias palabras. Gracias Cami, por tu cuota de alegría todos los días, por haber pesado la acrilamida la primera vez que tuve que hacerlo porque me puse tan nerviosa que estaba a punto de llorar jaja, y por tantas veces más que me diste una mano desinteresadamente. Gracias Ju, por todo tu conocimiento, por la seguridad que transmitís, por tu sinceridad y tu ojo crítico. Gracias Pau S. por tus consejos, por tu preocupación y ganas de ayudar siempre. Gracias a Maru y Pri por aportar frescura y renovar el laboratorio con su buena onda y sus ganas de empezar que nos contagió a todos. Gracias Sabri, sos un manojito de conocimientos y siempre dispuesta a compartíroslos, siempre recurría

a vos para todo, en mis inicios. Muchos fueron los que pasaron por este lab, sólo algunos aún continúan, pero todos tuvieron un papel importantísimo para mí.

Gracias Belu por ser mi amiga, por tener esa visión tan simplista que te ayuda a salir de cualquier problema, por estar siempre y hacer de un momento simple en uno genial, por tu excelente predisposición. Gracias Pau M. por poner esa cuota de risa, por venir con el mate abajo del brazo a compartir un ratito casi todos los días. Gracias Flavita por ser auténtica, por hacerme sentir que tenía una gran fortaleza, aunque no siempre fuera verdad. Gracias a Fran por ser simplemente un genio, creo que eso resume todo lo que sos, solidario como nadie y una gran persona.

Muchos son los que pasaron por mi vida durante este proceso, este pasillo fue realmente importante. Eze, Lu, Mati, Yami, Lu G. Gracias Isa, por siempre preocuparte por cómo estaba, por acompañarnos y aconsejarnos siempre a todos los becarios. Gracias Ale, por tu ayuda, por el aporte de tus conocimientos.

Y un gran gracias a Vani. Ella se volvió mi compañera, apoyo, asesora, a quién recurro casi todos los días. Proyectamos a diario, y como siempre decimos, nos faltan manos, tiempo, pero ideas no. Creo que formamos un gran equipo. Gracias por permitirme ser parte de tu grupo y acompañarme cuando necesite alguien para hablar. Gracias a Lu también, por ayudarme con los animales, el análisis de datos, por siempre estar dispuesta, por compartir tantos momentos juntas.

Gracias a mis amigas de la facu, De, Ivi e Iri por siempre estar, a la distancia, compartiendo nuestras experiencias, por entendernos y aconsejarnos siempre.

Gracias a mis abuelas y mis tías por estar presente, alegrarse con cada logro y por acompañarme.

Gracias a mi hermana Mariela, por ser quien más me entendió y aconsejó a lo largo del doctorado, y por qué no, de la vida. Y junto con Esteban siempre me supieron orientar, acompañar y aconsejar desde su propia experiencia. ¡Mil gracias! Sin poder dejar de agradecerles por Lu, mi sobrinita hermosa, ¡que siempre pregunta qué hago y se muere por venir al laboratorio!

Gracias Martu por siempre estar ahí, la simplicidad de una adolescente en mi vida muchas veces me hace ver la vida de otra manera. Gracias Mati por no entender nada de este mundo, pero siempre estar preguntando e interesándote por mí, y que desde su campo algo tenemos

en común y ahí estás siempre compartiéndome las novedades que hay en el mundo de la industria.

Gracias a ellos, que son el sostén de mi vida, que son quienes me miran así, sin juzgar, que se preocupan por mí y desde donde pueden siempre están presentes y ayudando a que mi vida sea más simple. ¡Gracias, mamá y papá!

Y qué difícil hablar de ellos 3 en pocas palabras, resumir lo que son para mí y lo importante que fue su compañía en este proceso y definitivamente en mi vida. Gracias Pablo, gracias por tus palabras, y por tus silencios. Por entender mis frustraciones y alegrarte por mis avances, por preguntar día a día cómo me fue, si funcionaron las cosas. Por cubrirme en mis llegadas tarde a casa cuando los días se me hacían eternos y no terminaba nunca, por alentarme siempre a que siguiera e hiciera lo que me gusta. Y gracias por esta familia que formamos, gracias por Clara y Valen. Mis dos princesas. Valen presente desde la panza, apenas empecé el doctorado, qué miedo que tenía de no poder ni siquiera empezarlo, pero qué decir... no podría haber sido mejor. Volver a casa y verla era lo mejor del día, ella me hizo entender todo, me hizo entender lo importante de la vida. Su ternura y su compañía no tienen comparación. Es simplemente ella. Y qué decir de mi Clarita, que llegó al final de mi doctorado, y que simplemente tengo que agradecerle que haya llegado. Gracias a ella, acomodé mi vida de manera tal de terminar todo allá por febrero de 2020, sin saber que la pandemia iba a cambiar de tal forma nuestras vidas. Llegó en plena cuarentena estricta y pude disfrutarla cada instante, pude verla crecer día a día. Es muy pícara, inquieta, simpática, es un terremoto feliz, y, sereno a la vez. Me permitió escribir esta Tesis siendo apenas un bebe, dando vueltas por todos lados. Nada sería lo mismo sin ella.

¡Lo imposible se vuelve realidad!

Índice

Abreviaturas	11
Introducción	15
Espermatogénesis.....	17
El espermatozoide.....	22
El proceso de fecundación.....	30
Rol de las histonas espermáticas	39
Objetivo general	46
Materiales y Métodos	48
1. MODELO MURINO EN RATÓN	49
1.1 Animales	49
1.2 Tratamiento con etanol	49
1.3 Recuperación y capacitación de espermatozoides epididimarios	50
1.4 Motilidad espermática	51
1.5 Concentración espermática	51
1.6 Descondensación in vitro de la cromatina espermática	52
1.7 Análisis de especies reactivas de oxígeno (ERO)	53
1.8 Peso e histología testicular	54
1.9 Producción espermática diaria	54
1.10 Fragmentación del DNA en células testiculares	55
1.11 Inmunocitoquímica de espermatozoides murinos	56
1.12 Apareos y crías de ratones F1	57
2. MODELO HUMANO	57
2.1 Obtención de muestras de semen de donantes normozoospermicos	57
2.2 Selección de pacientes	58
2.3 Procesamiento de las muestras	58
2.4 Selección de espermatozoides móviles y capacitación en muestras de donantes normozoospermicos	59
2.5 Selección de espermatozoides móviles y capacitación en muestras de pacientes infértiles.....	59
2.6 Inmunocitoquímica de espermatozoides humanos.....	60

2.7 Procedimiento de ICSI	60
2.8 Porcentaje de fecundación.....	61
2.9 Puntuación de calidad espermática	61
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62
Capítulo I	63
Introducción	64
Hipótesis y objetivos	77
Resultados	79
1. PADRES	80
2. DESCENDENCIA MASCULINA	90
Discusión	99
Capítulo II	108
Introducción	109
Hipótesis y objetivos	115
Resultados	117
Discusión	128
Conclusión General	136
Referencias	140
Anexo	172

Abreviaturas

ADH	alcohol deshidrogenasa
ALDH	aldehído deshidrogenasa
AMPC	adenosín monofosfato cíclico
ATP	adenosín trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
CAMKII	proteína quinasa II dependiente de calmodulina
CGP	células germinales primordiales
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
dpc	días <i>post coitum</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAsa	desoxirribonucleasa
DSP	“daily sperm production”
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FIV	fecundación <i>in vitro</i>
FSC	“forward”
FSH	hormona folículo estimulante
GC	gránulos corticales
GnRH	hormona liberadora de gonadotropina
GR	glutación reductasa
GSH	glutación
H3K27me3	trimetilación de la lisina 27 de la histona H3
H3K4me2	dimetilación de la lisina 4 de la histona H3
H3K4me3	trimetilación de la lisina 4 de la histona H3
H3K9me	monometilación de la lisina 9 de la histona H3
H3K9me2/3	di/trimetilación de la lisina 9 de la histona H3
H4K12ac	acetilación de la lisina 12 de la histona H4
HA	ácido hialurónico
hCG	gonadotrofina coriónica humana
HCO ₃ ⁻	anión bicarbonato
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana
HMG	gonadotropina menopáusica humana
HTF	fluído tubario humano

ICSI	inyección intracitoplasmática del espermatozoide
IP3	inositol 1,4,5-trifosfato
kDa	kilo Dalton
LH	hormona luteinizante
MCI	Macizo celular interno
MDA	malondialdehído
MEFs	fibroblastos embrionarios
mESCs	células madre embrionarias
MII	metafase II
MPF	factor Promotor de la Maduración
MPT	modificaciones post traduccionales
mRNA	RNA mensajero
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido
NIH	Instituto Nacional de la Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud
P1	protamina 1
P2	protamina 2
PBS	buffer fosfato salino
PFA	paraformaldehído
pH	potencial de hidrogeniones
PLC	fosfolipasa C
RA	reacción acrosomal
rFSH	hormona folículo estimulante recombinante
RL	radicales libres
RNA	ácido ribonucleico
ROS	especies reactivas de oxígeno
SH-	sulfhidrilo libre
SOD	superóxido dimutasa
SSCs	célula madre espermatogoniales
SSC	“side scatter”
TP1 y TP2	proteínas de transición 1 y 2
TRA	técnicas de reproducción asistida

TSS	sitio de inicio de la transcripción
UA	unidades arbitrarias
VG	vesículas germinales
ZP	zona pelúcida

Introducción

Cuando se comenzó a estudiar la anatomía del desarrollo, se plantearon dos hipótesis sobre el desarrollo de los individuos que, hoy en día, son conocidas como: epigénesis y preformismo.

Inicialmente, Aristóteles (alrededor del 350 a.C) planteó la hipótesis de la epigénesis, la cual establecía que las estructuras eran formadas *de novo* durante el desarrollo del individuo y que no estaban preformadas antes del inicio de los mismos (Ferrer Casero, 2016). Esta hipótesis fue perdiendo fuerza con la aparición del preformismo, que planteaba que todas las estructuras que componían a un organismo estaban previamente formadas en las gametas parentales y que el desarrollo requería sólo del crecimiento de cada una de estas estructuras. Esta hipótesis fue enunciada formalmente por Séneca en el siglo I “...En la simiente están encerradas todas las partes del cuerpo humano que serán formadas. El infante que está dentro del vientre materno tiene ya las raíces de la barba y el cabello que portará algún día. Del mismo modo, en esa pequeña masa están todos los lineamientos del cuerpo y todo aquello que la posteridad descubrirá en él...” (Aranda, 1997).

La hipótesis del preformismo fue la que ganó más adeptos durante la historia de la ciencia, creyendo en un primer momento que estos pequeños individuos preformados estaban contenidos dentro de los ovarios (Malebranche, 1624). Posteriormente, tomó más fuerza con los aportes de Malpighi (1673) quien observó que los huevos de pollo, aún en ausencia de incubación, poseían una estructura corporal muy desarrollada. Con este aporte se logró conseguir mayor apoyo por parte de la comunidad científica y de la iglesia.

Hasta ese entonces se pensaba que la mujer cumplía el papel principal aportando, dentro de sus gametas, al pequeño individuo que posteriormente iba a desarrollarse y que el semen sólo proveía la estimulación necesaria para que el individuo pudiera crecer. Con el desarrollo del microscopio, Leeuwenhoek logró ver en el líquido seminal a los espermatozoides, inicialmente denominados animálculos u homúnculos (“pequeños animalitos”) (Figura 1) por Hartsoeker (1694) que reafirma la hipótesis de la preformación. A partir de este momento se estableció que los humanos estaban contenidos dentro de estos homúnculos y que las mujeres solo servían de recipiente para el desarrollo de los individuos.

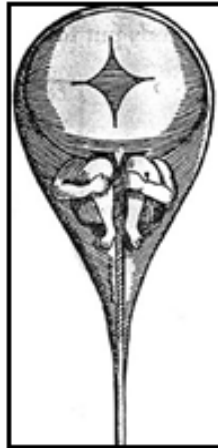


Figura 1: Homúnculo espermático según Hartsoeker (1694).

En la segunda mitad del siglo XVIII, Wolff vuelve a generar bases para oponerse al preformismo al demostrar que las estructuras presentes en los embriones de pollo no estaban ubicadas en el mismo sitio que en los adultos. Posteriormente, en el año 1775, Spallanzani postuló y demostró que el semen carente de espermatozoides era incapaz de fecundar al ovocito y tiempo después, en el año 1876, Hertwig demostró que tanto espermatozoides como ovocitos eran necesarios para formar un nuevo organismo al observar la fusión de las gametas y posterior fusión de los pronúcleos, dando fin al preformismo por completo y proporcionando las bases sobre la importancia de las gametas femenina y masculina para el proceso de fecundación que hoy en día siguen vigentes.

Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual se producen gametas masculinas a partir de células germinales diploides, luego de sufrir una reducción cromosómica. Implica la diferenciación de células madre espermatogoniales en espermatoцитos a través de divisiones mitóticas y la producción de espermátidas haploides a partir de los espermatoцитos primarios por divisiones meióticas. Posteriormente, las espermátidas dan lugar a espermatozoides en la fase final de la espermatogénesis, denominada espermiogénesis. Estos pasos fundamentales, donde la proliferación mitótica precede a la meiosis durante la espermatogénesis, se observan en una amplia variedad de organismos.

El sitio donde se lleva a cabo dicho proceso es el interior de los testículos que son parte del tracto genital masculino junto con las glándulas accesorias, los conductos y el pene (Figura 2A). Los testículos son órganos pares que poseen una serie de lóbulos conteniendo los túbulos seminíferos separados por tejido intersticial y, en su conjunto, se encuentran contenidos dentro de la túnica albugínea (Figura 2B). Tal como se mencionó, los testículos poseen estos dos compartimientos principales: los túbulos seminíferos, cuya función es la gametogénica y el tejido intersticial con función endocrina. Estos dos compartimientos se encuentran separados por una membrana basal.

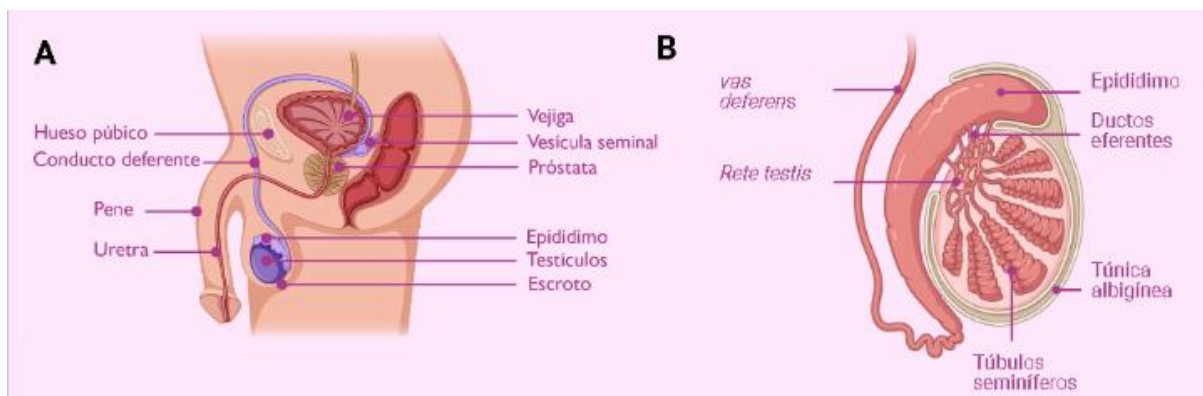


Figura 2: Tracto genital masculino y espermatogénesis. (A) Esquema del aparato genital masculino. (B) Representación de un corte transversal de testículo (Tomado y adaptado de <https://www.reproduccionasistida.org/fertilidad-en-el-hombre/>).

Los túbulos seminíferos son estructuras muy organizadas y complejas que contienen a las células germinales en diferentes estadios de desarrollo, asociadas a las células de Sertoli (Figura 3A). Las células de Sertoli poseen proyecciones citoplasmáticas que permiten generar uniones estrechas, unas con otras, ensamblando una barrera hematotesticular, que brinda protección a la línea germinal y regula el pasaje de las sustancias que llegan a estas células en desarrollo. Esto permite generar el microambiente necesario para coordinar el proceso y nutrir a las gametas. El epitelio seminífero se divide en dos compartimientos: basal y adluminal (Figura 3B). El primero está en contacto con la membrana basal y aloja a las espermatogonias, de manera tal que las más diferenciadas estén más alejadas de la membrana basal y más cerca de la región adluminal. El segundo compartimiento aloja a las gametas masculinas a partir del estadio de espermatocito hasta espermatozoides maduros que, luego, son liberados.

Entre los túbulos seminíferos se encuentra el tejido intersticial que contiene a las células mioideas, vasos sanguíneos, nervios, células de Leydig y vasos linfáticos. Las células de Leydig son quienes se encargan, principalmente, de generar el ambiente endocrino necesario para que se produzca la espermatogénesis produciendo hormonas esteroideas, expresando receptores para factores de crecimiento y secretando testosterona (Kornbluth y Fissore 2015).

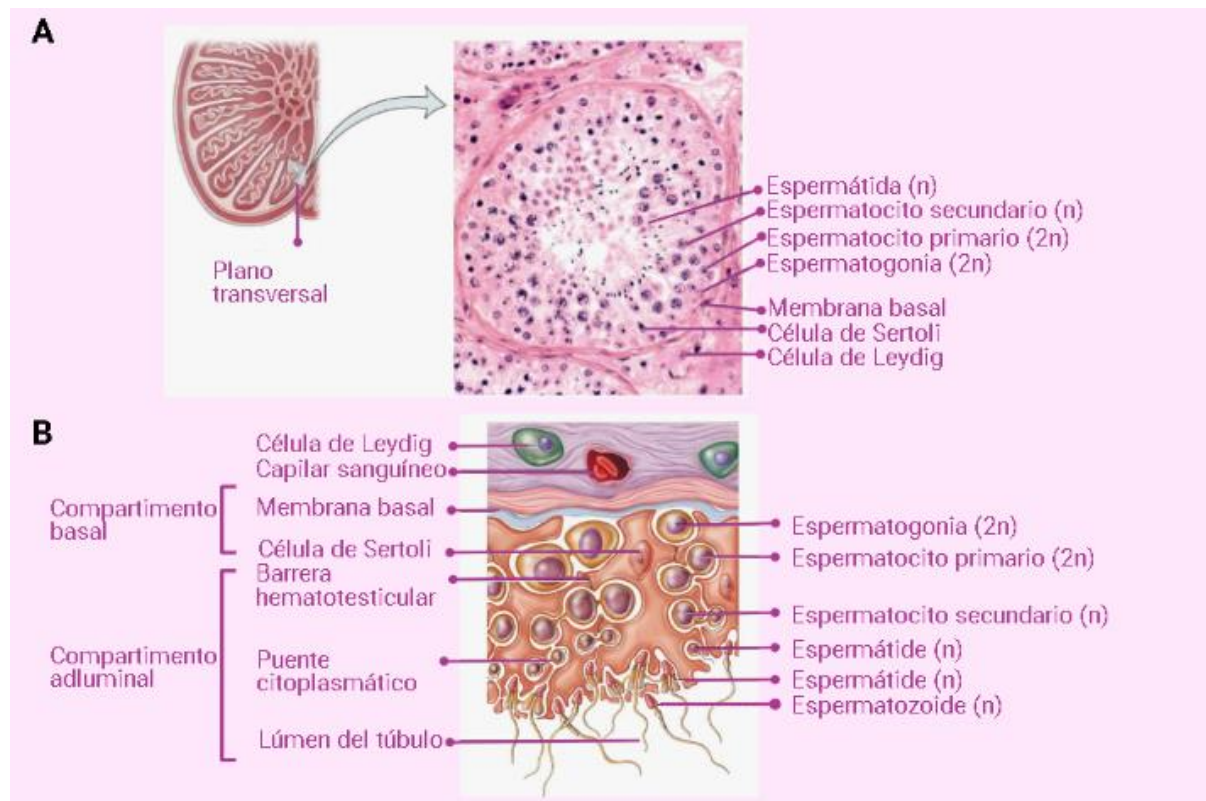


Figura 3: Corte transversal del túbulo seminífero humano. (A) Imagen de sección transversal de un túbulo seminífero. (B) Sección transversal de una porción del túbulo seminífero donde se observan los distintos estadios de la espermatogénesis y las regiones basal y adluminal, separadas del tejido conectivo por medio de la membrana basal (Tomado y adaptado de <http://www.isipedia.com/enfermeria/fisiologia-humana/aparatos-reproductores>).

En el ratón, las células germinales primordiales (CGP), migran a los pliegues genitales alrededor del día 11 *post coitum* (dpc) y se trasladan a los testículos entre los días 12,5 y 13,5 dpc. Ya en las gónadas, las CGPs mantienen la mitosis hasta que entran al ciclo celular G0/G1 el día 14,4 dpc. Durante estos días las CGPs sufren la desmetilación total de su cromatina, y

se restablece la misma entre los días 14,5 dpc y los dos días post parto donde quedan arrestadas. Luego se convertirán en las células madre espermatogoniales (SSCs, de las siglas en inglés por “stem spermatogonial cells”) (Luo *et al.*, 2015).

En el humano, las CGP se originan en la cuarta semana de gestación y migran durante la séptima semana hacia las crestas genitales. Allí se incorporan en los cordones, los cuales se ahuecan para formar los túbulos seminíferos. La fase de amplificación mitótica transcurre en este sitio una vez alcanzada la pubertad dando origen a las SSC.

Las SSC corresponden a las células madre del tejido adulto en los testículos que son la base de la espermatogénesis, esenciales para la fertilidad masculina (Phillips *et al.*, 2010). Las SSC poseen dos características esenciales: 1) autorrenovación para mantener la reserva de células madre y, 2) diferenciación para mantener la producción continua de espermatozoides (de Rooij y Grootegoed, 1998). Al igual que otras células madre de tejido adulto, las SSC son raras y comprenden sólo el 0,03% del total de células germinales en ratones (Tegelenbosch y de Rooij, 1993). Sin embargo, su capacidad de autorrenovarse da lugar a millones de espermatozoides cada día (Phillips *et al.*, 2010).

En los ratones, las SSC se distinguen por su disposición clonal en el epitelio seminífero (Espermatogonias A simple, A par o A alineada), por marcadores moleculares (D4, GFRA1, PLZF, SALL4 y otros) o por su potencial biológico para producir y mantener la espermatogénesis cuando se trasplantan a testículos receptores. Por el contrario, en los testículos de humanos, las SSC se distinguen morfológicamente en dos tipos distintos de espermatogonias indiferenciadas, denominadas como A oscuras o A pálidas por la descripción de su morfología nuclear y la tinción con hematoxilina (Fayomi y Orwig, 2018)

La espermatogénesis está dividida en tres fases cruciales: **amplificación mitótica**, **meiosis** y **diferenciación** o **espermiogénesis** (Figura 4).

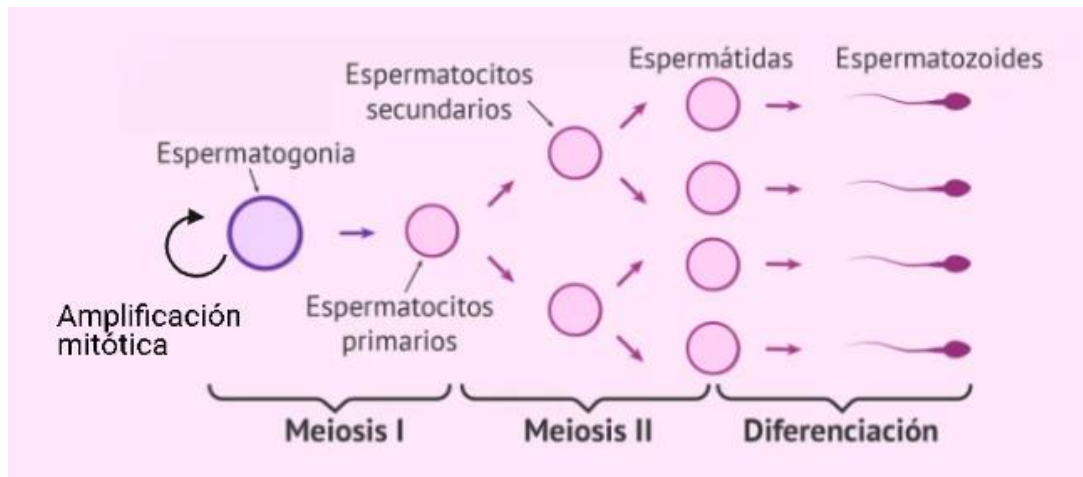


Figura 4: Etapas de la espermatogénesis (Tomado y adaptado de <https://www.reproduccionasistida.org/espermatogenesis/>).

Durante la fase de amplificación mitótica las CGP se diferencian en espermatogonias. Estas se caracterizan por poseer un núcleo grande y ovoide y se alojan hacia la periferia del túbulo seminífero quedando en contacto con la membrana basal. A medida que sufren mitosis van adentrándose en el túbulo y van diferenciándose en otras espermatogonias (A1-A2-A3-A4) hasta transformarse en espermatogonias B. Éstas poseen un núcleo más pequeño y redondeado en cuyo interior la cromatina está más compacta.

La fase meiótica comienza con la diferenciación de las espermatogonias B a espermatocito I, dando fin al proceso de proliferación. El espermatocito I es diploide, lleva a cabo todas las etapas de profase y es el estadio donde se transcriben los genes, cuyos productos serán utilizados para formar el axonema y el acrosoma. En esta etapa es donde ocurre la primera meiosis (reduccional) permitiendo pasar al estadio de espermatocito II, ya haploide, que sufre la segunda meiosis (ecuacional) dando origen a las espermátidas tempranas. Durante estas divisiones ocurren dos eventos clave, el intercambio de DNA entre cromosomas homólogos y la segregación de cromosomas, que producen la diversidad genética necesaria para permitir la supervivencia de las especies (Chan et al., 2004). A partir de aquí comienza la espermiogénesis, que es el pasaje de espermátida temprana a espermatozoide. Durante este proceso se producen muchos cambios morfológicos (formación del flagelo y acrosoma, reorganización mitocondrial, pérdida del citoplasma y condensación nuclear), fisiológicos y bioquímicos. La condensación nuclear se debe a la reorganización de la cromatina desde una estructura nucleosomal que se basa en la interacción de histonas con el DNA, a una que

reemplaza a las histonas por las protaminas (Dadoune, 2003; Steger, 1999; Braun, 2001; Miller, 2010). Durante este proceso se reduce drásticamente el volumen nuclear. El aparato de Golgi es quien genera durante esta fase, vesículas y gránulos acrosómicos que van a depositarse en la región apical de la cabeza del espermatozoide. El aparato de Golgi también permite reacomodar los centríolos proximales, determinando el sitio de implantación del flagelo y a los distales para permitir el desarrollo del axonema a partir de ellos. Las mitocondrias se desplazan hacia la zona posterior que va a estar determinada por la ubicación de los centríolos y se van a disponer alrededor del axonema funcionando como el motor del movimiento flagelar. Posteriormente ocurre la espermiación, que es la denominación del proceso que permite liberar a los espermatozoides maduros de la célula de Sertoli.

Los espermatozoides, una vez liberados viajan hacia la *rete testis* que es el sitio donde se produce la fagocitosis del citoplasma remanente y de espermatozoides dañados o muertos. Luego, pasan al ducto eferente que se encarga de absorber agua a través de células absorbentes y que se conecta con el epidídimo. Aquí es donde se completa la maduración espermática que incluye cambios morfológicos, bioquímicos y metabólicos y es el sitio en donde se almacena a los espermatozoides que pasarán, luego, al ducto deferente para ser eyaculados. Los cambios mencionados incluyen, principalmente, variaciones en la fluidez de la membrana plasmática de los espermatozoides, debidas al aumento de proteínas y colesterol respecto al nivel de lípidos, provocando una mayor rigidez. Esto también se ve favorecido por el aumento de puentes disulfuro entre algunas proteínas componentes de la membrana, proporcionando una mayor estabilidad. También se agregan a la gameta diferentes factores “descapacitantes” primarios. Durante la eyaculación, los espermatozoides atraviesan el *vas deferens* que recoge, además, las secreciones de las glándulas accesorias (próstata, vesícula seminal, glándulas bulbo-uretrales), que se encargan de regular el volumen, pH y nutrición del eyaculado y, finalmente, la uretra.

El espermatozoide

Los espermatozoides son las gametas masculinas, células altamente especializadas, que poseen dentro de sus características distinguibles la presencia de un núcleo haploide, necesario para poder transferir su material genético dentro del ovocito dando comienzo al proceso de fecundación. Para esto, el espermatozoide debe conservar el DNA en perfectas

condiciones, transportarlo hasta el sitio donde se encuentra el ovocito y ser capaz de reconocerlo y fusionarse con él.

Durante la evolución, permitiéndoles cumplir con su objetivo principal, los espermatozoides fueron adquiriendo y desarrollando una morfología especializada que facilita la ocurrencia de cada uno de los procesos.

Estructura

El espermatozoide posee características que son únicas dentro del conjunto de células que componen a un individuo, con funciones altamente especializadas.

La membrana plasmática del espermatozoide permite delimitar definidamente y de manera continua a la célula, manteniendo su integridad, proporcionándole protección y sectorizando las distintas regiones que conforman al espermatozoide gracias a su heterogeneidad. Los espermatozoides maduros poseen poca fluidez en su membrana debido a que una gran fracción de los lípidos que la componen se encuentran inmovilizados y sólo un 50-70% de los mismos están libres (Wolf, 1988).

Si bien la forma y el tamaño de los espermatozoides son dependientes de cada especie, la estructura general es similar en los mamíferos. Morfológicamente el espermatozoide puede dividirse en dos grandes partes: la **cabeza** y el **flagelo**, los cuales a su vez se dividen en otras regiones (Eddy y O'Brien, 1994; Darszon et al., 2011) (Figura 5 A-B).

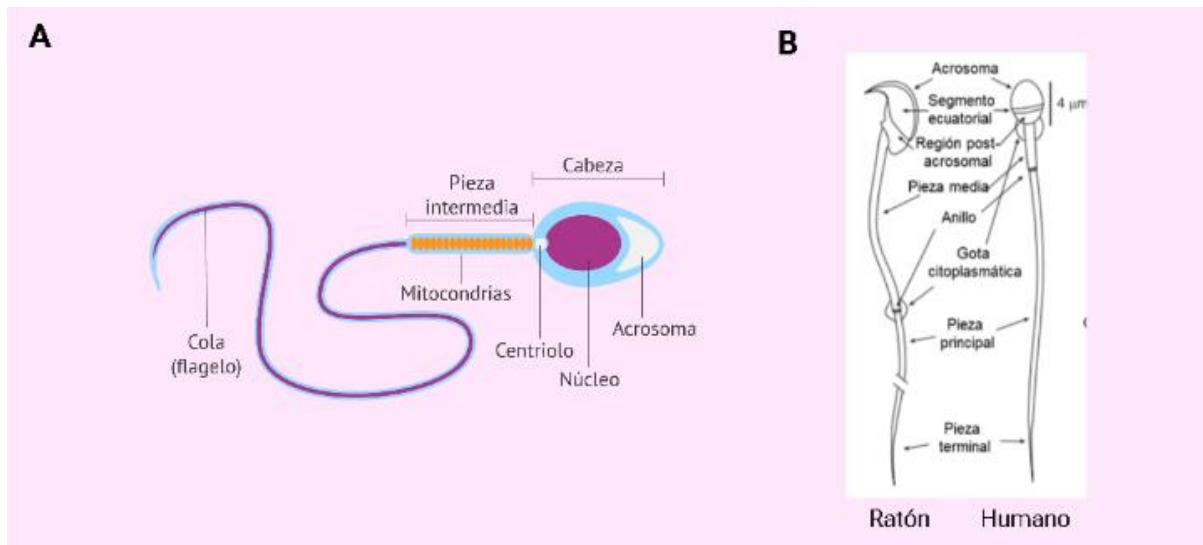


Figura 5: Esquema general de un espermatozoide de mamífero. (A) Estructuras principales que componen al espermatozoide. (B) Esquema de un espermatozoide de ratón y de humano en el que se muestran las diferentes estructuras. Se pueden apreciar las diferentes formas de la cabeza (falciforme y espatulada, respectivamente). (Tomado y adaptado de <https://www.reproduccionasistida.org/espermatozoide/>).

La principal función de la cabeza espermática es contener y preservar la integridad del material genético hasta la fusión del mismo con el ovocito. Principalmente, está compuesta por el **núcleo espermático** y **acrosoma**, posee muy poco citoplasma y carece de organelas (Figura 6).

El núcleo espermático ocupa, prácticamente, la totalidad de la cabeza y está compuesto principalmente por el DNA que se encuentra fundamentalmente asociado a protaminas, proteínas básicas de bajo peso molecular que permiten un mayor empaquetamiento de la cromatina, en comparación con las histonas presentes en las células somáticas (Ando et al., 1973). Este carácter básico de las protaminas permite neutralizar las cargas negativas del DNA formando complejos muy estables, tal como se detalla más adelante. El núcleo, como se mencionó anteriormente, posee un número haploide de cromosomas y es transcripcionalmente inactivo debido a la gran compactación que presenta, lo que le permite disminuir la tasa de aparición de aberraciones en el material genético.

El acrosoma se encuentra en la región apical de la cabeza espermática (Figura 6). Es una vesícula que está delimitada por una membrana interna y otra externa, en contacto estrecho con la membrana plasmática.

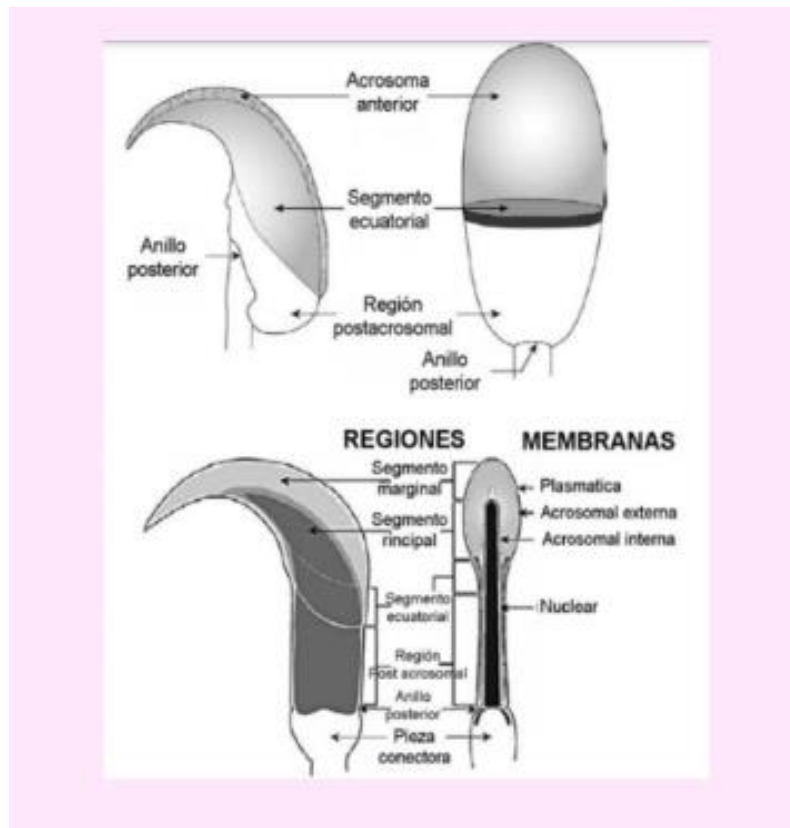


Figura 6: Detalle de las regiones de la cabeza del espermatozoide. En el panel superior se muestran las estructuras generales de la cabeza de un espermatozoide falciforme (izquierda) y/o con forma espatulada (derecha). En el panel inferior se visualizan las diferentes regiones que componen cada estructura general de la cabeza y las membranas de un espermatozoide falciforme.

En cuanto a su composición, el acrosoma contiene diversas moléculas con actividad enzimática entre las que se puede enumerar, principalmente, la hialuronidasa y acrosina (en forma de zimógeno). Estas enzimas se han relacionado con la capacidad del espermatozoide de penetrar las cubiertas que rodean al ovocito durante la fecundación (Toshimori y Eddy, 2015) en el proceso denominado reacción o excitosis acrosomal (RA), que se detalla más adelante. Los límites inferiores del acrosoma determinan el segmento ecuatorial, que permanece intacto luego de la RA. La región de la membrana plasmática que recubre al segmento ecuatorial es el sitio de reconocimiento espermatozoide-ovocito y el punto fundamental de la fusión entre membranas. Sin embargo, la fusión ocurre luego de la RA indicando que durante la misma se producirían cambios a nivel de membrana en esta región (Yanagimachi, 1988).

La principal función que posee el flagelo es la de proveer la energía y el aparato necesario para que la gameta sea mótil. Esto último es esencial en el proceso de fecundación, debido a que la gameta masculina debe recorrer grandes distancias desde su sitio de origen (en el testículo) hasta el sitio de unión con el ovocito (trompas de Falopio).

El flagelo se divide en 4 segmentos: pieza conectora o cuello, pieza media, pieza principal y pieza terminal (Figura 7) (Eddy y O'Brien, 1994; Darszon et al., 2011). Todas estas piezas son atravesadas por el axonema que está formado por dos microtúbulos centrales rodeados por 9 dobletes de microtúbulos. El principal componente de los microtúbulos es la tubulina y cada uno se une al siguiente a través de brazos o proyecciones, principalmente formadas por dineína. Estos brazos juegan un rol esencial en el movimiento flagelar ya que se encarga de transformar la energía química, generada por las mitocondrias, en energía cinética gracias a su capacidad de hidrolizar ATP.

La pieza conectora está formada por un corto segmento que une la cabeza con el flagelo espermático. En esta región está localizado el centriolo proximal, el cual es remanente del centriolo distal del espermatozoide inmaduro, que es desintegrado parcialmente y origina el axonema durante la espermiogénesis.

La pieza media comienza en la región distal de la pieza conectora y finaliza al comienzo de la pieza principal. Esta región se caracteriza por poseer la vaina mitocondrial, estructura compuesta por mitocondrias organizadas en forma helicoidal que cumplirían un papel en la provisión de energía, necesaria para permitir el desplazamiento de los espermatozoides.

La pieza principal es el segmento de mayor longitud dentro del flagelo espermático. En esta región es característica la presencia de la vaina fibrosa, citoesqueleto alrededor del axonema y fibras densas externas. Todas estas estructuras permiten restringir y controlar el movimiento flagelar.

La pieza terminal carece de vaina fibrosa, que hasta el momento rodeaba al axonema en todas las piezas del flagelo y es la región donde culminan los microtúbulos que componen al axonema, dando fin a esta estructura y, por consiguiente, al flagelo.

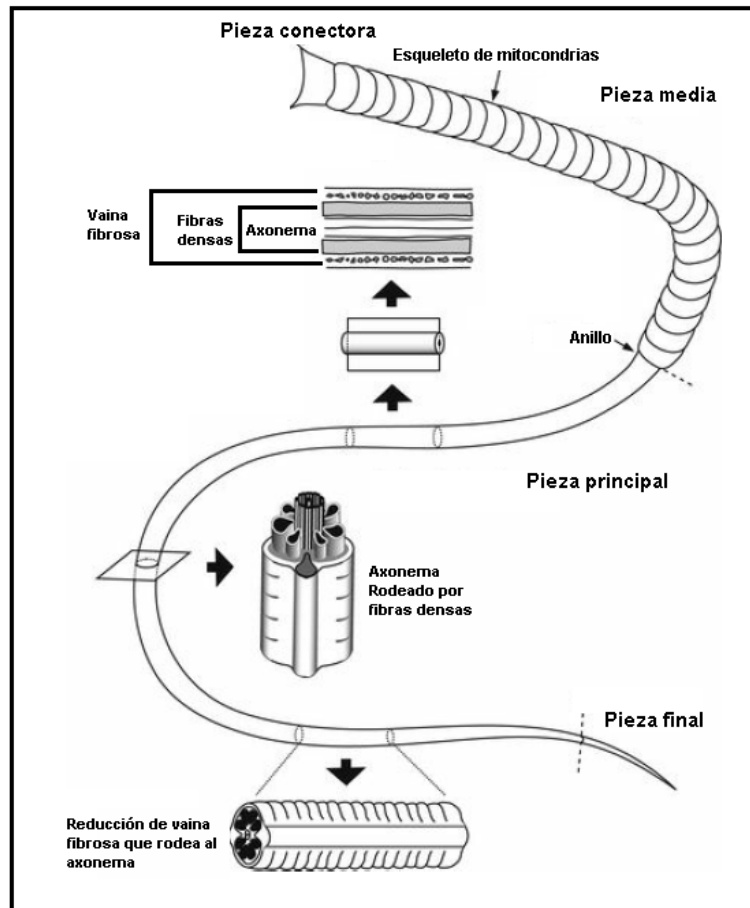


Figura 7: Detalle del flagelo y estructuras internas (adaptado del libro Sperm Chromatin, Zini A, Agarwal A, 2011).

A pesar de que los espermatozoides liberados de los testículos son células altamente diferenciadas, en los mamíferos no tienen aún la capacidad de moverse progresivamente o de interactuar con el ovocito. Para adquirir estas capacidades y llegar al sitio de fecundación en estado competente, previo al proceso de fecundación, los espermatozoides deben sufrir numerosas modificaciones durante su pasaje tanto por el tracto masculino como por el femenino: **maduración** y **capacitación** (Yanagimachi, 1994).

El primer paso ocurre en el epidídimo, hacia el final de la espermatogénesis y es durante este que el espermatozoide adquiere la motilidad progresiva y la capacidad de reconocer y fecundar al ovocito, como producto de una serie de cambios funcionales, estructurales y bioquímicos. Estos cambios surgen como consecuencia de la adquisición de nuevos componentes en la membrana y de la migración, liberación y/o modificación de componentes preexistentes en la misma (Bedford, 1979; Hinrichsen y Blaquier, 1980; Austin, 1985; Eddy y

O'Brien, 1994; Cooper, 1998). Todas las modificaciones que sufre el espermatozoide durante la maduración generan una célula que posee la capacidad potencial de fecundar pero que no la puede expresar.

El epidídimo se divide, sin la existencia de límites anatómicos, en tres regiones: *caput* o cabeza (región más próxima al testículo), *corpus* o cuerpo (región media) y *cauda* o cola (región distal al testículo). Los espermatozoides durante su estadio en la *cauda* están quiescentes y, una vez que son eyaculados, adquieren motilidad progresiva (Yanagimachi, 1994; Shum, 2011) siendo liberados junto con las secreciones de las glándulas accesorias, formando así el plasma seminal. En parte, este cambio de motilidad es producido por las concentraciones de HCO_3^- (anión bicarbonato) que dan comienzo al proceso de capacitación que luego se completa *in vivo* dentro del oviducto (Yanagimachi, 1994; Bedford, 2004) o *in vitro* en presencia del medio de cultivo. El movimiento progresivo consiste en un movimiento relativamente simétrico, de baja amplitud y principalmente en línea recta. El plasma seminal suele ser ligeramente alcalino y contiene sustratos gelificantes tales como el fibrinógeno o semenogelina que coagulan temporalmente el semen, evitando la expulsión vaginal de los espermatozoides y protegiéndolos del bajo pH vaginal. En algunas especies como el ratón, y como producto de la acción de proteínas secretadas por las vesículas seminales (VG), se forma un tapón vaginal que resulta fundamental para la supervivencia de los espermatozoides en el útero (Kawano et al., 2014).

Para que el espermatozoide pueda reconocer al ovocito y fecundarlo, debe sufrir el proceso de capacitación (Austin, 1952). Este proceso refleja la reprogramación funcional de esta célula tanto en la cabeza como en el flagelo incluyendo cambios moleculares, bioquímicos y fisiológicos y ocurre en el tracto genital femenino. Ocurren cambios a nivel de la membrana que se relacionan con el incremento en proteínas y la reducción de lípidos, que ocasionan el aumento de la fluidez de esta. Los cambios relacionados con la fluidez de la membrana se deben, también, a la reducción en el contenido de colesterol que es secuestrado por albúmina, a la pérdida de factores descapacitantes, a la disminución en la cantidad de puentes disulfuro que son quienes proporcionan la estabilidad de la membrana y al aumento del pH y del calcio intracelular y a la hiperpolarización de la membrana plasmática (Visconti et al., 2011). Como consecuencia de la capacitación, los espermatozoides exhiben tres modificaciones principales: la hiperactivación flagelar, la regulación de los patrones de

transducciones de señales, en respuesta a los quimioattractantes y la capacidad de sufrir la RA que le permite interactuar con el ovocito.

La hiperactivación genera un movimiento flagelar vigoroso, asimétrico y penetrante (Figura 8) que incrementa el empuje y la fuerza generada por el espermatozoide, facilitando el movimiento a través de medios viscosos y la penetración del moco cervical, el *cumulus oophorus* y la ZP (Drobnis, 1988; Miki, 2013). A nivel molecular, se ha descrito que la alcalinización de los espermatozoides, el AMPc (adenosín monofosfato cíclico) y el aumento de Ca^{2+} , así como también la progesterona, serían responsables de desencadenar la hiperactivación (Ho y Suarez, 2001).

Si bien el espermatozoide se capacita fisiológicamente en el tracto femenino, esto puede lograrse *in vitro* incubando a los espermatozoides en medios definidos (Yanagimachi y Chang, 1963; Toyoda y Chang, 1974; Visconti et al., 1995a; b).

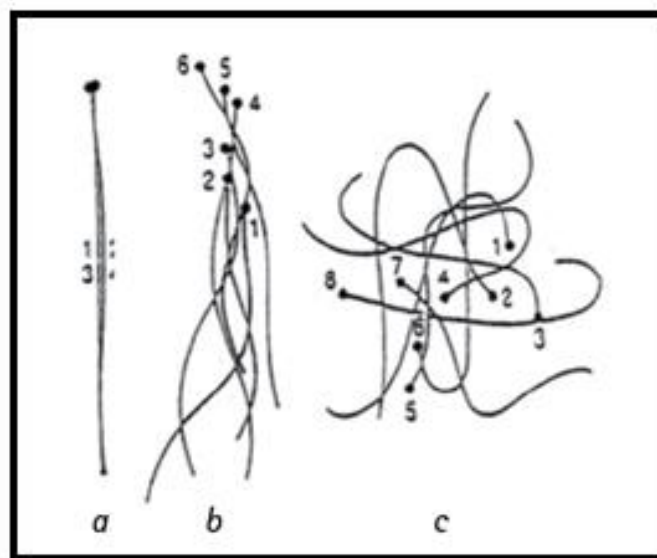


Figura 8: Esquema de los distintos tipos de movimiento del espermatozoide. (A) Movimiento flagelar dentro del epidídimo, (B) post eyaculación y (C) dentro del oviducto, en donde adquieren el típico movimiento hiperactivado (Tomado de internet).

Estos cambios observados en el espermatozoide durante la capacitación se deben, principalmente, a modificaciones de las concentraciones de mensajeros intracelulares, al flujo de iones a través de la membrana y a modificaciones postraduccionales de proteínas, dado

que el espermatozoide es principalmente transcripcional y traduccionalmente inactivo (Puga Molina et al., 2018).

Las gametas masculinas se orientan a través de una combinación de mecanismos termotácticos, reotácticos y quimiotácticos (Wachten et al., 2017). Estos atrayentes de espermatozoides solubles están presentes en el fluido folicular y oviductal de numerosas especies de mamíferos (Villanueva-Diaz, 1990; Ralt, 1991; Ralt, 1994; Fabro, 2002) y también se hallan en el *cumulus* del ovocito (Sun, 2005). Cada vez son más las evidencias que apoyan la hipótesis que el tracto genital femenino tiene mecanismos de selección altamente sofisticados que permiten la llegada de espermatozoides de alta calidad al sitio de fecundación. Se cree que la morfología, el tipo de motilidad y las marcas bioquímicas en la superficie espermática contribuyen al pasaje de los espermatozoides al oviducto (Holt y Fazeli, 2015; Sakkas et al., 2015; Suarez, 2016) que, luego, van a quedar almacenados en el istmo oviductal en donde los espermatozoides interactúan directamente con el epitelio del oviducto, hasta el momento de la ovulación. El epitelio del istmo genera un microambiente que estabiliza al espermatozoide por un tiempo hasta que se desencadena la ovulación, momento en que se secretan ciertos factores que permiten la liberación de los espermatozoides hacia la *ampulla*. Asimismo, las células del *cumulus* secretan sustancias quimioatrayentes que permiten guiar al espermatozoide hacia el ovocito (Guidobaldi et al., 2012; Ernesto et al., 2015).

El proceso de fecundación

La fecundación es el proceso mediante el cual las gametas haploides (espermatozoide y ovocito) se unen generando un individuo genéticamente distinto. Este proceso involucra numerosos pasos entre los que se incluyen la adhesión celular, señalización intracelular, regulación de la exocitosis, fusión y regulación del ciclo celular y, en los mamíferos, tiene lugar en la zona de la *ampulla* de una de las trompas de Falopio (Figura 9).

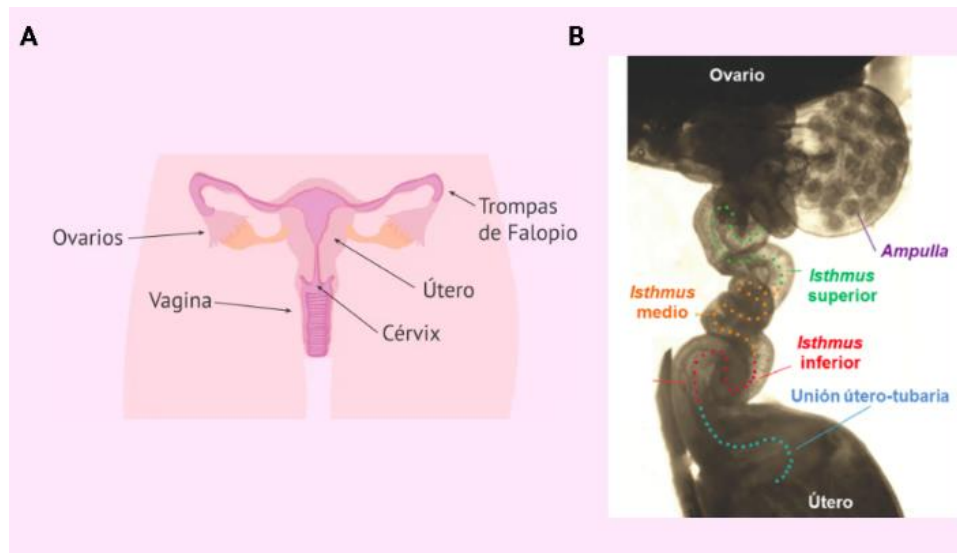


Figura 9: Tracto genital femenino. (A) Se muestra un esquema del tracto femenino en humanos (Tomado de <https://www.reproduccionasistida.org/fertilidad-en-la-mujer/>) y en (B) el murino, indicándose las diferentes regiones del oviducto (Adaptado de La Spina et al., 2016).

Existen varios modelos para describir el proceso mediante el cual se produce la interacción entre las gametas y cómo se atraviesan las membranas ovocitarias (Figura 10) cuyas diferencias residen, principalmente, en el sitio en el que se produce la RA (Figura 11A) y en cómo se establece la interacción del espermatozoide con la zona pelúcida (ZP) (Figura 11B).

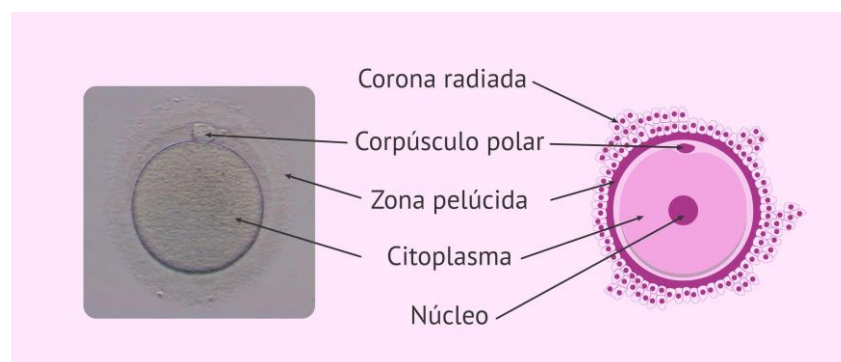


Figura 10: La gameta femenina. Microfotografía de un ovocito humano maduro arrestado en MII, desnudo de células del *cumulus* y su respectivo esquema en donde se observan las capas que rodean al ovocito, su núcleo, el citoplasma y el corpúsculo polar (Tomado de <https://www.reproduccionasistida.org/ovocito/>).

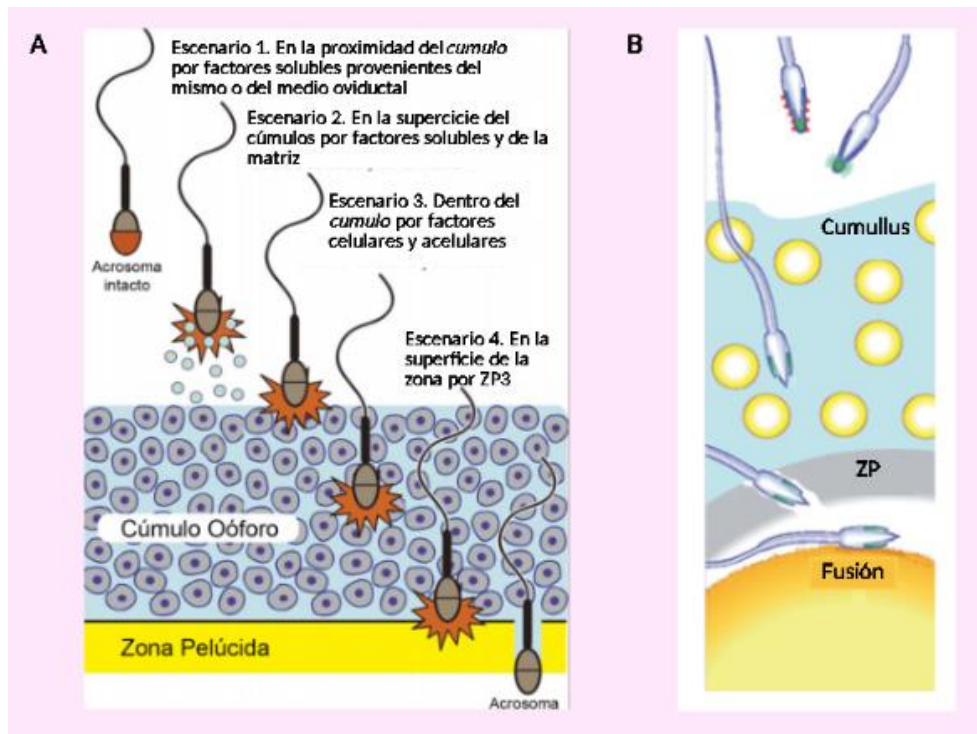


Figura 11: Interacción espermatozoide-ovocito. (A). Sitios donde se produciría la RA (Adaptado de Buffone et al., 2014). (B) Esquema del proceso de fecundación que involucra la penetración del *cumulus*, la unión y penetración de la ZP por parte del espermatozoide y la fusión de las gametas (Adaptado de Okabe, 2013).

Si bien aún no están claros los mecanismos involucrados durante la penetración del *cumulus*, se ha reportado que los espermatozoides poseen en su membrana hialuronidasas que favorecen su pasaje a través de este (Kim et al., 2005). A su vez, se ha observado la presencia de espermatozoides reaccionados dentro del *cumulus* del ovocito y se ha planteado que esto se debe a que el *cumulus* secreta varios factores, entre ellos la progesterona (Vigil et al., 2011), que permitirían elevar el calcio intracelular en el espermatozoide. Esto permitiría activar las cascadas de señalización que producen el aumento de segundos mensajeros desencadenando así la RA (Stival et al., 2016).

Esta reacción es un evento exocítico con liberación regulada de enzimas hidrolíticas intra-acrosomales tales como la hialuronidasa, responsable de degradar las células del *cumulus* para poder atravesarlo, ya que el componente principal de la matriz extracelular que lo rodea es el ácido hialurónico asociado no covalentemente a proteínas (Piko 1979, Virji et al., 1990). Luego de haber penetrado el *cumulus oophorus*, el espermatozoide se encuentra con la ZP a la que se une por interacciones especie-específicas entre moléculas de esta envoltura y la

superficie espermática. La ZP está compuesta principalmente por tres proteínas: ZP1, ZP2 y ZP3 que forman una matriz fibrosa que es atravesada sólo por los espermatozoides que completaron la RA (Yanagimachi, 1994; Austin, 1958), posiblemente en el istmo oviductal (La Spina et al., 2016; Muro et al., 2016), necesaria para finalizar dicho proceso. Actualmente, se acepta que el espermatozoide reaccionado se une a la ZP a través de la proteína ZP2, ya que se observó que su proteólisis previene dicha unión y posterior penetración de esta envoltura (Avella et al., 2013). Se observó que los espermatozoides interactúan, principalmente, con las proteínas ZP3 glicosiladas gracias a que reconoce los carbohidratos unidos a la misma. Esta adhesión entre las gametas es a través de ciertas regiones específicas del espermatozoide dado que su membrana se encuentra altamente regionalizada. Se cree que la penetración de la ZP se debe principalmente a dos mecanismos: uno enzimático, que permitiría la degradación de la ZP por acción de las enzimas acrosomales y uno mecánico, producto de la fuerza mecánica del espermatozoide hiperactivado.

Luego de penetrar la ZP, el espermatozoide atraviesa el espacio perivitelino que posee un microambiente que contiene vesículas secretadas por el ovocito y que serían capaces de interactuar con el espermatozoide, favoreciendo su capacidad fusogénica (Miyado et al., 2008).

Durante la RA, la membrana externa del acrosoma se une a la membrana plasmática permitiendo, de esta manera, que el contenido de la vesícula acrosómica se vuelque al exterior. Este mecanismo deja expuesta la membrana acrosomal interna que posee gran cantidad de proteínas fusogénicas que le permiten al espermatozoide fusionarse al ovocito. Los dominios de membrana involucrados en la fusión son restringidos en ambas células ya que no toda la membrana plasmática de las gametas es fusogénica. En el ovocito la fusión ocurre a través de las microvellosidades que permiten que el espermatozoide se una a la membrana que cubre al segmento ecuatorial (Yanagimachi y Bhattacharyya, 1988; Arts et al., 1993). Una vez fusionados, el espermatozoide puede ingresar por completo dentro del ovocito (Longo, 1973), la parte posterior de la cabeza y la cola, a través de un proceso de fusión de membranas y la región anterior de la cabeza mediante un proceso similar a la fagocitosis. Al día de hoy, las principales proteínas descritas que resultan fundamentales para la etapa de fusión de las gametas son la tetrasparina CD9 y JUNO (receptor de folato 4) en el ovocito, y la proteína acrosomal IZUMO1 en el espermatozoide (Kaji et al., 2000; Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000; Inoue et al., 2005; Bianchi et al., 2014). Se observó que la falta

de estas proteínas en las gametas murinas conduce a fallas en la fusión de sus membranas, dando lugar a animales infértiles.

La fusión de gametas induce en el ovocito una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que, en conjunto, se denominan activación ovocitaria. Este proceso incluye eventos tempranos como la exocitosis de los gránulos corticales (GC), bloqueo de polispermia y el recomienzo de la meiosis; y eventos tardíos como la extrusión del segundo corpúsculo polar, la descondensación de la cabeza espermática y el reclutamiento de mRNA (Yanagimachi, 1994; Raz y Shalgi, 1998). Estos cambios se deben, principalmente, a las “oscilaciones de calcio” intracelular gatilladas por un factor soluble presente en el espermatozoide, que hoy en día se acepta que sería una isoforma de PLC específica de testículo denominada PLC ζ (Saunders et al., 2002), presente en las regiones post-acrosomal y ecuatorial del espermatozoide (Fujimoto et al., 2004; Heytens et al., 2009; Escoffier et al., 2016). Este factor generaría un aumento de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) que al interactuar con su receptor permitiría la apertura de los canales de calcio de los reservorios intracelulares. Como consecuencia del aumento de calcio se produce la exocitosis de GC debido a su fusión con la membrana plasmática liberando su contenido hacia el espacio perivitelino (Hoodbhoy y Talbot, 1994; Ducibella, 1997). La función principal de esta exocitosis es la prevención de la polispermia, mediante la cual las proteínas ZP son fragmentadas para que no puedan ser nuevamente reconocidas por otros espermatozoides. Este bloqueo puede establecerse también en mamíferos, a nivel de la membrana plasmática. La especificidad de especie del proceso de fusión de gametas es menos restringida que para la penetración de la ZP, siendo posible en algunos casos la fusión de gametas heterólogas.

Al entrar el espermatozoide al ovocito se reinicia el ciclo celular que incluye el reanudamiento de la meiosis en la que está arrestado el ovocito (metafase II (MII)), la extrusión del segundo cuerpo polar y la formación de los pronúcleos femenino y masculino. El arresto meiótico en MII en el ovocito es mantenido por una alta actividad de MPF (factor promotor de la maduración, según sus siglas en inglés) formado, principalmente, por ciclina B y CDK1 (quinasa dependiente de ciclina) (Choi et al., 1996; Abrieu et al., 1997) Gracias a las “oscilaciones de calcio” se activa CAMKII (proteína quinasa II dependiente de Ca²⁺-calmodulina) (Ducibella y Fissore, 2008) que lleva a una degradación de MPF. La finalización de la meiosis está marcada por la extrusión del segundo corpúsculo polar y la formación del pronúcleo femenino. Además, también se forma el pronúcleo masculino luego de la

desintegración de la envoltura nuclear, que conduce al inicio del proceso de descondensación espermática debido a la exposición del material genético en el ooplasma. Esta exposición permite la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas gracias al glutatión (GSH) presente en el ooplasma. Las protaminas son reemplazadas por histonas sintetizadas dentro del ovocito, proceso que se realiza mediante un mecanismo que involucra eventos de fosforilación de protaminas (Okuwaki M, 2012) y participación de chaperonas. La formación del pronúcleo masculino culmina con la formación de una nueva envoltura.

Una vez formados los pronúcleos femenino y masculino, se fusiona el material genético de ambas gametas (singamia) para completar el número de cromosomas necesarios para crear el genoma del embrión (Figura 12). Una vez ensamblados los pronúcleos masculino y femenino, comienza la síntesis de DNA necesaria para la primera división mitótica. En ratón, existen diferencias en los niveles de metilación de DNA y acetilación y metilación de histonas entre el pronúcleo materno y paterno, generando esto una actividad transcripcional más temprana en el genoma paterno, respecto al materno (Adenot et al., 1997; Cowell et al., 2002; Mann y Bartolomei, 2002).

Junto con el material genético presente en el espermatozoide, también ingresan diversas poblaciones de RNA que parecen tener importancia en los primeros momentos del desarrollo embrionario con la expresión de nuevas proteínas.

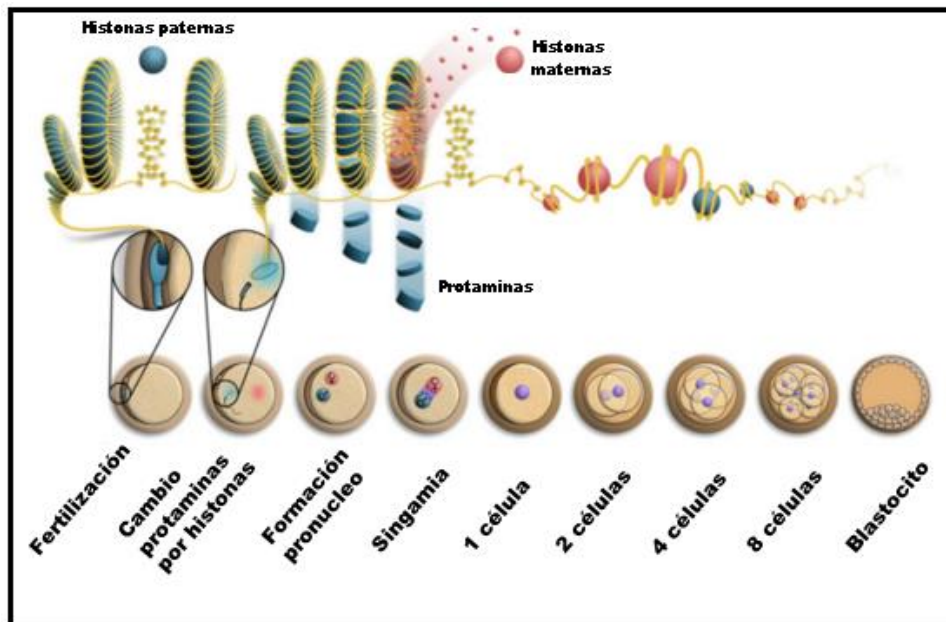


Figura 12: Esquema en donde se enumeran los eventos luego de ocurrida la fecundación.

Se describe el intercambio de protaminas por histonas ovocitarias, requisito fundamental para la formación del pronúcleo masculino propiamente dicho (adaptado de esquema extraído del libro *Physiology of Reproduction*, Plant T y Zeleznik A, 2006).

Remodelación de la cromatina espermática

La estructura de la cromatina espermática es completamente diferente a la de cualquier otra célula y está altamente adaptada para garantizar el transporte seguro del genoma paterno hacia el ovocito y, a su vez, proporcionar información epigenética necesaria para la programación embrionaria y la totipotencia del cigoto (Meyer, et al., 2017). Esta adaptación del núcleo espermático, no está dada por un superenrollamiento de la cromatina, sino que se debe a la remodelación que sufre este durante la fase postmeiótica de la espermatogénesis (espermiogénesis), en donde las protaminas reemplazan a las histonas espermáticas logrando una mayor compactación del DNA espermático (Figura 13).

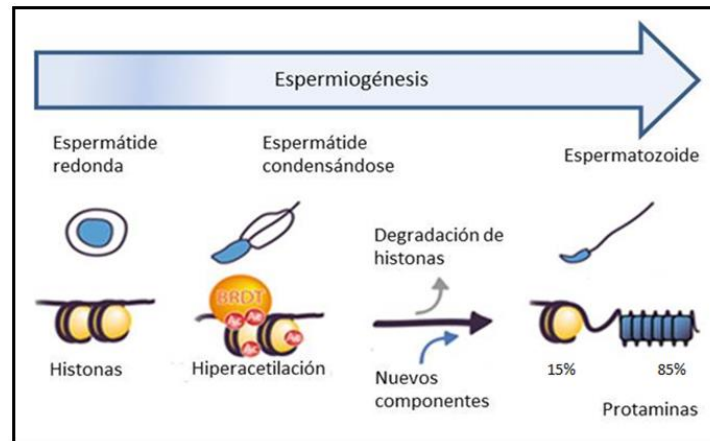


Figura 13: Remodelación de la cromatina espermática durante la espermiogénesis. Etapas de la condensación de la cromatina espermática (Tomado de internet).

En primer lugar, las histonas espermáticas son reemplazadas por proteínas de transición (TPs: TP1 y TP2) y finalmente por protaminas (Carrell, 2007; Jayaramaiah Raja, 2005; Weber, 2005). Este reemplazo está asociado con la hiperacetilación de las histonas (McPherson, 1993; Rathke, 2007; Meistrich, 1992). Se ha demostrado *in vitro* que esta modificación post-traducciona de las histonas facilita el desensamblado de los nucleosomas y, por ende, el reemplazo de las mismas por las protaminas (Oliva 1986, 1987 y 1990). También se ha observado que la hiperacetilación de la H4 en las espermatídas facilita la apertura de la estructura de la cromatina e induce el desplazamiento de las histonas. La actividad funcional de cada TPs aún está siendo debatida. Se ha reportado que la proteína TP1 disminuye la temperatura de fusión del DNA, relaja la estructura de los nucleosomas y estimula la actividad de la topoisomerasa, indicando que las TPs ayudan a la flexibilización del DNA (Akama, 1998; Meistrich, 2003). Otros, sin embargo, han reportado que las TPs no pueden generar cambios topológicos en la estructura del DNA (Lévesque, 1998). Sin embargo, se ha observado que la TP1 estimula la reparación de las roturas del DNA monocatenario (Caron, 2001).

Las protaminas son una familia de proteínas espermáticas nucleares de pequeño tamaño que incluye a las protaminas PRM1 y PRM2 que son los dos tipos principales. Ambas son ricas en los aminoácidos arginina y lisina que le otorgan una gran carga positiva, confiriéndoles su basicidad característica (Gusse et al., 1986). Gracias a la presencia de estos aminoácidos, las protaminas poseen gran cantidad de grupos amino ($-NH_3^+$) que le permite neutralizar las cargas negativas de los grupos fosfato presentes en el DNA. También poseen gran cantidad de cisteínas que aportan grupos tioles ($-SH$) que, complejando iones zinc, permiten generar

uniones iónicas, pero que, en ausencia del catión divalente, pueden formar puentes disulfuro inter e intracatenarios (Kvist et al., 1980; Bal et al., 2001) (Figura 14).

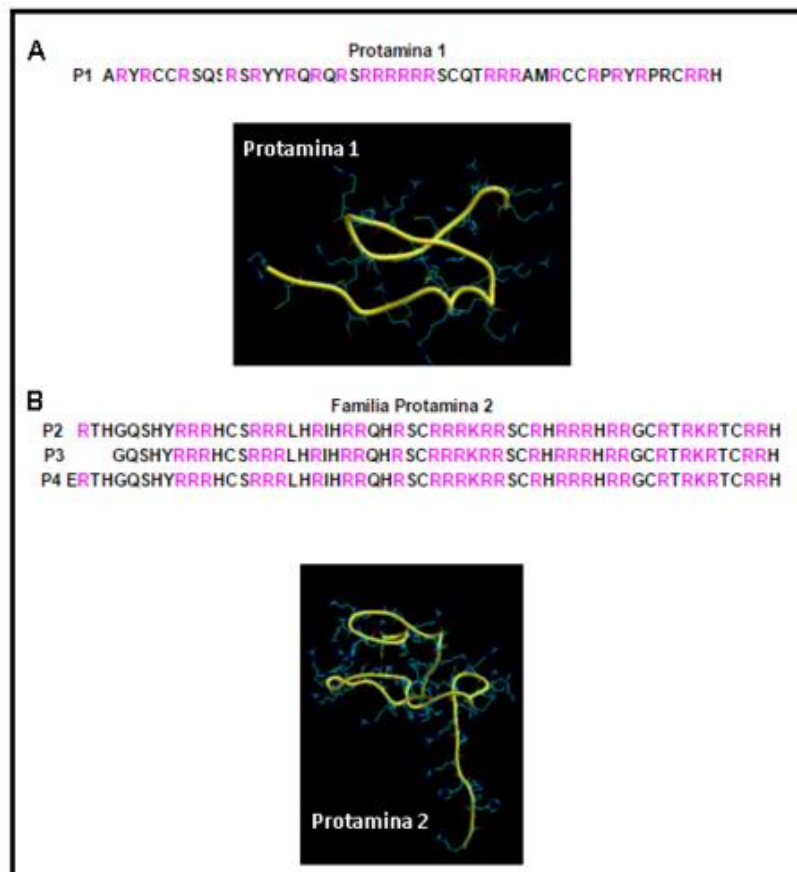


Figura 14: Secuencia de aminoácidos y modelado molecular de posible estructura: (A) Protamina P1 y (B) Protaminas P2 (imagen propia).

Se ha observado la presencia de mRNA de protaminas, específicamente durante el estadio de espermatida (Millar, 2000; Mali, 1988), lo cual indica que la síntesis y la disposición de las protaminas sobre el DNA coincide con la condensación cromatínica, la elongación de las espermatidas y la inactivación de la transcripción (Kierzenbaum, 1975).

Para que ocurra el reemplazo de las proteínas de transición por las protaminas, estas últimas deben ser fosforiladas para poder unirse al DNA y una vez unidas, deben desfosforilarse para permitir la correcta condensación de la cromatina (Carrell, 2007).

Cada molécula de protamina tiene la longitud suficiente para llenar una vuelta de DNA, y las protaminas adyacentes se unen mediante múltiples puentes disulfuro generando un complejo neutro e insoluble, reticulado que conserva el volumen y hace que la cromatina se

vuelva, prácticamente, invulnerable a la mayoría de las influencias externas (Balhorn, 1982). De esta forma, el DNA espermático adquiere una estructura toroidal que se forma espontáneamente una vez que las protaminas se unen al mismo, dando como resultado un complejo neutro y altamente condensado que genera un núcleo 6 veces más pequeño que el de una célula somática (Balhorn,1999; Brewer, 1999) (Figura 15).

Solo una pequeña porción del genoma paterno queda asociado a histonas en forma de nucleosoma (aproximadamente el 2% en ratones y el 15% en humanos) (Balhorn, 1977; Gatewood,1987). Se ha reportado que esta retención de nucleosomas se asocia, principalmente, a las regiones teloméricas y pericentroméricas de los cromosomas, donde juegan un papel estructural importante. A su vez, las histonas retenidas que quedan asociadas al DNA poseen modificaciones postraduccionales (MPTs) que son capaces de controlar la actividad génica y tiene el potencial de transmitir información a la descendencia (Brunner, 2014).

Rol de las histonas espermáticas

Cuando se habla de modificaciones epigenéticas en los espermatozoides se incluyen eventos tales como la metilación del DNA, MPT de histonas, RNA no codificantes y también se pueden incluir a las protaminas que, como ya se mencionó, son una familia de 2 proteínas principales (P1 y P2) que permiten inactivar transcripcionalmente al espermatozoide maduro. Todas estas modificaciones alteran la accesibilidad a los genes y, así, regulan su expresión sin cambiar la secuencia del DNA (Figura 16).

La metilación de histonas durante la diferenciación de células germinales masculinas, representa un papel importante, dado que se ha visto que, al inhibir metiltransferasas, se generan células germinales primordiales aberrantes con una desregulación de la expresión génica, pérdida completa de expresión de protaminas e infertilidad (Matsumoto et al., 2010), demostrando que esta marca actúa a través de varios mecanismos para guiar la espermatogénesis.

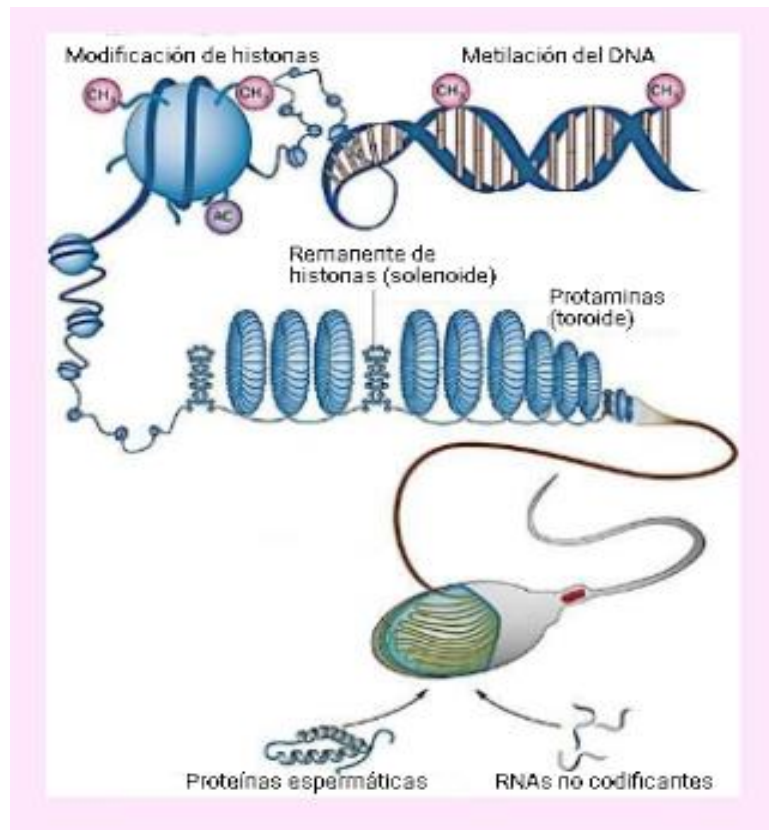


Figura 15: Esquema que describe la organización cromatínica del núcleo del espermatozoide. Las uniones puente disulfuro presentes entre las protaminas y la unión protamina-DNA forman estructuras del tipo toroide que promueve la compactación del DNA del núcleo 6 veces más que el DNA del núcleo de una célula somática. El remanente de histonas que permanece unido al DNA espermático forma la estructura típica de solenoide presente en la organización nuclear de las células somáticas (Tomado de internet).

En el proceso de la espermiogénesis ocurre la condensación del núcleo espermático a una forma transcripcionalmente inactiva para proteger al DNA durante su transporte hacia el ovocito. La transición de histona a protamina, está asociada a una hiperacetilación de la histona H4 que promueve la pérdida de la estructura del nucleosoma, permitiendo que las histonas puedan ser removidas más fácilmente. La expresión de protaminas también está regulada por la presencia de la dimetilación de la lisina 9 en la histona H3 (H3K9me_2). La presencia de esta marca aparece en el estadio de espermatocito en paquitene y persiste hasta espermátide elongada, encontrándose principalmente en regiones promotoras del gen de la proteína de transición (TNP1) y P1 (Pradeepa y Rao, 2007). Los niveles de acetilación de las histonas H3 y H4, son mayores en las células germinales (espermatogonias) y, luego, son

removidos durante la meiosis. Esta breve descripción de las modificaciones de histonas durante la espermatogénesis demuestra que la epigenética regula este proceso de varias maneras. Aunque la mayoría de las histonas son reemplazadas por protaminas durante el estadio de espermátide elongada, algunos nucleosomas modificados escapan de este intercambio y, como consecuencia, son retenidos en el espermatozoide maduro, sugiriendo que los mismos juegan un papel importante en la contribución paterna al embrión.

En espermatozoides humanos se ha observado la presencia de histonas metiladas en un 12 a 30% de los núcleos, mostrando una distribución heterogénea de las marcas: monometilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me1), H3K9me2, trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3), dimetilación de la lisina 79 de la histona H3 (H3K79me2), y trimetilación de la lisina 36 de la histona H3 (H3K36me3) en muestras de individuos normozoospermicos (La Spina et al., 2014). La presencia de estas marcas es mayor en la fracción del eyaculado con baja motilidad, asociada a una morfología y calidad funcional deficientes. Contrariamente, no se ha observado acetilación de ciertas histonas (monoacetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4ac) y monoacetilación de la lisina 5 de la histona H4 (H4K5ac)) en espermatozoides maduros de estas mismas muestras. Esto parecería indicar que defectos en el proceso de espermatogénesis alterarían la programación epigenética adecuada en el espermatozoide maduro.

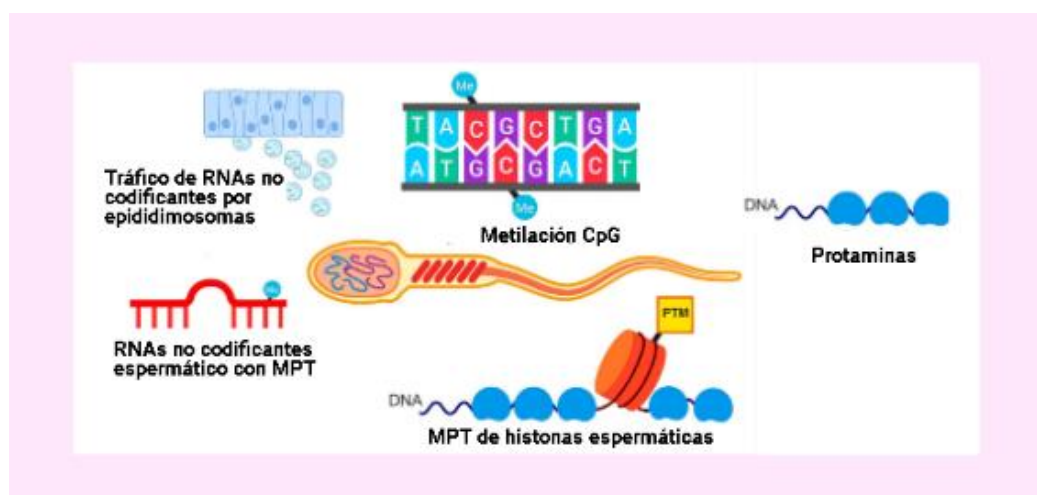


Figura 16: Mecanismos de modificación del epigenoma espermático. Los espermatozoides presentan varios mecanismos epigenéticos, en particular la metilación del DNA, las MPT de histonas, los RNA no codificantes y las protaminas (Adaptado de Rompala et al., 2019).

Algunos estudios sugieren que las histonas quedan retenidas en las regiones intergénicas más que en las regiones promotoras (Saitou et al., 2014; Carone et al., 2014; Samans et al., 2014) mientras que otros reportan que las mismas quedan asociadas a promotores génicos, grupos (“clusters”) de genes con una impronta particular (“*imprinting*”), microRNA, grupos de genes homeobox (HOX) y sitios de unión del factor CTCF (Arpanahi et al., 2009; Hammoud et al., 2009; Brykczynska et al., 2010; Carone et al., 2014). La posible asociación de histonas a promotores de genes específicos y otras regiones relevantes para el desarrollo embrionario dio lugar al concepto que dichas histonas pueden regular la expresión génica durante el desarrollo embrionario temprano (Arpanahi et al., 2009; Hammoud et al., 2009; Brykczynska et al., 2010; Hammoud et al., 2011; Schagdarsurengin et al., 2012; Erkek et al., 2013; Carone et al., 2014; Ihara et al., 2014).

Se ha observado que los espermatozoides de ranas están programados epigenéticamente para regular la expresión de genes embrionarios (Teperek, 2016). En este trabajo compararon, específicamente, el desarrollo embrionario derivado de espermatozoides maduros o de espermatidas y observaron una desregulación de la expresión génica en los embriones. Principalmente, se observó que durante la maduración espermática se pierden las marcas correspondientes a las histonas H3K4me_{2/3} y se retienen las marcas H3K27me₃. Sin embargo, lo que se observó en las espermatidas es que ambas marcas coexisten y no hay pérdida de las histonas H3K4me_{2/3} en los genes expresados diferencialmente en embriones haploides, lo que sería la causa de la obtención de embriones anormales (Figura 17).

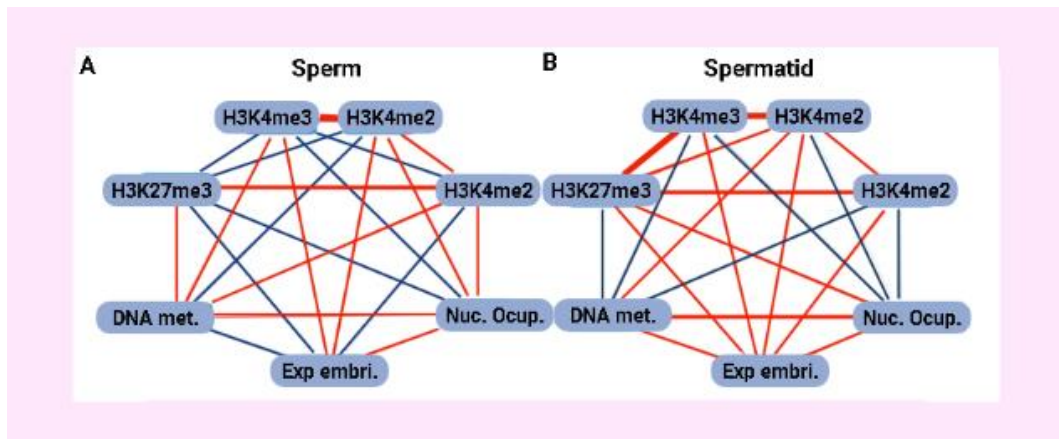


Figura 17: Los genes blanco de H3K27me3 que pierden la marca H3K4me2 / 3 en los espermatozoides y no en las espermatidas, se encuentran mal regulados en los embriones derivados de las espermatidas. Red de correlación parcial entre todas las características epigenéticas evaluadas en (A) espermatozoides y (B) espermatidas y la expresión génica en los embriones correspondientes. Las líneas rojas representan una correlación parcial positiva y las azules, negativa. El espesor representa la potencia de la correlación (Adaptado de Teperek et al., 2016).

A la vez, se vio que las marcas epigenéticas del espermatozoide están implicadas en la funcionalidad del cigoto post-fecundación y que pueden contribuir al desarrollo embrionario (Nanassy y Carrell, 2008). Se han encontrado en espermatozoides, marcas activas de la transcripción (H3K4me2 y H3K4me3) presentes en promotores de genes requeridos para el desarrollo embrionario, y marcas represivas (H3K27me3) asociadas a promotores de genes silenciados durante la formación de gametas y el desarrollo embrionario temprano (Hammoud et al., 2009).

Las marcas correspondientes a la acetilación de la lisina 8 y la 12 de la histona H4, en el espermatozoide de ratón, parecerían ser transmitidas al cigoto debido a que se observa la presencia de esta marca en este, previo a la completa descondensación de la cromatina espermática (Figura 18) (van der Heijden, 2006). En este mismo trabajo, observaron que la heterocromatina constitutiva espermática, está enriquecida con nucleosomas que presentan modificaciones de histonas específicas que son transmitidas al cigoto.

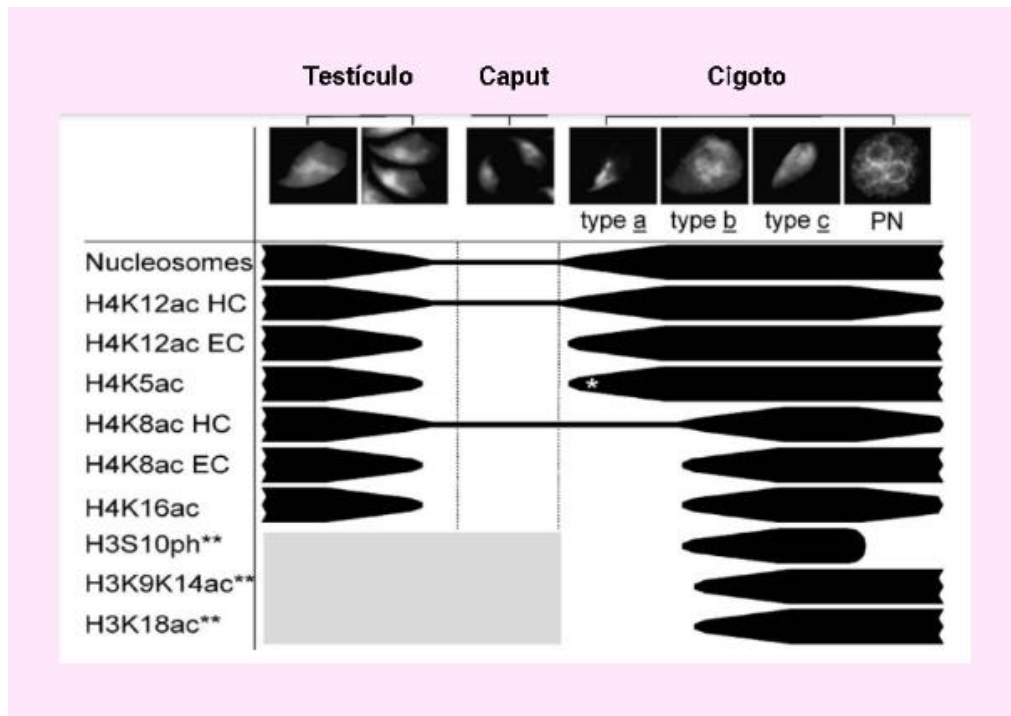


Figura 18: Descripción esquemática de la cromatina durante la espermiogénesis, espermatozoide epididimario y en el cigoto temprano. La presencia de nucleosomas y MPT de histonas en los espermatozoides de testículo y del *caput*, y en el cigoto temprano hasta 280 min después de la inseminación (~ 3,5 h después de la fusión de gametos) está indicado con barras negras. HC = heterocromatina, EC = eucromatina. (Adaptado de van der Heijden et al., 2006)

Por otro lado, en el trabajo de Jung et al. (2017) realizado en el modelo murino, se observó la presencia de varios nucleosomas bien posicionados rodeando el sitio de inicio de la transcripción (TSS). Haciendo el análisis del posicionamiento de los nucleosomas alrededor de los TSS en espermatozoides, células madre embrionarias (mESCs, de sus siglas en inglés) y fibroblastos embrionarios (MEFs) observaron que los promotores presentes en un estado epigenéticamente activo en los espermatozoides, estaban en el mismo estado en mESCs y MEFs. A su vez, estos genes están altamente expresados en las células del macizo celular interno (MCI). Si bien reportan que esta similitud entre los promotores epigenéticamente activos entre los espermatozoides y mESC no puede tomarse como evidencia del mantenimiento de este estado durante el desarrollo embrionario, suponen que este estado de los promotores en los espermatozoides podría funcionar como guía para la remetilación del genoma paterno al inicio de la

embriogénesis. De esta manera, se evitaría el silenciamiento permanente de los mismos mediante la metilación de la citosina (5mC). De esta manera, observaron que muchos promotores activos en tejidos embrionarios y adultos ya están especificados en el espermatozoide y que el genoma de estos está unido a CTCF y cohesina en sitios que también están presentes en espermátidas redondas y ESCs. Estos resultados sugieren que los espermatozoides contienen una fuente rica en información reguladora codificada, en parte, por su plegamiento tridimensional generado por CTCF y cohesina. Esta información puede contribuir a la expresión futura durante la vida embrionaria y adulta, sugiriendo mecanismos por los cuales los efectos ambientales sobre la línea germinal paterna se transmiten transgeneracionalmente.

Objetivo general

Cuando se piensa en la influencia parental sobre la descendencia es inevitable imaginar el papel de la madre y el rol fundamental que cumple el ovocito, mientras que se asigna al espermatozoide un papel casi exclusivo de transportador de material genético. El alto grado de empaquetamiento de ese material, pareciera asegurar que llegue de forma intacta al ovocito. Sin embargo, poco se ha estudiado del efecto que los hábitos de vida pueden tener sobre las gametas masculinas y, en consecuencia, sobre la descendencia

El objetivo general de este trabajo de tesis doctoral fue, precisamente, estudiar el aporte del padre sobre la descendencia, en particular la masculina, a través de sus gametas y cómo este aporte puede variar en función de la realidad ambiental al que estuvo sometido el progenitor.

A fin de abordar este objetivo en una forma más amplia, este trabajo de tesis doctoral dividió el estudio en dos capítulos: el primero tomando como modelo al ratón, con la posibilidad de estudiar el desarrollo embrionario y el segundo al humano, con posibilidades de estudio más acotadas, pero con mayor posibilidad de extensión a la medicina traslacional.

Materiales y métodos

1. MODELO MURINO EN RATÓN

1.1 Animales

Se utilizaron ratones macho y hembra endocriados y sexualmente maduros (60 días de edad) de la cepa CF-1 (*Mus musculus*, CrIFcen:CF1, Mouse Genome Informatic (MGI)), obtenidos del bioterio de la FCEyN (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales) de la UBA (Universidad de Buenos Aires, Argentina). Se hospedaron divididos por sexo en grupos de tres ratones por jaula, se mantuvieron a 22°C con un ciclo de luz / oscuridad de 12:12 h. Todos los ratones fueron alimentados con alimento comercial para ratones (Alimento "Balanceado Cooperación Rata-Ratón" de la Asociación Cooperativa de Alimentos S.A. Buenos Aires, Argentina) y con agua del grifo, filtrada, *ad libitum*. Los experimentos fueron llevados a cabo respetando el Reglamento para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la FCEN-UBA (Res CD141/00). La manipulación y el cuidado de los animales se realizaron respetando las Guías Institucionales y las de Principios sobre cuidado y uso de animales de laboratorio, NIH (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA (última edición publicada por el National Academy Press, USA, 1996). La misma fue revisada y aprobada por el CICUAL (Comisión Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio) de la FCEN-UBA (Protocolo número 56/2016).

1.2 Tratamiento con etanol

A ratones adultos machos de la cepa CF-1 de 60 días de edad y un peso corporal aproximado de 30 g, se les proporcionó acceso, exclusivamente, a etanol (graduación 96° PUROCOL) al 15% (v/v) en el agua de bebida *ad libitum*, durante 12 días (ratones tratados). Los ratones control recibieron agua filtrada. Ambos grupos de animales tuvieron acceso *ad libitum* a la comida. Para determinar los consumos, la ingesta calórica y la concentración de etanol en sangre (BAC por sus siglas en inglés) se controlaron 5 ratones de cada grupo. Estos animales se pesaron al comienzo y al final del tratamiento con etanol. Cada mañana, se registró el volumen de bebida y la cantidad de alimento consumido para monitorear la ingesta diaria de líquidos, alimentos y calorías (estimado por valor calórico de la dieta utilizada 3976 kcal / kg).

El día 12 del tratamiento, los machos CF-1 fueron sacrificados por dislocación cervical y la sangre del tronco cardíaco se recogió en tubos BD Microtainer®. Las muestras de sangre se mantuvieron a 4°C para la medición de etanol utilizando un kit comercial (ensayo enzimático NAD / NADH, sensibilidad de 10,1 mg / dL), dentro de las 3 horas posteriores a la recolección.

1.3 Recuperación y capacitación de espermatozoides epididimarios

Para recuperar los espermatozoides de la *cauda* epididimaria el día 12 post tratamiento con etanol, los ratones macho fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Se extrajeron las *caudas* epididimarias de cada animal y rápidamente se transfirieron a un tubo tipo Eppendorf conteniendo 400 µL de medio A+B (ver Anexo). Se realizaron pequeñas incisiones en ambas *caudas* para permitir la liberación de los espermatozoides móviles durante 10 minutos a 37°C (técnica de “swim-out”) dentro del tubo conteniendo el medio (Figura 19.). Al cabo de este tiempo, se retiraron los fragmentos de tejido y se homogeneizó mediante agitación suave la suspensión de espermatozoides. Luego se ajustó la concentración espermática a 5×10^6 espermatozoides/mL y se suplementó el medio con BSA al 0,3% (p/v) para promover el proceso de capacitación durante 90 minutos a 37°C, en una atmósfera de 5% CO₂.

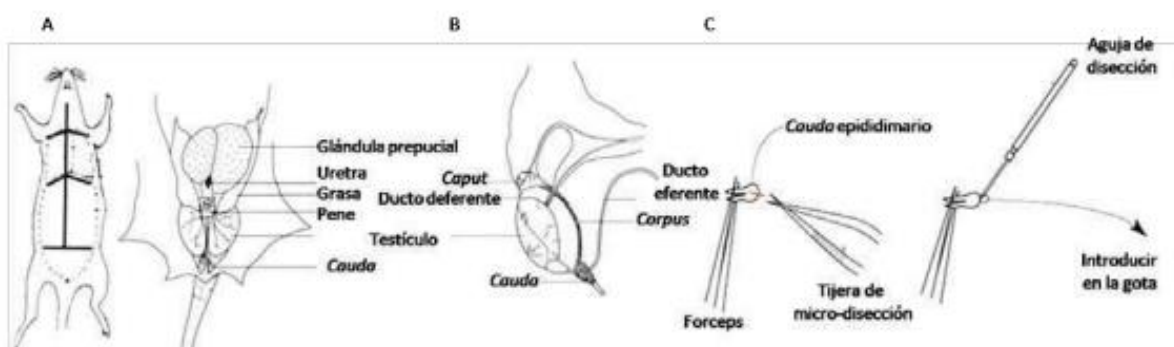


Figura 19: Esquema de la técnica empleada para obtener espermatozoides de ratón.(A) A los ratones machos sacrificados mediante dislocación cervical se les realizó una incisión transversal en el abdomen con el fin de tener acceso al epidídimo. (B) Se tira suavemente de la grasa testicular empleando pinzas, con el fin de exponer el epidídimo y, finalmente (C) cortar la cauda epididimaria. (Esquema tomado de internet).

1.4 Motilidad espermática

Para evaluar el parámetro de motilidad en las muestras de espermatozoides recuperados de las *caudas* epididimarias, se retiró una alícuota de 10 μL y se colocó entre porta y cubreobjeto para observarlos al microscopio con contraste de fase (Nikon Eclipse E200) a un aumento de 400X. El porcentaje de espermatozoides móviles se determinó como la sumatoria de espermatozoides motiles progresivos y no progresivos sobre 200 células analizadas.

1.5 Concentración espermática

Para evaluar el recuento de espermatozoides, se extrajo una alícuota de 10 μL de la suspensión de espermatozoides y se diluyó en agua (1:20) y el conteo se realizó utilizando una cámara de Neubauer (Figura 20A). El número de espermatozoides se determinó contando los espermatozoides presentes en 5 cuadrantes pequeños (Figura 20B-C) utilizando un microscopio con contraste de fase (Nikon Eclipse E200).

La fórmula utilizada para el recuento es:

$$\text{Espermatozoides/mL} = \frac{n^\circ \text{ de espermatozoides contados} * 25 * 1000 * \text{FD}}{n^\circ \text{ de cuadrantes contados} * 0,1 \text{mm}^3}$$

Considerando que: cada cuadrante grande (celeste, Figura 20B) mide 1mm x 1 mm y su profundidad es 0,1 mm, que el cuadrante central está conformado por 25 cuadrantes rojos, al factor de dilución (FD=20) en este caso y la conversión de mm^3 a mL (1000).

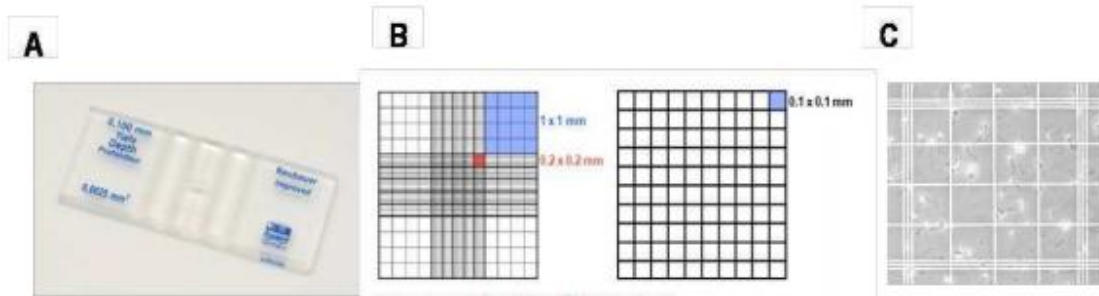


Figura 20: Cámara de Neubauer utilizada para hacer el recuento espermático. (A) Esquema de la cámara utilizada. (B) Se cuantifican los espermatozoides presentes en 5 cuadrantes rojos (los 4 de las puntas y el central). (C) Detalle de cada recuadro rojo cuantificado observado a 400X de aumento.

1.6 Descondensación *in vitro* de la cromatina espermática

Para analizar el porcentaje de descondensación espermática se utilizó una alícuota de la suspensión de espermatozoides capacitados conteniendo $8-10 \times 10^6$ espermatozoides/mL y se incubaron en un medio descondensante en presencia de 10mM de glutatión/L (GSH) y 4,6 μ mol de heparina/L, para ratón y 46 μ moles de heparina/L en humanos (Heparina 13,5 kDa, 170 IU/mg) durante 15, 30 y 60 minutos en estufa a 37°C. Como control, se incubó a los espermatozoides en presencia de GSH o heparina solos. Luego del periodo de incubación, a los distintos tiempos estudiados, se tomó una alícuota de 30 μ L y se fijó con 30 μ L de glutaraldehído al 2,5% (p/v) en PBS. Los espermatozoides se clasificaron, según la morfología de su cabeza, en 3 estadios: Sin cambio (**S**), Moderadamente descondensado (**M**) o Groseramente descondensado (**G**) (Figura 21) (Sánchez et al., 2013). Un mínimo de 200 células por tiempo y tratamiento fueron analizadas y el total de espermatozoides descondensados se calculó como la suma del porcentaje de espermatozoides del estadio M más el porcentaje de los espermatozoides del estadio G (% M+G). Esta clasificación se realizó mediante observación de la muestra en un microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200) usando un aumento de 400X.

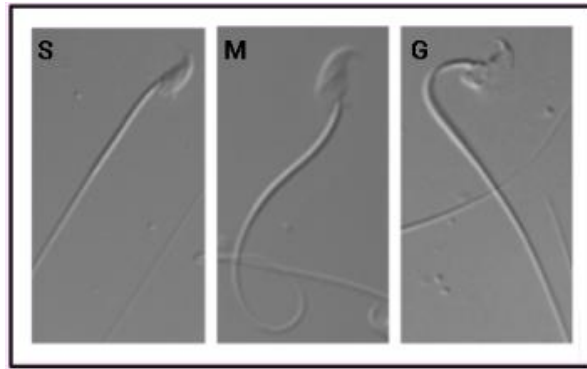


Figura 21: estadios de descondensación del núcleo espermático en el modelo murino visualizado bajo contraste de fase.) S (sin cambio), M (moderadamente descondensado), G (groseramente descondensado). Magnificación original 400X.

1.7 Análisis de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Para analizar la generación de ERO intracelular se utilizó la técnica de citometría de flujo. Previamente, se determinó la viabilidad espermática de las muestras mediante tinción de la muestra con Eosina Y (colorante de exclusión) con el fin de verificar que el porcentaje de espermatozoides vivos en el punto de partida no fuera diferente para cada grupo. Para esto, una alícuota de 5 μ L de la suspensión espermática se mezcló con igual volumen de colorante (0,5 mg/mL en PBS) y se homogeneizó. Luego, se observó al microscopio óptico a 400X y se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos (no teñidos) sobre un total de 200 espermatozoides. Luego, una alícuota de espermatozoides conteniendo 1×10^6 espermatozoides/tubo se tiñeron con el kit CellROX Green Reagent (Life Technologies Alfacene, Carcavelos, Portugal) durante 30 minutos a 37°C a una concentración final de 5 μ M. Luego, se lavaron las células con PBS para retirar el medio. Los reactivos de estrés oxidativo, presentes en este kit, son sondas fluorogénicas que permiten la medición de ERO en células vivas. Los mismos son reactivos permeables que al estar en estado reducido no fluorescen, mientras que tras su oxidación exhiben una fuerte señal fluorescente. El compuesto se une al DNA, por lo que su señal se localiza principalmente en el núcleo y las mitocondrias. Se utilizó como control de autofluorescencia una muestra de espermatozoides en ausencia del kit de tinción. Los datos se registraron como eventos de células individuales utilizando un citómetro de flujo (FACSCanto II TM, BD (Bioscience)), y se analizaron utilizando el software FlowJo v10 software (FlowJo LLC, Ashland, OR). Se utilizó un filtro de 515- 545 nm para medir la sonda

fluorescente. Los datos de “forward” (FSC) y de “side scatter” (SSC) fueron obtenidos de la colección de 10.000 eventos por muestra. La selección de la población de espermatozoides analizada, se realizó mediante la delimitación de los “gating” a fin de excluir del análisis los eventos provenientes de restos celulares o espermatozoides morfológicamente anormales. La intensidad de fluorescencia relativa se calculó como la relación entre la fluorescencia correspondiente a la sonda de las muestras (control o tratado) y la autofluorescencia de los espermatozoides.

1.8 Peso e histología testicular

Para evaluar las gónadas masculinas se sacrificaron los ratones macho y se recuperaron ambos testículos. Se pesaron y luego se fijaron en solución de Bouin durante 24 h. Luego se embebieron en parafina y se realizaron cortes de 5 μ m. Las secciones testiculares se desparafinaron por inversión en xileno dos veces, durante 10 minutos cada vez. Luego, los cortes se rehidrataron utilizando concentraciones decrecientes de alcohol, empezando por dos inmersiones de 10 minutos cada una en alcohol 100% y, luego, con inmersiones de 5 minutos en alcohol 95%, 70% y, por último, 3 minutos en PBS. Las secciones se tiñeron con Hematoxilina y Eosina usando protocolos estandarizados y los vidrios se observaron al microscopio (Eclipse Ti microscope (Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan)). Se tomaron fotografías de los cortes a 20X, 100X y 400X para realizar las mediciones mediante el uso del software Scion ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Cinco campos por testículo fueron aleatoriamente seleccionados y se analizó un promedio de 50 túbulos por animal.

1.9 Producción espermática diaria

Como parámetro de funcionalidad reproductiva se midió la producción espermática diaria (DSP, del inglés “daily sperm production”) (Johnson, Petty y Neaves, 1980). Esta técnica se basa en la resistencia a la homogeneización que poseen las espermátidas elongadas por su alta compactación (estadios 14-16). Se utilizó el protocolo establecido por Kyjovska y colaboradores, con algunas modificaciones. Un testículo por macho fue extraído y se le removió la túnica albugínea. Posteriormente fue pesado y homogeneizado en 1 mL de 0,05%

Triton X-100 en solución fisiológica durante 3 minutos a 9.700 xg. Las muestras se incubaron durante 30 minutos en hielo y, posteriormente, una alícuota de 200 μ L se incubó con igual volumen de 0,08% Trypan Blue en PBS. El número de espermátidas elongadas, visibles por el colorante, se cuantifican utilizando la cámara de Neubauer bajo microscopio a 400X determinando el número de espermátides por testículo, dividido por 4,84, que es el tiempo en días que residen las espermátides elongadas en el testículo murino; es decir, el tiempo que tardan las espermátides en desarrollarse del estadio 14 al 16 del ciclo espermatogénico. El número de espermátidas por peso de testículo (SC/g) fue calculado como el DSP/peso de testículo (g) (Kyjovska et al., 2013).

1.10 Fragmentación del DNA en células testiculares

La fragmentación del DNA se analizó mediante la técnica de TUNEL (“terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end-labeling assay”) usando el kit *in situ* Cell Death Detection Kit (Roche). Para la detección de la integridad del DNA en células testiculares las secciones de tejido fueron teñidas con el kit de TUNEL según el protocolo establecido por el fabricante. Los testículos recolectados de los ratones se fijaron en PFA al 4% durante 36 h, luego se embebieron en parafina y se cortaron secciones de 5 μ m. Se utilizó la técnica mencionada en la sección 8 para desparafinar e hidratar el tejido. Luego, los cortes de testículo fueron incubados con proteinasa K (20 μ g/mL en Tris/HCl 10 mM, pH 7,4) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, los vidrios se lavaron con PBS (2 veces, durante 5 minutos cada vez) y se incubaron con la solución de TUNEL durante 1 hora a 37°C. Como control positivo, una sección testicular se incubó con DNAsa (1500 IU/mL; Sigma) durante 10 minutos a 37°C para promover la ruptura del DNA y, luego, se incubó con el reactivo de TUNEL durante 1 hora a 37°C. Como control negativo se utilizó un corte de testículo en donde se omitió la enzima de la solución de TUNEL. Finalmente, todas las muestras se lavaron con PBS (2 veces, 5 minutos cada vez) y se incubaron con DAPI durante 5 minutos a fin de marcar los núcleos celulares. Luego, los vidrios se montaron con Vectashield H-1000 medium (Vector Laboratories). Las células de un total de 4 túbulos seminíferos por animal fueron contadas usando un microscopio invertido Olympus IX83. Se utilizó un filtro de 368-415 nm/515–530

nm y 460-495 nm/ 510-550 nm de excitación y emisión, respectivamente, para DAPI y TUNEL. Las fotos se analizaron por medio del programa Scion Image J (NIH, Bethesda, MD, USA).

1.11 Inmunocitoquímica de espermatozoides murinos

Debido a que el núcleo espermático se encuentra altamente condensado, el acceso a las proteínas unidas al DNA mediante inmunocitoquímica es más complejo de realizar que en otros sistemas biológicos. Es por esto que se utilizó el ensayo de descondensación del DNA para mejorar el acceso de los anticuerpos. Los espermatozoides capacitados ($5 \cdot 10^6$ espermatozoides/mL), se incubaron en presencia de la mezcla descondensante (Heparina 4,6 μ M y GSH 10 mM) e, inmediatamente, una alícuota de 5 μ L de esta suspensión espermática se dejó secar sobre un pocillo de un portaobjeto multiwell de 4 mm de diámetro, durante 8 minutos o menos (dependiendo del grado de descondensación espermática observado a través del microscopio). Una vez finalizada la incubación, cada pocillo se lavó con PBS y se fijó con PFA al 4% (V/V) durante 20 minutos. Las células se lavaron, luego, 3 veces (10 minutos cada vez) y se permeabilizaron con 0,5% Tritón X-100 (P/V) (Sigma-Aldrich) en PBS, y se incubaron durante 30 minutos, a temperatura ambiente, en solución de bloqueo (4% BSA (P/V) en PBS con 0,1% Tween 20 (V/V)). Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios para realizar la inmunofluorescencia: anti-H3K4me₂; anti-H3K27me₃; anti-H3K9me₂/me₃; anti-H3K4me₃ (Cell Signaling); anti-H3K9me y anti-H4K12ac (Abcam). La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4°C. Luego, se lavaron los vidrios con PBS (3 veces, 10 minutos cada vez) y se incubaron con el anticuerpo correspondiente durante 90 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: IgG anti-Rabbit-FITC y IgG anti-Mouse-FITC (Sigma). En los controles de isotipo se omitió el uso del primer anticuerpo. Los anticuerpos primarios fueron utilizados en dilución 1:100, y los secundarios en dilución 1:200 en PBS-SCAN (suero normal de cabra) 4% (V/V). Los núcleos se tiñeron con DAPI durante 5 minutos y los vidrios fueron montados con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las células fueron observadas con un microscopio invertido Olympus IX83 a 60X de aumento y se utilizó un filtro de 368-415 nm/515–530 nm y 460-495 nm/ 510-550 nm de excitación y emisión, respectivamente. Un total de 100 células por cada modificación de histona analizada fueron contadas por animal. Las fotos se analizaron por medio del programa Image J (NIH, Bethesda, MD, USA).

1.12 Apareos y cría de ratones F1

El consumo de alcohol de los machos tratados se suspendió al día 12. Luego, de dos días de consumir solo agua *ad libitum*, los ratones macho tratados (n = 20) y control (n = 20) se aparearon con hembras no tratadas (60 días de edad, peso corporal medio de 20 g, que no habían consumido etanol y no tenían acceso al mismo). Luego de 24 h se inspeccionó a las hembras para detectar la presencia de un tapón vaginal. La presencia de tapón vaginal fue evaluada como cópula positiva y día 1 de gestación. Se asignaron ocho hembras a cada grupo y se alojaron cuatro hembras por jaula durante los primeros 17 días de gestación. Luego fueron aisladas hasta el parto. Recibieron comida estándar para ratones y agua de filtro *ad libitum*. No se encontraron diferencias en la duración del período gestacional entre ambos grupos (datos no mostrados). Las crías fueron destetadas el día 21 postnatal y enjauladas según su sexo.

2. MODELO HUMANO

2.1 Obtención de muestras de semen de donantes normozoospermicos

Los donantes fueron individuos sanos, sin antecedentes de problemas de fertilidad conocidos, con declaración de no pertenecer a grupos de riesgo o potencialmente portadores de virus de Hepatitis B o HIV, según su leal saber y entender, tal como se desprende del consentimiento informado que deben firmar y se les aseguró la confidencialidad de datos y el uso exclusivo de las muestras para los experimentos aquí detallados. Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación, luego de 48 horas de abstinencia sexual. Para este proyecto se cuenta con la aprobación del comité de ética del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME).

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

Parámetros analizados	
Volúmen	>1.5 mL
Viabilidad	> 58%
Motilidad	> 40 %
Concentración	> 15x10 ⁶ espermatozoides/mL
Cantidad total de espermatozoides por eyaculado	39x10 ⁶ espermatozoides

2.2 Selección de pacientes

Las muestras de pacientes infértiles fueron provistas por la clínica de fertilidad PROCREARTE, de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión elaborados oportunamente. Se trató de parejas con indicación de realizar un procedimiento de FIV/ICSI, con ovocitos propios o donados y cuyas mujeres presentaran cavidad uterina normal. Como único requisito se solicitó que la muestra de esperma a utilizar tuviera una cantidad suficiente de espermatozoides requerida para la realización de los experimentos a llevar a cabo, por lo cual se excluyó del estudio a los pacientes varones con oligozoospermia grave. En todos los casos, los pacientes firmaron un consentimiento informado, permitiendo el uso de las muestras de semen en proyectos de investigación.

2.3 Procesamiento de las muestras

Una vez obtenidas las muestras de semen de donantes y pacientes infértiles, se dejaron en estufa a 37°C permitiendo la licuefacción del semen y se procesaron dentro de la hora de obtención. Las muestras de semen se analizaron según los lineamientos de la OMS (WHO, 2010) para determinar los parámetros clásicos del espermograma (volumen, concentración y motilidad) ya detallados para la evaluación de espermatozoides murinos en la sección (1.4 y 1.5) de Materiales y Métodos y, luego, se procesaron según correspondiera para llevar a cabo los ensayos que se describen a continuación (en las muestras de pacientes infértiles los parámetros de concentración y motilidad se analizaron post capacitación).

2.4 Selección de espermatozoides móviles y capacitación en muestras de donantes normozoospermicos

Con el fin de obtener una fracción altamente móvil de espermatozoides, en las muestras provenientes de donantes normozoospermicos se llevó a cabo la técnica de “swim-up”. Para ello, se colocó 1mL de medio HTF-26B (Human Tubal Fluid suplementado con 26 mg de BSA/mL) por tubo. Luego, se introdujo en cada tubo y hasta el fondo, la pipeta cargada con 500 μ L de muestra y se descargó suavemente para evitar turbulencias. Los tubos se colocaron en una gradilla con una inclinación de 45° y se incubaron en estufa a 37°C, bajo atmósfera de 5% de CO₂ en aire, durante 90 minutos permitiendo, de esta manera, que los espermatozoides móviles pudieran nadar hacia el medio. Posteriormente, de cada tubo se recuperó cuidadosamente 1 mL del sobrenadante, a fin de seleccionar a los espermatozoides móviles. Se los centrifugó para remover el plasma seminal y el pellet se llevó a una concentración aproximada de 7×10^6 espermatozoides/mL, con medio HTF-26B. Finalmente, se los incubó en condiciones capacitantes durante 18 h en estufa a 37°C, bajo atmósfera de 5% de CO₂ en aire.

2.5 Selección de espermatozoides móviles y capacitación en muestras de pacientes infértiles

Con el fin de obtener una fracción altamente móvil de espermatozoides en las muestras provenientes de pacientes infértiles, la muestra se procesa 1 h después de la recolección para permitir el proceso de licuefacción. Posteriormente se separaron los espermatozoides móviles usando una solución de densidad de doble gradiente (ISolate®, Irvine Scientific Cat. No. 99264). El precipitado recuperado luego de la centrifugación se lavó mediante centrifugación con 3 ml de medio fluido tubárico humano modificado (HTF) con gentamicina – HEPES (Irvine Scientific, nº de cat. 90126) que contenía una solución de albúmina de suero humano al 5% (Irvine Scientific, nº de cat. 9988). Finalmente, se los incubó en estas condiciones durante 18 h en estufa a 37 °C, bajo atmósfera de 5% de CO₂ en aire para permitir el proceso de capacitación.

2.6 Inmunocitoquímica de espermatozoides humanos

La inmunocitoquímica de espermatozoides humanos se realizó con el mismo protocolo detallado en la sección 1.10 de Materiales y Métodos con pequeñas variaciones. Los espermatozoides humanos capacitados (5×10^6 espermatozoides/mL) se descondensaron en presencia de la mezcla descondensante utilizando mayor concentración de heparina que en el modelo murino (Heparina 46 μ M y GSH 10 mM) para facilitar la apertura de la cromatina y permitir la entrada de los anticuerpos. El resto de la metodología empleada se realizó sin modificaciones, tal como se detalló anteriormente.

2.7 Procedimiento de ICSI

Las mujeres fueron estimuladas hormonalmente comenzando con 225 UI / día de FSH recombinante (rFSH) durante 3 días. A partir del día 4, se administraron de dos a cuatro ampollas de HMG (gonadotropina menopáusica humana), que contenían 75 UI de FSH y 75 UI de LH. El desarrollo folicular se controló mediante ecografía vaginal utilizando una sonda transvaginal de 5 MHz. Cuando al menos dos folículos midieron ≥ 14 mm de diámetro medio, las pacientes recibieron 1 ampolla de antagonista de GnRH (Cetrorelix) / día. Al alcanzar un diámetro medio de ≥ 18 mm en, al menos, dos folículos, se administraron 250 μ g de hCGr (Ovidrel, Serono; inyección subcutánea) o 10.000 UI de hCG (Gonacor, Ferring; inyección intramuscular). La aspiración folicular transvaginal se realizó 34-36 h después de la recuperación de hCG. Poco después de la recuperación de los ovocitos (3-5 h), las células del *cumulus* y la *corona radiata* se eliminaron transfiriendo los ovocitos a medio HTF-HEPES modificado que contenía 1 mg de hialuronidasa / mL durante un máximo de 1 min y pipeteando con pipetas de diámetro decreciente.

Para la técnica de ICSI, se microinyectaron ovocitos con un solo espermatozoide introducido a través de la ZP en el ooplasma. Los ovocitos microinyectados fueron aquellos que habían extruido el primer cuerpo polar (estadio MII) y los ovocitos del estadio MI.

2.8 Porcentaje de fecundación

Luego de entre 16 y 18 horas post inseminación se examinan los ovocitos mediante microscopía a 400X y se cuantifica el total de ovocitos fecundados (aquellos que evidencian la presencia de 2 pronúcleos). Para calcular el % de fecundación se cuantificó la relación entre ovocitos fecundados/ ovocitos totales.

2.9 Puntaje de calidad embrionaria

El día 3 después de la inseminación de ovocitos, se evaluó la calidad de los embriones teniendo en cuenta el número de células acorde al tiempo de fecundación y la simetría y tamaño de las mismas, la presencia de fragmentos citoplasmáticos anucleados unidos a las membranas celulares, de multinucleación celular y vacuolas celulares. En base a estos parámetros se asignó un número del 1 al 3 a cada embrión siendo el puntaje 1 para la mejor calidad, 2 para una calidad aceptable y, 3 para la peor (Tabla 1).

Tabla 1: Consenso del sistema de puntuación de embriones según la etapa de clivaje (además del número de células). (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology)

Grado	Descripción
1	<ul style="list-style-type: none"> ● < 10% de fragmentación ● Tamaño celular específico al estadio ● Ausencia de multinucleación
2	<ul style="list-style-type: none"> ● 10-25% de fragmentación ● Tamaño celular específico al estadio en la mayoría de las células ● Ausencia de multinucleación
3	<ul style="list-style-type: none"> ● > 25% de fragmentación (severa) ● Tamaño celular no acorde al estadio ● Evidencia de multinucleación

Como medida de la calidad embrionaria general para cada paciente, se calculó un puntaje de calidad del embrión como el promedio ponderado del número de embriones en cada categoría tal como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Calidad embrionaria} = [(n^\circ \text{ de embriones de calidad 1}) * 1 + (n^\circ \text{ de embriones de calidad 2}) * 2 + (n^\circ \text{ de embriones de calidad 3}) * 3] / n^\circ \text{ total de embriones}$$

3. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.) y los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM). El nivel de significancia se estableció en 5% ($\alpha = 0.05$). Todos los conjuntos de datos se probaron primero para determinar la distribución normal y logarítmica normal utilizando la prueba de Kolmogorov Smirnov. Aquellos con una distribución logarítmica normal se sometieron a una transformación logarítmica normal antes del análisis estadístico.

Las diferencias entre los grupos control y tratados (en el modelo murino) y donantes y pacientes (en el modelo humano) se evaluaron utilizando pruebas t de Student no aparejadas para datos paramétricos o pruebas U de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Las diferencias en la morfometría de los testículos y el ensayo TUNEL se evaluaron mediante la prueba T anidada, también llamada ANOVA anidado de dos vías o ANOVA jerárquico. En resumen, se ajusta a un modelo de efectos mixtos con el factor principal (en nuestro caso, Tratamiento) como factor fijo y el factor anidado (camada o individuo) como factor aleatorio. Para las el análisis de correlación en el modelo humano se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

Capítulo I. Estudio del efecto del consumo directo de alcohol sobre diferentes aspectos de calidad espermática y el efecto indirecto de estos parámetros en la descendencia masculina, en modelo murino.

En este capítulo se evaluó el efecto del consumo de alcohol sobre distintos parámetros asociados a la funcionalidad espermática tanto en los padres que fueron sometidos al consumo de alcohol, como en su descendencia masculina, la cual nunca estuvo expuesta a esta sustancia.

INTRODUCCIÓN

Consumo y metabolización del etanol

El etanol es una de las sustancias más consumidas en el mundo, cuyo abuso genera importantes problemas médico-sociales (Ceccanti et al., 2007; Mancinelli et al., 2007; Aragón et al., 2008). Como toxina, el etanol puede producir daño en diversos órganos del cuerpo.

Las tasas de infertilidad están aumentando y afectando a todas las especies. Un factor que se cree que está impulsando este aumento en las tasas son las condiciones ambientales antes de la concepción. Si bien cualquier exposición tiene el potencial de afectar negativamente los resultados de salud, hay períodos sensibles durante los cuales las exposiciones pueden tener un efecto amplificado y duradero (Marcho et al., 2019).

La integridad del núcleo espermático puede verse afectada por la exposición a tóxicos afectando la fecundidad masculina. Las exposiciones más comunes incluyen disruptores o tóxicos endocrinos provenientes de pesticidas o herbicidas, metales pesados, desechos industriales, estilos de vida, estrés y consumo de sustancias (incluyendo al alcohol) que, al afectar la integridad espermática, alteran con ella las marcas epigenéticas que pueden tener un fuerte impacto sobre la reproducción (Giacone et al., 2019).

Un estudio realizado sobre el análisis de fluido seminal y nivel hormonal realizado en muestras de hombres que tenían síndrome de dependencia al alcohol, revelaron niveles reducidos de testosterona y del volumen del fluido seminal y concentración espermática respecto a los controles Muthusami et al. (2005). Encontraron también, que los niveles de FSH, LH y E2 estaban significativamente aumentados y, al igual que se observó en otros trabajos, demostraron que el volumen seminal, la concentración de espermatozoides, la motilidad y el número de espermatozoides morfológicamente normales estaban disminuidos.

Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* mostraron un efecto tóxico del etanol en las células de Leydig influyendo sobre los niveles de testosterona y su volumen celular (Hansen, 2012). En

este mismo trabajo también se concluyó que la ingesta de alcohol se asoció con el deterioro de la mayoría de las características del semen, pero sin un patrón coherente de dosis-respuesta. A su vez, varios estudios clínicos y experimentales han reportado que el consumo de etanol es un factor de riesgo potencial para la infertilidad masculina, afectando el sistema reproductivo a tres niveles: sistema hipotálamo-hipofisario-gonadal, glándulas endocrinas y hormonas (Anderson 1981; Gabriel et al., 1998; Zhang et al., 2005; Lan et al., 2006) (Figura 22). Principalmente afecta el metabolismo de testosterona y la espermatogénesis (Sansone et al. 2018).

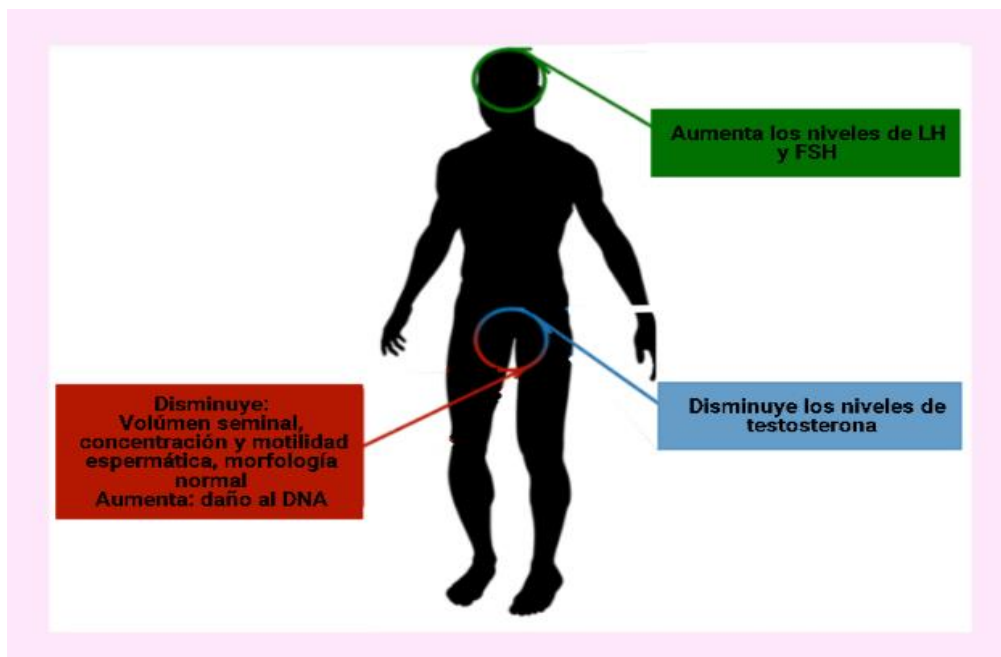


Figura 22: Efectos del abuso de etanol. Alteración a nivel del espermograma y a nivel hormonal en los hombres (Adaptado de Sansone et al., 2018).

El proceso de espermatogénesis es el resultado de una interacción compleja entre factores endocrinos, paracrinicos y autocrinos. Varias condiciones adquiridas y congénitas podrían alterar los finos mecanismos implicados en la espermatogénesis. Entre las causas no genéticas de infertilidad masculina, el estrés oxidativo generado por una producción exagerada de especies reactivas de oxígeno (ERO) es quizás el factor más común. A su vez, las ERO son necesarias para la capacitación, la RA y la fecundación, pero un desbalance en las mismas

puede inducir daño al DNA y la integridad de las membranas, lo que reduce el potencial fecundante del espermatozoide (Sansone et al., 2018).

Los RL son una especie química que posee la característica de tener un electrón desapareado. Se forman durante las reacciones químicas a partir de la ruptura de otras moléculas y son en general inestables y de gran poder reactivo (Hicks Gómez, 2001).

El etanol puede ser metabolizado en varios órganos incluyendo el estómago, el intestino delgado y el cerebro, sin embargo, la mayor parte se lleva a cabo en el hígado, por medio de sistemas oxidativos presentes en las células.

El etanol es catalizado, en primer lugar, por la enzima citosólica alcohol deshidrogenasa (ADH) que principalmente se encuentra presente en el hígado, aunque se ha reportado su presencia en pequeñas cantidades en el tracto gastrointestinal, riñón, páncreas, corteza cerebral, cerebelo, hipotálamo, testículos, ovario y útero (Crabb et al., 1987). Esta enzima cataliza la transformación del etanol en acetaldehído y NADH requiriendo para el proceso la presencia de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) como cofactor. Estos productos de reacción son los responsables principales de los efectos tóxicos del etanol. El acetaldehído producido difunde al interior de las mitocondrias donde por acción de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) es oxidado a acetato (Crabb et al., 1987). La mayoría del acetato producido circula por la circulación hacia los tejidos periféricos, donde se activa a acetilCoA (Figura 23).

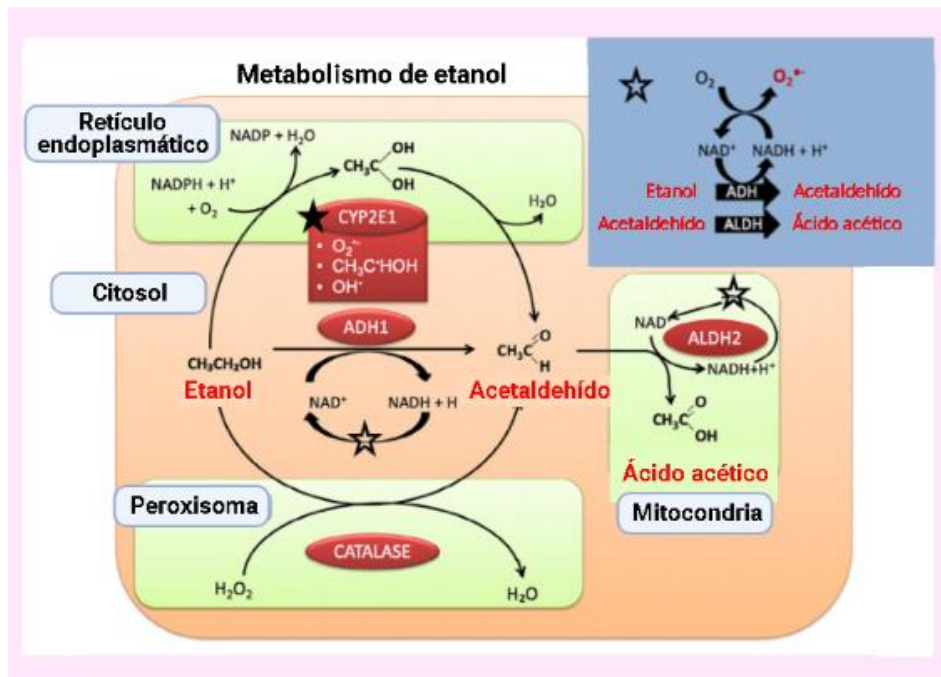


Figura 23: Cascada de metabolización del etanol y formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). El etanol es metabolizado oxidativamente principalmente por CYP2E1, ADH1 o catalasa en diferentes compartimientos subcelulares. Las reacciones que producen directamente ERO potencialmente tóxicos (incluidos aniones superóxido, radicales hidroxilo y radicales libres) se indican con una estrella negra. Las reacciones que producen ERO indirectamente a través del reciclaje del cofactor enzimático NADH se indican con una estrella abierta (Adaptado de Bhatia S. et al., 2018).

A su vez, durante la metabolización del etanol se originan moléculas oxidantes altamente reactivas, las ERO (Figura 23), que como ya se mencionó, son compuestos sumamente agresivos en su forma de reaccionar (Wu y Cederbaum, 2003). Se produce un desequilibrio en la proporción de NAD^+/NADH tanto citosólico como a nivel mitocondrial, que tiene como consecuencia efectos importantes sobre otras vías metabólicas al interactuar con otras macromoléculas.

El etanol también altera la composición lipídica y proteica de las membranas celulares, disrumpe las interacciones entre lípidos y proteínas, genera alteraciones permanentes en la conformación de ciertas proteínas (Waring et al., 1982). Young y colaboradores (2006) demostraron que el consumo crónico de etanol provoca una disminución de la producción de ATP tanto mitocondrial como glicolítica en hepatocitos.

La velocidad de absorción del alcohol depende, en gran medida, de la cantidad de agua en el organismo y las variaciones en la tasa de metabolización del etanol entre los individuos también están dadas por el patrón de consumo y el grado de ayuno, haciendo que la concentración de alcohol en sangre esté determinada por la cantidad de etanol consumido y la presencia o ausencia de alimento en el estómago. De esta manera, los alimentos ingeridos influyen en la cantidad y velocidad de alcohol que puede absorber el organismo (Crabb et al., 1987). La concentración de etanol en los tejidos es particular de cada tejido y depende del contenido de agua, la velocidad del flujo sanguíneo y la masa del tejido (Cederbaum, et al., 2012).

Además, la velocidad de eliminación del etanol se relaciona con el peso del animal, por lo que los animales de menor peso corporal eliminan el etanol más rápidamente que los de mayor peso. Las tasas de metabolización correlacionan con la tasa metabólica basal de la especie, por lo cual la velocidad de metabolización del etanol es la misma que la velocidad de metabolización de cualquier otro nutriente consumido por el animal (Salaspuro y Lieber 1978; Morgan y Levine 1988; Lieber 1991; Addolorato et al. 1997).

El etanol posee un alto valor calórico, pero, a diferencia del resto de los nutrientes que se consumen en la dieta, no puede ser almacenado, por lo cual permanece en el cuerpo hasta que es eliminado. Esta eliminación no está bajo regulación hormonal.

Efectos del consumo de alcohol sobre la línea germinal masculina

La barrera hematotesticular representa una barrera física que impide el pasaje de sustancias hacia la línea germinal. La misma está formada por las células de Sertoli que forman entre ellas uniones estrechas, creando una barrera entre el compartimiento basal externo, que entra en contacto con la sangre, y el compartimiento adluminal interno (Dym y Fawcett, 1970; Russell, 1977). Sin embargo, la misma no es totalmente impermeable, lo que ocasiona que las células germinales sean vulnerables en ciertas condiciones.

La exposición al etanol en los roedores ha sido asociada con una reducción del peso testicular, que puede ser ocasionada por la disminución de los niveles de testosterona y la menor producción de espermatozoides (Cicero et al., 1990; Willis et al., 1983). Esto mismo se ha observado en humanos (Muthusami y Chinnaswamy, 2005). Se encontraron alteraciones en los niveles de LH y FSH, pero los resultados no son consistentes entre los estudios realizados

en roedores y humanos. Estas hormonas regulan los niveles de testosterona y por ende la función testicular. Tanto el aumento, como la disminución de las mismas, está asociado a alteraciones en la concentración, motilidad y fragmentación del DNA espermático (Zeid y Gould, 2020).

Se ha observado un aumento en la cantidad de espermatozoides con anomalías en los machos expuestos al consumo de etanol en roedores y humanos. Estas anomalías incluyen malformaciones, fallas en la motilidad y daño al DNA. Sin embargo, se han observado contradicciones entre diferentes estudios realizados (Zeid y Gould, 2020). En este contexto, los estudios de dosis-respuesta sugieren que el efecto podría depender de la dosis en los roedores o la condición de abuso de sustancia en los humanos (Anderson et al., 1983; Sánchez et al., 2018).

Distintos estudios sugieren que el etanol aumenta el estrés oxidativo en los espermatozoides de animales intoxicados (Maneesh et al., 2006; Harikrishnan et al., 2013). Tal como se mencionó anteriormente, el etanol puede elevar los niveles de ERO en los espermatozoides, pudiendo ocasionar daño en la membrana celular de los mismos y en el DNA produciendo daños funcionales afectando, entre otras cosas, la motilidad (Kumar et al., 2014). Las ERO ocasionan alteraciones a nivel del espermatozoide, probablemente porque los mismos carecen de compuestos antioxidantes, que son sustancias que retardan o previenen la oxidación de sustratos oxidables (Gutteridge y Halliwell 1989). Esto lo logran cediendo electrones a los RL quedando entonces como RL débiles, pero de naturaleza no tóxica. A pesar de no contar con otros antioxidantes citosólicos, los espermatozoides poseen sistemas celulares “electron scavengers” que contienen antioxidantes no enzimáticos como el GSH (Hsu et al., 1964) y el ácido ascórbico (Sharma et al., 1964), entre otros. A su vez, poseen enzimas sensibles al estado redox de la célula como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSH-PX). Así se previene la peroxidación de las membranas, se detoxifica a la célula de compuestos oxidados contribuyendo al estado redox de la célula (Baker y Aitken 2004). Muchos estudios han indicado la relación entre el estrés oxidativo y el daño al DNA (Cummings y Thorgaard 1994; Twigg et al., 1998; Donnelly et al., 1999). Este daño podría ser generado a nivel testicular, del epidídimo o post- eyaculación (Saleh et al., 2003; Aitken y Sawyer 2003; Aitken et al., 2003). Se observó, a su vez, que el etanol afecta a los testículos y a los espermatozoides mediante un mecanismo de peroxidación lipídica (Siervo et al., 2015).

En un estudio preliminar realizado en nuestro laboratorio, se evaluó el efecto del consumo moderado de alcohol en el modelo murino y se observó que los espermatozoides provenientes de animales que consumían alcohol al 15% *ad libitum* durante 15 días, presentaban una tasa de descondensación espermática incrementada respecto de aquellos animales que no habían sido expuestos al consumo de alcohol. Asimismo, se observó que los espermatozoides presentaban una hiperactivación de la motilidad disminuida al igual que el porcentaje de espermatozoides reaccionados respecto a los controles. También se observó que los espermatozoides provenientes de ratones que habían sido expuestos al consumo de etanol poseían mayores porcentajes de espermatozoides con morfología anormal tanto en cuello como cabeza y cola. En este mismo trabajo se observó que el consumo de alcohol aumentaba la cinética de fecundación luego de un procedimiento de FIV (fecundación *in vitro*) (Sanchez et al., 2018).

El consumo de etanol también se asoció con un incremento en los niveles de β -endorfinas que pueden producir daño a nivel testicular e inducir apoptosis en los espermatozoides. En ese estudio se inyectó etanol intraperitonealmente y se observó muerte celular en la línea germinal y disminución de los niveles de testosterona en plasma e intratesticular de ratones adultos (Jana, 2010). En este mismo estudio se observó mediante Western blot una disminución de los niveles de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) y de la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD) y niveles aumentados de la expresión de la caspasa-3 activa, p53, Fas y Fas-L.

En el modelo murino, se observó que el consumo de etanol impacta sobre las poblaciones de mRNA y los sRNA (small non-coding RNA) incluyendo a los sRNA mitocondriales, los microRNA (miRNA) y los tRNA derivados de pequeños RNA (tDRs) (Rompala et al., 2018).

El consumo de etanol se asoció con alteraciones en el nivel de mensajeros de metiltransferasas en espermatozoides que provoca errores en la metilación del DNA (Bielawski et al., 2002). También se ha visto que hay alteraciones a nivel de la metilación del DNA en espermatozoides de humanos (Ouko et al., 2009) asociados al consumo de etanol. En este trabajo también se observó que la región reguladora del gen H19 se encontraba hipometilada al igual que las regiones génicas de DLK1 y GTL2 que son dos factores de crecimiento que están hipermetilados generalmente en la línea germinal masculina. En otros trabajos se reportó hipometilación de las islas CpG de estos mismos genes, que puede afectar el crecimiento fetal y la diferenciación celular (Cleaton et al., 2016; St-Pierre et al., 2012).

La literatura reciente ha mostrado que el etanol induce cambios epigenéticos en el DNA que pueden ser responsables de efectos transgeneracionales en los ratones (Knezovich y Ramsay 2012). Así como también se ha visto que la exposición crónica al etanol en los ratones afecta la metilación génica en los espermatozoides afectando esas marcas que son transmitidas a la descendencia, reportándose efectos en desórdenes mentales (Liang et al., 2014) y que, aún con concentraciones de etanol que no inhiben el crecimiento embrionario, pueden producir anomalías genético-cromosómicas en las gametas.

Efecto intergeneracional del consumo de alcohol

Existe una gran cantidad de trabajos publicados que estudian el efecto del consumo de etanol dentro de los que se puede incluir el efecto teratogénico del mismo. Se vió, mediante estudios clínicos y epidemiológicos, que el etanol posee efectos teratogénicos que incluyen retardo mental, anormalidades en el desarrollo y del comportamiento (Streissguth et al., 1980). A su vez, se ha estudiado extensamente el efecto del consumo de etanol materno durante la gestación, cuya manifestación más severa es el síndrome de alcoholismo fetal (FAS, del inglés “Fetal Alcohol Syndrome”) que fue descrito por Jones y Smith (1973) en donde se reportan defectos comunes entre niños nacidos de madres alcohólicas en Francia (Hill et al., 1989).

El tiempo y el consumo de etanol durante la gestación no pueden explicar la variabilidad observada entre los distintos individuos afectados, por lo cual se cree que la vulnerabilidad fetal está determinada por eventos genéticos propios de cada individuo.

Los efectos del consumo de etanol por parte de la madre están ampliamente estudiados y documentados en muchos trabajos (Larkby y Day 1997; Marjonen et al., 2015). Sin embargo, los efectos que posee el consumo paterno de etanol sobre el desarrollo fetal no están del todo claros al igual que los mecanismos a través de los cuales podrían tener dichos efectos. Se cree que las consecuencias en la descendencia podrían producirse a través de daños a nivel del DNA en los espermatozoides o a través de modificaciones en los mecanismos epigenéticos heredables. A su vez, se ha visto que el etanol posee efectos sobre la impronta genética a través del proceso de metilación génica (Stouder et al., 2011).

Existe en la literatura mucha evidencia que apunta a la herencia multigeneracional y transgeneracional mediada por la línea germinal, lo cual ha renovado el interés del estudio del impacto que genera la exposición a las drogas en la línea germinal. Se ha observado que

la exposición al consumo por parte de los padres, de etanol, cocaína, nicotina, entre otros, antes de la concepción puede generar alteración del fenotipo en la descendencia (Zeid, y Gould, 2020). Si bien se sabe y se ha estudiado extensamente que el consumo de drogas impacta sobre las funciones reproductivas y la integridad de las gametas, no se sabe demasiado qué consecuencias puede tener sobre la herencia multi/transgeneracional y si los cambios biológicos causados por el consumo de las mismas poseen efectos independientes, aditivos o secuenciales sobre la herencia.

Para empezar a hablar de herencia, debemos hacer referencia a que la información genética que es transmitida por los padres a la descendencia determina la herencia de rasgos a través de las generaciones. Sin embargo, hay variaciones fenotípicas heredables que no son explicables mediante la clásica herencia Mendeliana (Richards, 2006; Daxinger y Whitelaw, 2012; Miska y Ferguson-Smith, 2016). Esta regulación génica está determinada por modificaciones covalentes del DNA, por MPT de histonas asociadas al DNA y por diversas especies de RNA que pueden ser transmitidas de las gametas a los cigotos. Estos son llamados factores epigenéticos, dado que son modificadores de la expresión de la información genética presente en la secuencia del DNA, sin modificar la secuencia en sí misma.

Pero hablar sobre epigenética, también requiere de la contextualización de la palabra. Para empezar, la definición más común de la palabra es la traducción inversa de la misma: 'epi' (sobre, arriba, más allá) y 'genética' (secuencia de DNA), que en conjunto se refiere a una capa de información que existe más allá de la codificada en la secuencia de DNA, haciendo que el genoma funcione de manera distintiva en diferentes tipos de células. Esta definición abarca todas las modificaciones de la cromatina y del DNA (exceptuando las mutaciones) y otros reguladores de la transcripción que actúan en el contexto de la cromatina (Greally, 2018).

A su vez, al hablar de herencia podemos hablar de eventos multigeneracionales/ intergeneracionales o transgeneracionales, que se refieren a alteraciones del fenotipo de los organismos como consecuencia de la exposición al ambiente de los progenitores (Skinner y Guerrero-Bosagna, 2009). La diferencia radica en que la herencia multigeneracional ocurre en la primera generación, concebida a partir de los progenitores expuestos a los determinantes ambientales, mientras que la herencia transgeneracional se define más estrictamente como una continuación de la herencia multigeneracional más allá de la generación expuesta más recientemente. Por este motivo, para los padres expuestos (F0), la herencia multigeneracional puede ocurrir a partir de la generación F1, que técnicamente también está

expuesta a través de la línea germinal F0, y la herencia transgeneracional se refiere a la generación F2 y más allá. Para las madres, la herencia multigeneracional comienza en la generación F2, ya que tanto la generación F1 como su línea germinal están expuestas al entorno uterino F0 durante la gestación (Figura 24) (Zeid, y Gould, 2020).

A diferencia del genoma, los mecanismos epigenéticos son sensibles a las perturbaciones ambientales. Se ha visto que el consumo de etanol tiene diversas consecuencias epigenéticas en las células somáticas y la línea germinal (Chastain y Sarkar, 2017) que puede interferir con el desarrollo embrionario y, posteriormente, en la vida adulta de las generaciones siguientes (Finegersh et al., 2014).

En la literatura, se ha observado que el consumo de etanol provoca un aumento de la metilación del gen *Peg3* y una reducción de la metilación del gen *Bdnf* en los espermatozoides, que están involucrados en el desarrollo del cerebro fetal (Finegersh y Homanics, 2014; Liang et al., 2014). A su vez, se observó en los roedores, que el efecto del consumo de etanol sobre el funcionamiento espermático puede impactar sobre la capacidad fecundante de los mismos y tener consecuencias sobre el tamaño de la camada. A su vez, cambios en los fenotipos comportamentales, relacionados también a la herencia multi/ transgeneracional afectada por el consumo de etanol puede verse alterada también por el tamaño de la camada (LaBarba et al., 1973; Tanaka, 1998). El consumo paterno de etanol, se asoció en varios trabajos con una reducción del tamaño de la camada en roedores (Cicero et al., 1990; Liang et al., 2016; Meek et al., 2007) y con la reducción del peso de la descendencia (Abel y Tan, 1988; Knezovich y Ramsay, 2012). La fragmentación del DNA en espermatozoides puede producir en la descendencia alteraciones en el proceso de aprendizaje y comportamientos, relacionados con ansiedad (Fernández-Gonzalez et al., 2008). Estos comportamientos han sido observados en la descendencia de machos expuestos al consumo de etanol mediante herencia multi/transgeneracional (Abel y Moore, 1987; Wozniak et al., 1991). Así, el consumo de sustancias que altera la fragmentación del DNA podría ser responsable de afectar directamente los fenotipos de la progenie. Sin embargo, se desconoce si la exposición al etanol produce daños al DNA espermático de manera sistemática y/o si este daño ocasionado es suficientemente grave como para afectar el desarrollo de la descendencia (Zeid y Gould, 2020).

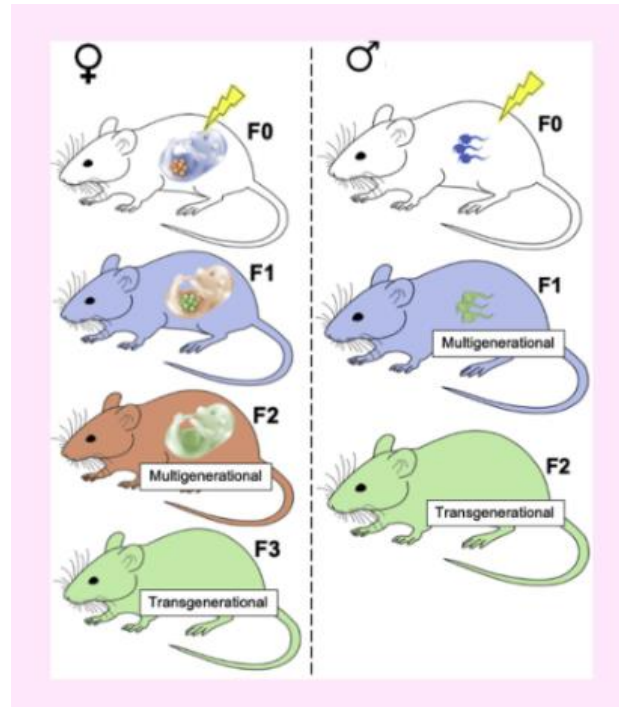


Figura 24: Herencia multi/transgeneracional. Panel izquierdo: se observa la herencia materna multi/transgeneracional en la línea femenina. La exposición se produce en la generación F0 (ratón blanco) y se observa que la generación F1 (feto azul) y su línea germinal en desarrollo (naranja), también están expuestas. La generación F1 gesta la generación F2 (feto naranja), cuya línea germinal (verde) produce la generación F3. El fenotipado multigeneracional comienza en la generación F2 (ratón naranja), que se deriva de la línea germinal del ratón F1 originalmente expuesto (feto azul, línea germinal naranja). El fenotipado transgeneracional comienza en la generación F3 (ratón verde), que es el primero que no tuvo contacto directo (a través de la gestación o la línea germinal) con la exposición original. La exposición original no necesita necesariamente ocurrir durante la gestación F0, ya que cualquier exposición antes del embarazo puede alterar crónicamente el ambiente uterino u otros parámetros del embarazo y, como consecuencia, el desarrollo de F1. Panel derecho: herencia paterna multi/ transgeneracional en la línea masculina. La exposición ocurre en la generación F0 (ratón blanco), exponiendo directamente la línea germinal (azul), que produce la generación F1. La herencia multigeneracional comienza en la generación F1 (ratón azul), que se deriva de la línea germinal F0. La línea germinal F1 (verde), que produce la generación F2, nunca entra en contacto con la exposición original. Por tanto, el fenotipado transgeneracional comienza en la generación F2 (Adaptado de Zeid y Gould, 2020).

Se observaron cambios asociados a las poblaciones de RNA como resultado de la exposición al etanol que pueden impactar sobre el desarrollo de manera multigeneracional, modulando los programas de desarrollo temprano. Kim et al. (2014) encontraron un incremento en la metilación de los genes de los transportadores de dopamina, en los espermatozoides de los ratones expuestos al etanol que se asoció a un menor consumo por parte de la descendencia. Las modificaciones epigenéticas ocasionadas por la exposición al etanol pueden, potencialmente, conducir a la expresión de fenotipos multi/transgeneracionales; sin embargo, debido a que los genes involucrados en el desarrollo son pleiotrópicos en su mayoría y permanecen activos durante toda la vida, es difícil predecir sus efectos posteriores sobre el fenotipo de la descendencia. Los datos brindados por múltiples estudios parecerían indicar que el consumo paterno de etanol, previo a la concepción, tendría un efecto selectivo sobre el comportamiento y el funcionamiento neuronal en la descendencia, aunque se necesitan pruebas adicionales y completas de la fisiología de las crías (Zeid y Gould, 2020)

En nuestro laboratorio, observamos en las crías de los machos expuestos al consumo de etanol, un retraso en la diferenciación embrionaria, mostrando una alteración morfológica del trofoblasto y el macizo celular interno que podrían impedir la correcta implantación de estos embriones luego de realizar apareos *in vivo* (resultados aún no publicados) (Figura 25).

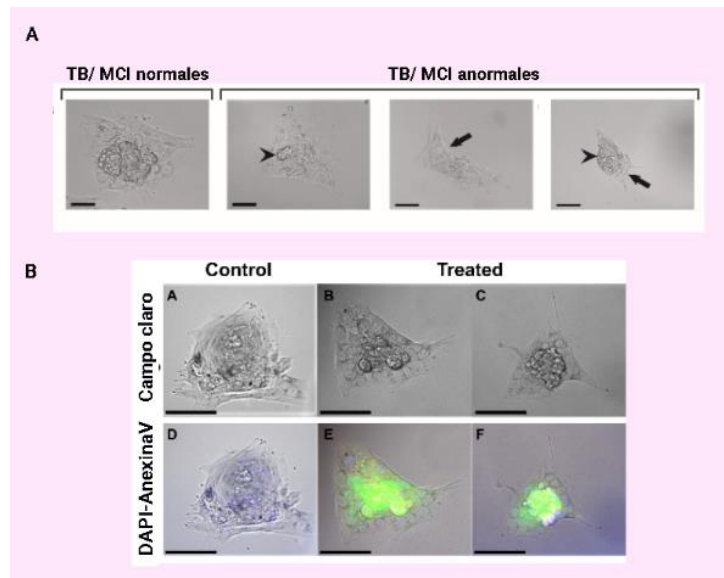


Figura 25: Desarrollo embrionario de embriones de dos células de grupos de control o tratados cultivados durante 7 días. (A) Imágenes representativas del crecimiento embrionario normal o anormal en los embriones provenientes de animales tratados. Las flechas y puntas de flecha muestran las formas de MCI y TB anormales. (B) Los embriones se marcaron con anexina V-FITC (verde) y DAPI (azul). Imágenes microscópicas de campo brillante (B: A, B y C) y de fluorescencia (B: D, E y F). Barra de escala, 100 μ m. Aumento original 400X.

La exposición al consumo de sustancias, incluyendo al etanol, pueden incorporar o modificar marcas epigenéticas dentro de las células germinales masculinas en desarrollo y ocasionar errores en la transmisión de información que conduzca a disminuir el % de fecundación, disminuir el potencial de desarrollo y afectar la salud de la descendencia. Por lo tanto, es importante considerar la exposición ambiental masculina durante la ventana previa a la concepción (Marcho, 2019).

Hipótesis y objetivos

El consumo de etanol está ampliamente extendido y culturalmente aceptado en todo el mundo, con un amplio rango etario y existe evidencia de los efectos que el consumo materno de etanol ocasiona sobre la descendencia. Sin embargo, el efecto del consumo paterno de etanol sobre la salud reproductiva masculina y sus efectos sobre la descendencia no están del todo claros. En el modelo murino hay evidencia de que el etanol induce cambios epigenéticos en el DNA que pueden ser responsables de efectos transgeneracionales. En este contexto proponemos que el consumo paterno de etanol afecta la integridad de la línea germinal y el epigenoma espermático en ratones alcoholizados y en su descendencia masculina.

En función de la hipótesis planteada nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

- 1- Evaluar el efecto del consumo paterno de etanol sobre la línea germinal y el epigenoma espermático en ratón.
- 2- Evaluar si existe un efecto indirecto del consumo paterno de etanol sobre las gónadas y gametas de la progeie masculina a causa de la herencia transgeneracional.

Resultados

1. PADRES

1.1. Evaluación de la ingesta de etanol y la concentración de alcohol en sangre

Los machos CF1 del grupo tratado consumieron cantidades significativamente menores de alimento ($p < 0.01$) y líquido ($p < 0.0001$) que el control (Tabla 2). Sin embargo, la ingesta total de calorías fue similar para ambos grupos. Los machos tratados consumieron 7.4 g/kg/día de etanol y tuvieron un 16.1% de EDC (porcentaje de calorías derivadas del etanol, de las siglas en inglés) (Tabla 2). Los machos tratados y los controles no presentaron diferencias en su peso corporal ni al comienzo ni al final del tratamiento con etanol. Se midió la BAC y el valor en los machos tratados fue de 15 a 23 mg/dL, y no se detectó etanol en la sangre de los machos del grupo control.

Tabla 2: Evaluación del peso de los ratones y la ingesta calórica en los grupos control y tratado.

	Control	Tratado
Ingesta de comida (g/kg/día)	181.4 ± 16.8	120.0 ± 4.5**
Ingesta de líquido (g/kg/día)	182.7 ± 9.7	104.9 ± 4.8****
Calorías por comida (kcal/kg/día)	721.2 ± 66.9	477.2 ± 17.9
Calorías por líquido (kcal/kg/día)	–	105.5 ± 6.4
Calorías totales (kcal/kg/día)	721.2 ± 66.9	657.1 ± 60.52
Ingesta de etanol (g/kg/día)	–	7.4 ± 0.9
% EDC	–	16.1
Peso corporal inicial (g)	40.3 ± 0.9	40.1 ± 0.8
Peso corporal final (g)	42.6 ± 0.7	40.4 ± 0.8

** $P < 0.01$

**** $P < 0.0001$

Se midió la ingesta diaria de alimentos y líquidos (g o mL/kg/día) y el peso corporal (g) durante los 12 días de administración de etanol al 15% v/v, tanto en los machos control como en los tratados. Las calorías totales se calcularon a partir del consumo de alimentos y etanol (kcal/kg/día). La ingesta media de etanol se expresa en g/kg/día y se informa el % EDC (porcentaje de calorías derivadas del etanol, de sus siglas en inglés). Los valores se expresan como media ± e.e.m. Test t de Student, 10 animales por grupo.

1.2. Efecto del consumo de etanol sobre los parámetros espermáticos

Dentro del testículo se ha reportado la presencia de enzimas capaces de metabolizar el etanol, cuya consecuencia final podría estar asociada a alteraciones en la calidad espermática. Con el fin de evaluar si el consumo de etanol afectaba la calidad espermática, se evaluaron los parámetros de motilidad y concentración espermática en los espermatozoides de ratones controles y tratados, sin observarse diferencias significativas entre los dos grupos analizados (Figura 26)

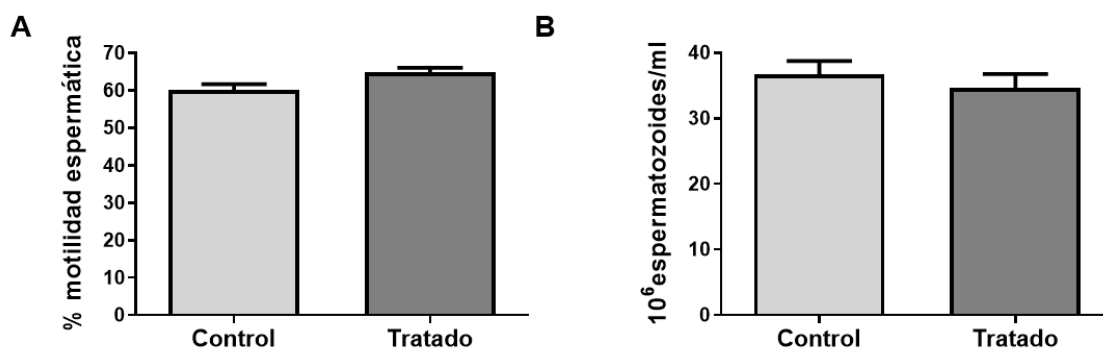


Figura 26: Parámetros espermáticos en ratones control o tratados. Se analizó la motilidad (A) y concentración (B) espermática en muestras extraídas de *cauda* de ratones controles o tratados (n=40, p>0,05; n=32, p>0,05, respectivamente. Test de Student). Los resultados son expresados como media ± e.e.m.

1.3. Análisis de especies reactivas de oxígeno (ERO) en espermatozoides

Es sabido que la metabolización del etanol altera el equilibrio de coenzimas y de especies reactivas de oxígeno. Con el fin de estudiar si el consumo directo de alcohol, en las concentraciones y el esquema de intoxicación utilizado en nuestro modelo, altera los niveles de ERO en los espermatozoides, se evaluó el nivel de estrés oxidativo intracelular en los espermatozoides de ambos grupos (control y tratado). Como se describe en “Materiales y métodos”, los espermatozoides se cargaron con la sonda del reactivo CellROX Green y luego se analizaron mediante citometría de flujo, tal como se muestra en la Figura 27A. El porcentaje de espermatozoides que presentaron marca positiva para la sonda fluorescente

fue el mismo en los dos grupos de estudio (Figura 27B) ($n=5$, $p>0,05$). Sin embargo, cuando se analizó la intensidad de fluorescencia, se encontró que era significativamente más elevada en los espermatozoides provenientes de los ratones tratados en comparación al control (Intensidad de fluorescencia relativa al control negativo: $2,2\pm 0,2$ $n=5$ en ratones control vs $3,0\pm 0,2$ $n=4$ en ratones alcoholizados, $p<0,01$) (Figura 27 C-D).

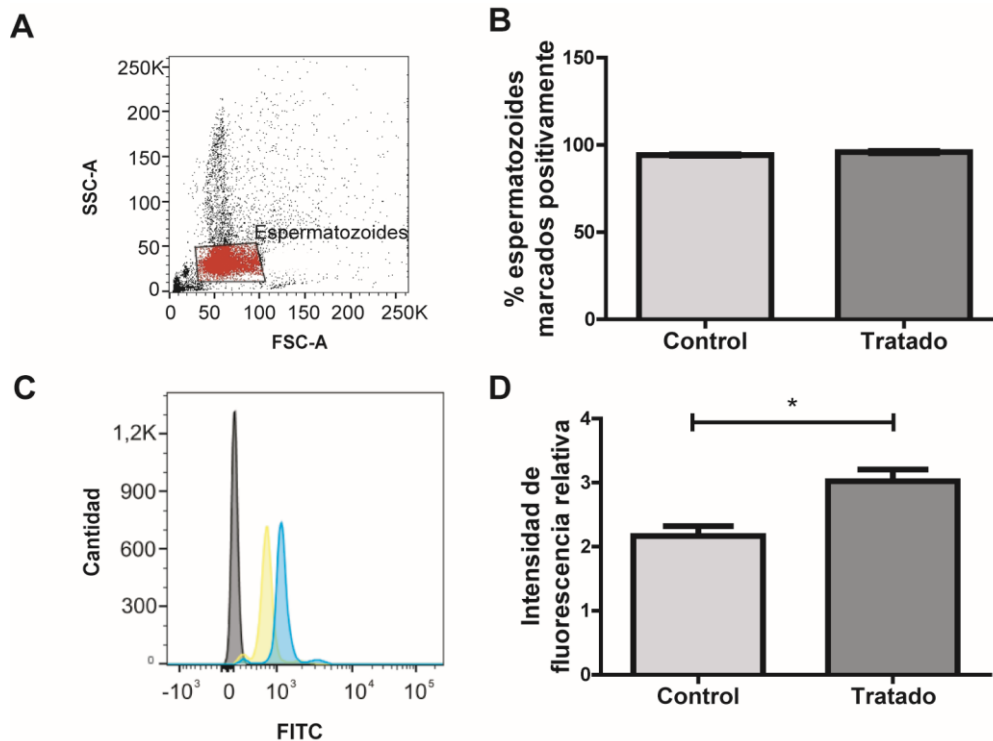


Figura 27 Análisis de especies reactivas de oxígeno (ERO) en muestras espermáticas en el grupo control y tratado. Experimentos representativos utilizando el análisis por citometría de flujo de espermatozoides marcados con la sonda fluorimétrica del Kit CellRox Green, (A)

Los datos de “forward” (FSC) y “side scatter” (SSC) fueron obtenidos de la colección de 10.000 eventos por muestra. Los límites de la población estudiada seleccionan a los espermatozoides, excluyendo las señales de espermatozoides morfológicamente anormales y restos celulares. (B) Porcentaje de espermatozoides marcados positivamente con la sonda fluorogénica evidenciando la presencia de ERO intracelular. (C) Histograma representativo del espectro de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo en ausencia de sonda (gris) y las muestras de espermatozoides de ratones control (amarillo) o tratado (azul). (D) Intensidad de fluorescencia, relativa al control de autofluorescencia, en muestras espermáticas (marca positiva para ERO relativas al control en ausencia de sonda fluorimétrica. ** $p<0,01$, Test de Student, $n = 5$ males. Los resultados son expresados como media \pm e.e.m.

1.4. Peso e histología testicular

El consumo de etanol en los ratones podría alterar los niveles de ERO en el testículo y modificar los niveles de testosterona en plasma y de 17β -hidroxiesteroides deshidrogenasas en testículo (Abarikwu et al., 2015) lo cual podría inducir cambios histológicos y morfométricos en testículos. Para evaluar el efecto del consumo de alcohol sobre las gónadas masculinas, se analizó el peso testicular de los animales tratados y control. Se encontró que este no estaba alterado como consecuencia del consumo de alcohol, siendo los pesos similares en ambos grupos. Asimismo, el peso testicular relativo al peso del animal tampoco mostró diferencia entre los dos grupos (Figura 28 A-B, respectivamente).

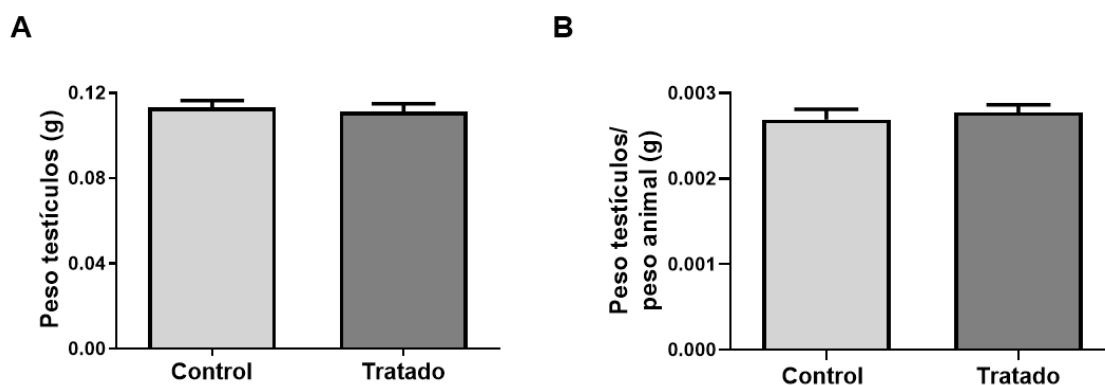


Figura 28: Peso testicular de ratones control y tratados. Se analizó el peso promedio de los testículos (A) y el peso de los testículos relativo al peso corporal (B) en los animales control y tratados sin observarse diferencias entre ambos grupos ($n=11$; $p>0,05$. Test de Student). Los resultados son expresados como media \pm e.e.m.

Al analizar la morfología de los cortes histológicos de testículo, en el grupo control se observaron túbulos seminíferos de tamaño uniforme, revestidos por varias capas de línea germinal ordenadas, compuesta por espermatogonias, células de Sertoli y células espermatogénicas en diferentes estadios de desarrollo. A su vez se observó, dentro de los túbulos, que la luz de los mismos era de menor tamaño, con espermatozoides en su interior y pequeños espacios intersticiales entre túbulos adyacentes. Sin embargo, los túbulos pertenecientes a los testículos del grupo tratado exhibieron cambios histológicos entre los que se puede mencionar: desorden en la disposición de las células germinales, gran tamaño de la luz de los túbulos, mostrando en algunos casos, células inmaduras dentro y espacios

vacíos dentro del epitelio germinal debido, probablemente, a la descamación de células espermatogénicas. También se observó una gran expansión de los espacios intersticiales entre los túbulos seminíferos (Figura 29).

Como parte del análisis morfométrico, se determinó el diámetro de los túbulos seminíferos y no se observaron diferencias entre los dos grupos (Figura 30A). Sin embargo, se observó un aumento en el diámetro de la luz de los túbulos seminíferos en los ratones del grupo tratado (Figura 30B). Si bien esta medición se encontró alterada, no se observaron diferencias al evaluar el grosor del epitelio de los túbulos (Figura 30C). La organización de los túbulos seminíferos no se encontró alterada entre los dos grupos, pero en la figura 29 puede observarse claramente en el grupo tratado, el aumento del diámetro del lumen de los túbulos seminíferos con una aparente reducción de la cantidad de espermatozoides dentro. Tomando esto en consideración, se analizó la producción espermática diaria (DSP, del inglés “daily sperm production”). Al analizarse este parámetro se observó que el grupo tratado mostró una disminución significativa del número de espermátidas por testículo (DSP), y una disminución significativa de la eficiencia de DSP (DSP por gramo de testículo) en comparación con el grupo control (figura 31 A y B, respectivamente).

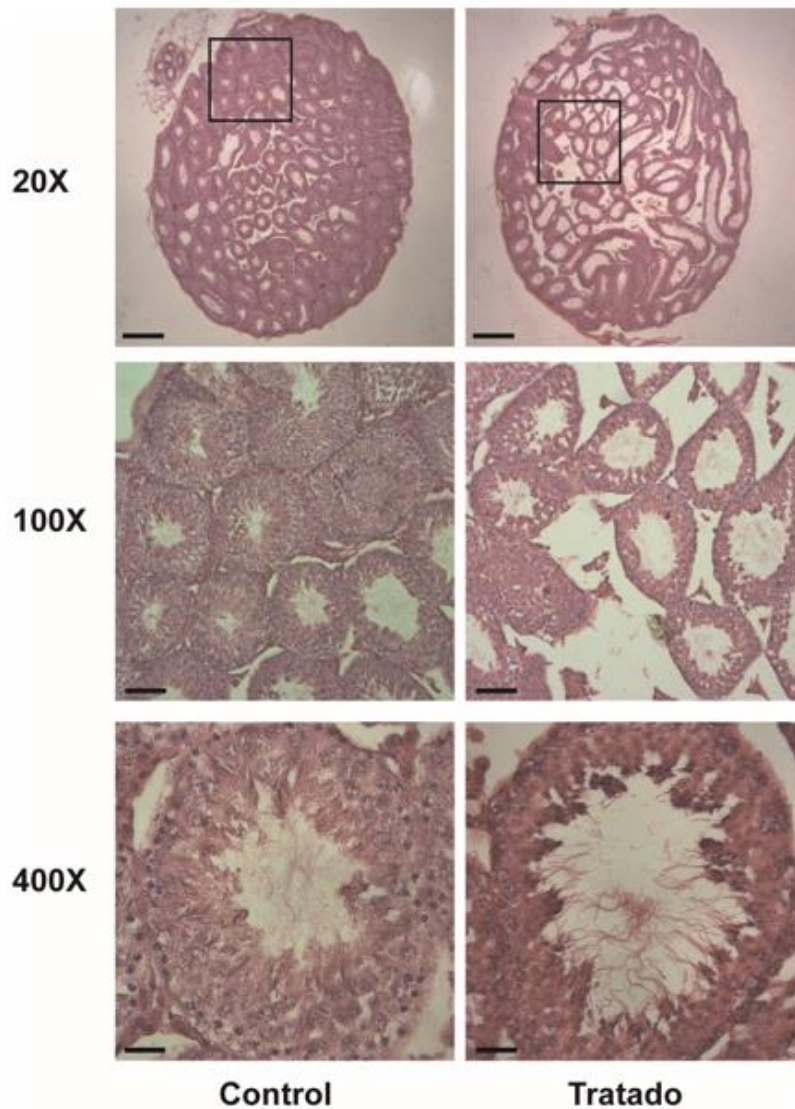


Figura 29: Evaluación de la histología testicular en ratones de los grupos control y tratado. Imágenes representativas de la morfología testicular en secciones testiculares de ratones control (panel izquierdo) y de ratones tratados (panel derecho) teñidas con Hematoxilina y Eosina. Aumento original de las imágenes: 20X, 100X, 400X (Barra de escala: 500 μm , 100 μm y 25 μm , respectivamente).

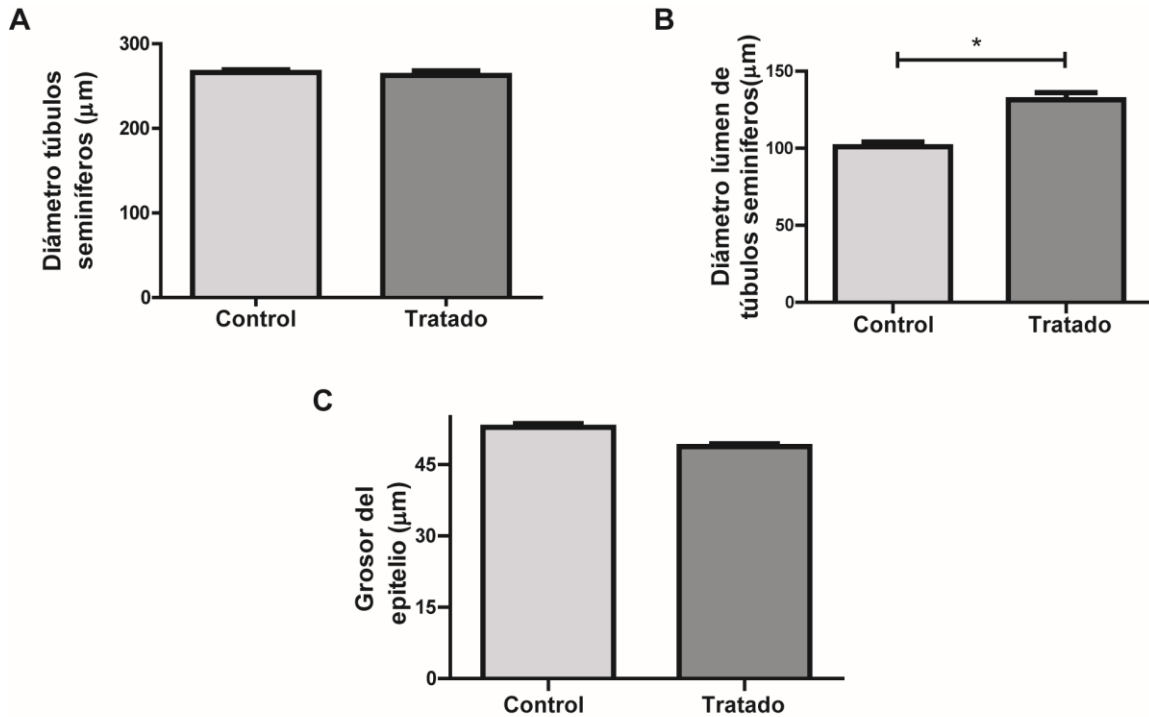


Figura 30: Análisis morfométrico de los cortes histológicos de testículo. A) Diámetro de los túbulos seminíferos, B) diámetro del lumen de los túbulos seminíferos y C) grosor del epitelio germinal medido en los cortes histológicos de los testículos de los animales controles o tratados. Al menos 50 túbulos fueron analizados por animal, n=6 animales por grupo. Test Nested. *p<0,05. Los resultados son expresados como media ± e.e.m. Los datos fueron transformados usando la fórmula de log normal para asumir una distribución normal.

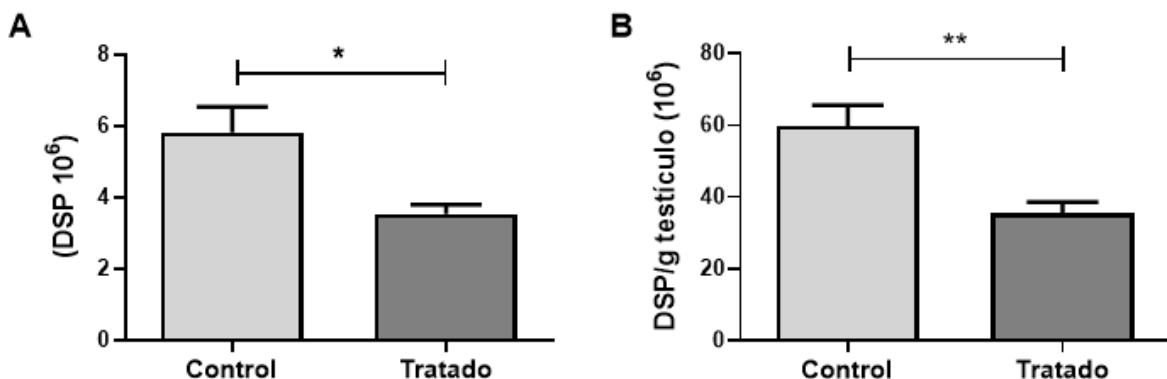


Figura 31: Medición de la producción espermática diaria como parámetro de funcionalidad reproductiva. Se analizó A) la producción espermática diaria por testículo (DSP) y B) el número de espermatogonias por testículo relativo al peso testicular (SC/g) en ratones de los grupos control y tratado. n = 5. Test de Student. *p < 0,05, **p < 0,01. Los resultados son expresados como media ± e.e.m.

1.5. Evaluación de la fragmentación del DNA mediante la técnica de TUNEL en el epitelio testicular

Se ha informado, en otros estudios, que el aumento de la apoptosis de células germinales inducida por etanol puede contribuir a la atrofia testicular e infertilidad masculina asociada con el abuso de alcohol (Abarikwu et al., 2015).

Con el fin de analizar si el consumo de etanol, según nuestro modelo de intoxicación, en los ratones macho altera o modifica la integridad de la cromatina de la línea germinal, se analizó la incidencia en la ruptura de las hebras de DNA a través de la técnica de TUNEL. Se observó que el porcentaje de células, por túbulo seminífero, que presentaban marca positiva para TUNEL en el grupo de ratones tratados era mayor significativamente, comparado con el grupo control ($56\pm 6\%$ vs $21\pm 4\%$, $p < 0,01$, $n=2$, respectivamente) (Figura 32 A-B).

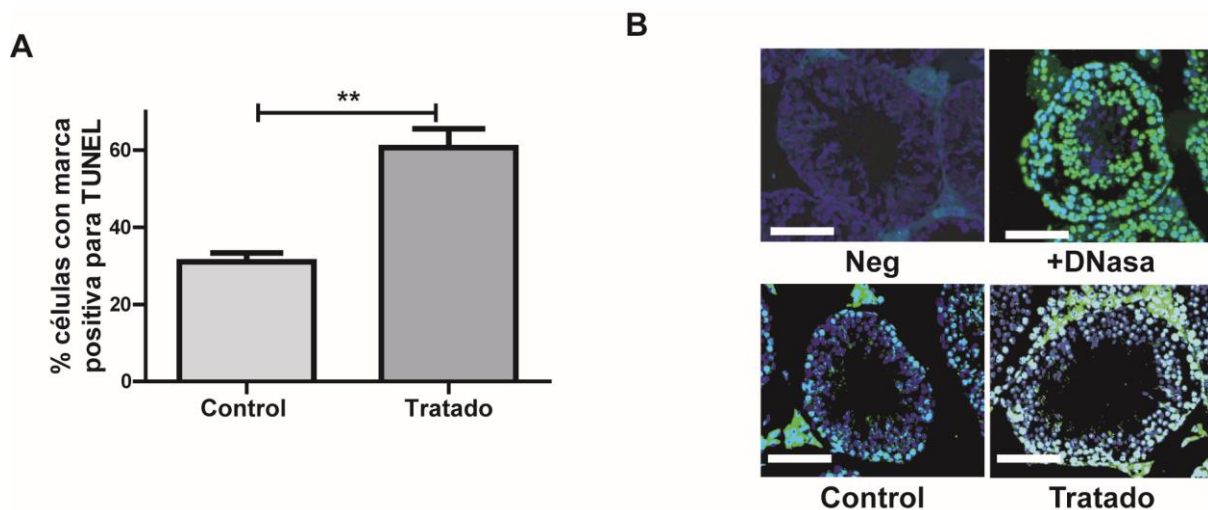


Figura 32 Fragmentación del DNA de la línea germinal luego del consumo de etanol. (A) Resultados de la técnica de TUNEL expresado como el porcentaje de fragmentación del DNA (células marcadas positivamente). $n = 6$ animales por grupo con un mínimo de 8 túbulos analizados por testículo. Nested test (prueba anidada). $**p < 0,01$. Los datos son representados como media \pm e.e.m. (B) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de secciones testiculares obtenidas mediante la técnica de TUNEL (verde: TUNEL positivo; azul: DAPI). Barra de escala, 100 µm.

1.6. Inmunofluorescencia de modificaciones post-traduccionales (MPT) de histonas en espermatozoides

En los ratones, aproximadamente el 1% de las histonas presentes en las espermátides se conserva durante la espermiogénesis y son retenidas unidas al DNA espermático. Se ha informado que estas, se asocian a genes de importancia durante los primeros estadios del desarrollo embrionario (Teperek et al., 2016). Para investigar si el consumo de alcohol altera la presencia de histonas MPT en la cromatina espermática, se determinó su presencia mediante la técnica de inmunofluorescencia en los espermatozoides de la *cauda* epididimaria de los grupos control y tratado. Dado que las modificaciones de las histonas no se pueden visualizar mediante inmunotinción directa porque están enmascaradas por la alta compactación de la cromatina, los espermatozoides tuvieron que ser previamente descondensados, tal como se detalló en Materiales y métodos para favorecer la entrada de los anticuerpos. Los espermatozoides de ratón mostraron marca positiva para todas las modificaciones de histonas analizadas (H3K4me3, H3K27me3, H3K9me2/me3, H3K4me2, H3K9me, H4K12ac). Se observó que el consumo moderado de etanol generó una disminución significativa de la presencia de la marca epigenética H3K4me3 en los espermatozoides provenientes del grupo tratado comparado al control (marca positiva: $7,0 \pm 3,7$ n=8 alcoholizado vs $27,1 \pm 8,2$ n=11 control, $p < 0,05$) (Figura 33A). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el resto de las modificaciones de histonas analizadas (n=11, $p > 0.05$) (Figura 33 B-F).

El patrón de localización de las histonas modificadas en la cabeza de los espermatozoides fue, en general, homogéneo en todas las muestras analizadas tanto en animales control como tratados. Se observó la marca positiva de H3K4me3 en la región apical de la cabeza del espermatozoide. La marca positiva de H3K27me3 se localizó en la región interna de la cabeza. La marca correspondiente a H3K9me2 / me3 se distribuyó por toda la cabeza, presentando una mayor intensidad en la región interna. La marca positiva para H3K4me2 se distribuyó homogéneamente por la cabeza. H3K9me se localizó en la región posterior y basal de la cabeza del esperma. H4K12ac presentó una marca intensa en la región apical de la cabeza del espermatozoide (Figura 33G).

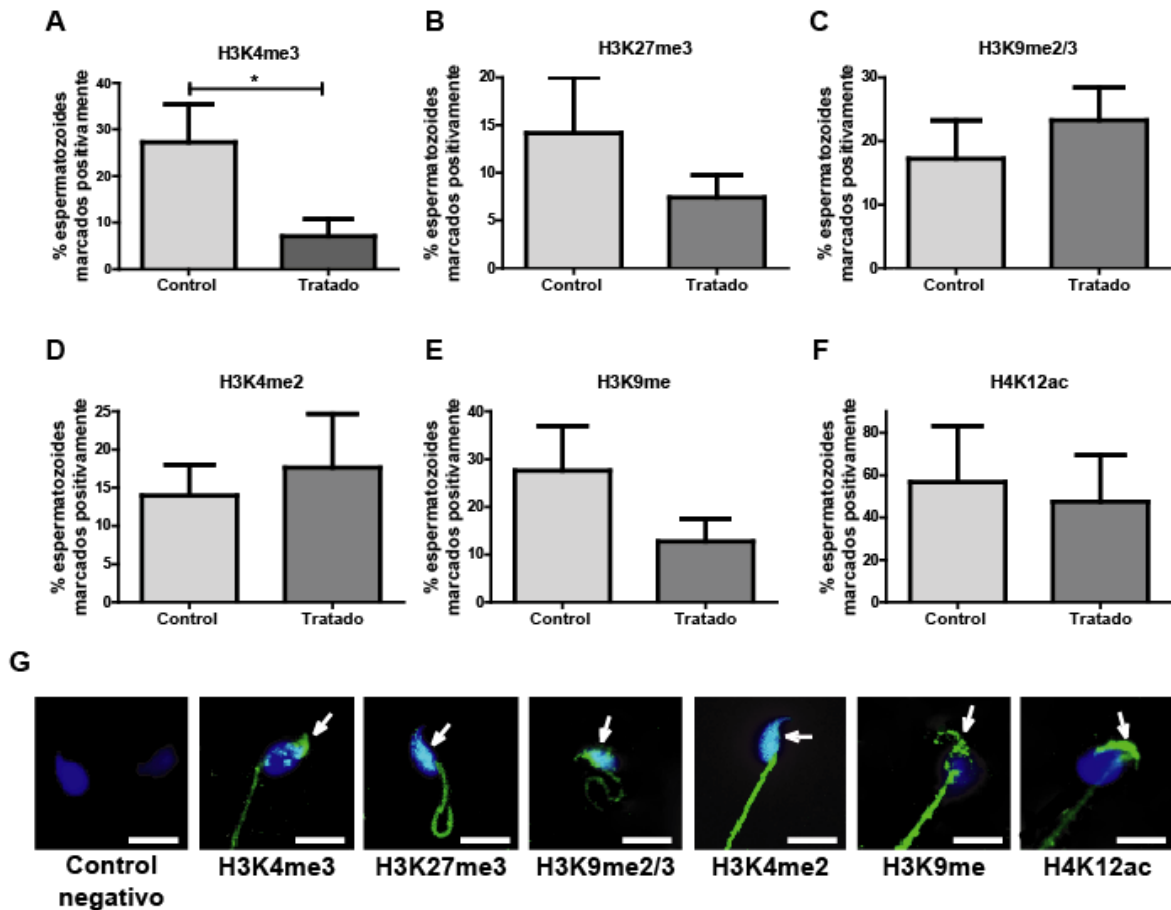


Figura 33 Modificación post traducción (MPT) de histonas en espermatozoides de ratones del grupo control y tratado. (A) H3K4me3, (B) H3K27me3, (C) H3K9me2/3, (D) H3K4me2, (E) H3K9me, (F) H4K12ac. Test de Student, n = 11 ratones por grupo, *p < 0.05.

Los datos son expresados como media \pm e.e.m. (G) Imágenes representativas de la localización de las marcas positivas (verde) de las MPT de histonas en los espermatozoides de ratones en los grupos control/tratado. Los núcleos de los espermatozoides fueron teñidos con DAPI (azul). Barra de escala, 10 μ m.

2. DESCENDENCIA MASCULINA

2.1. Efecto del consumo paterno de alcohol sobre los parámetros espermáticos en la descendencia masculina

En las muestras de espermatozoides de los ratones tratados, que habían consumido etanol, no se observaron diferencias significativas en los parámetros espermáticos analizados, respecto a los ratones control. Sin embargo, con el fin de analizar si el consumo paterno de etanol tenía un efecto intergeneracional en las gametas masculinas de la descendencia (F1) se analizaron los parámetros espermáticos de concentración y motilidad. Al igual que lo ocurrido en los padres, no se encontraron diferencias significativas entre los parámetros de motilidad (Figura 34A) y concentración (Figura 34B) analizados en los diferentes grupos experimentales de la F1, indicando que el consumo paterno de alcohol no afectaría dichos parámetros en la progenie.

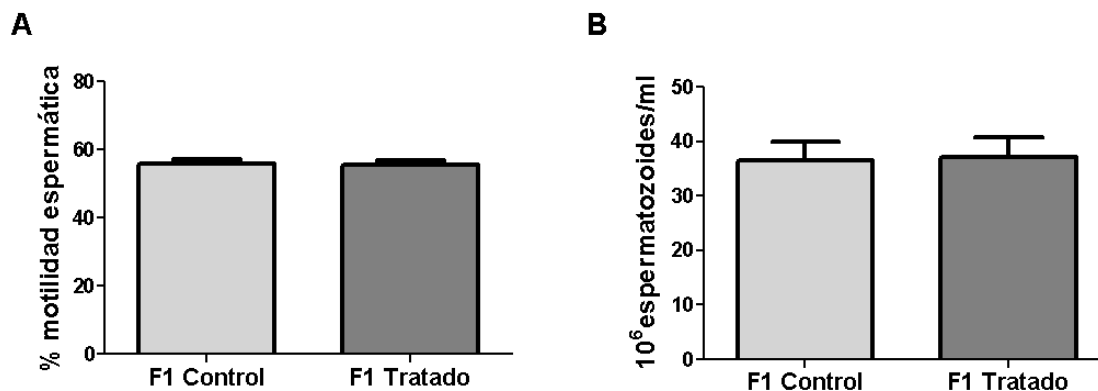


Figura 34: Parámetros espermáticos de la descendencia de los ratones control y tratado.

Se analizó la motilidad (A) y concentración (B) espermática en muestras extraídas de la *cauda* del epidídimo de los hijos de los ratones en los grupos control o tratado sin encontrarse diferencias significativas entre ambos ($n=12$, $p>0.05$; $n=10$, $p>0.05$, respectivamente. Test de Student). Los datos son expresados como media \pm e.e.m.

2.2. Análisis de especies reactivas de oxígeno (ERO) en espermatozoides de la F1

Se ha observado que el etanol consumido por los padres altera los niveles de ERO en sus espermatozoides por lo cual se quiso analizar si este efecto era necesariamente una consecuencia directa del consumo de alcohol (padres), o si también podía transmitirse a la descendencia. Para ello, se evaluó la presencia de ERO intracelular en los espermatozoides de ambos grupos (F1-control y F1-tratados). La presencia de ERO intracelular se analizó mediante citometría de flujo utilizando el Kit CellROX Green, tal como se detalló en “Materiales y métodos”. El porcentaje de espermatozoides que presentaron una marca positiva para las sondas fluorogénicas utilizadas, así como la intensidad de esa fluorescencia, fueron iguales para ambos grupos (Figura 35 B-D).

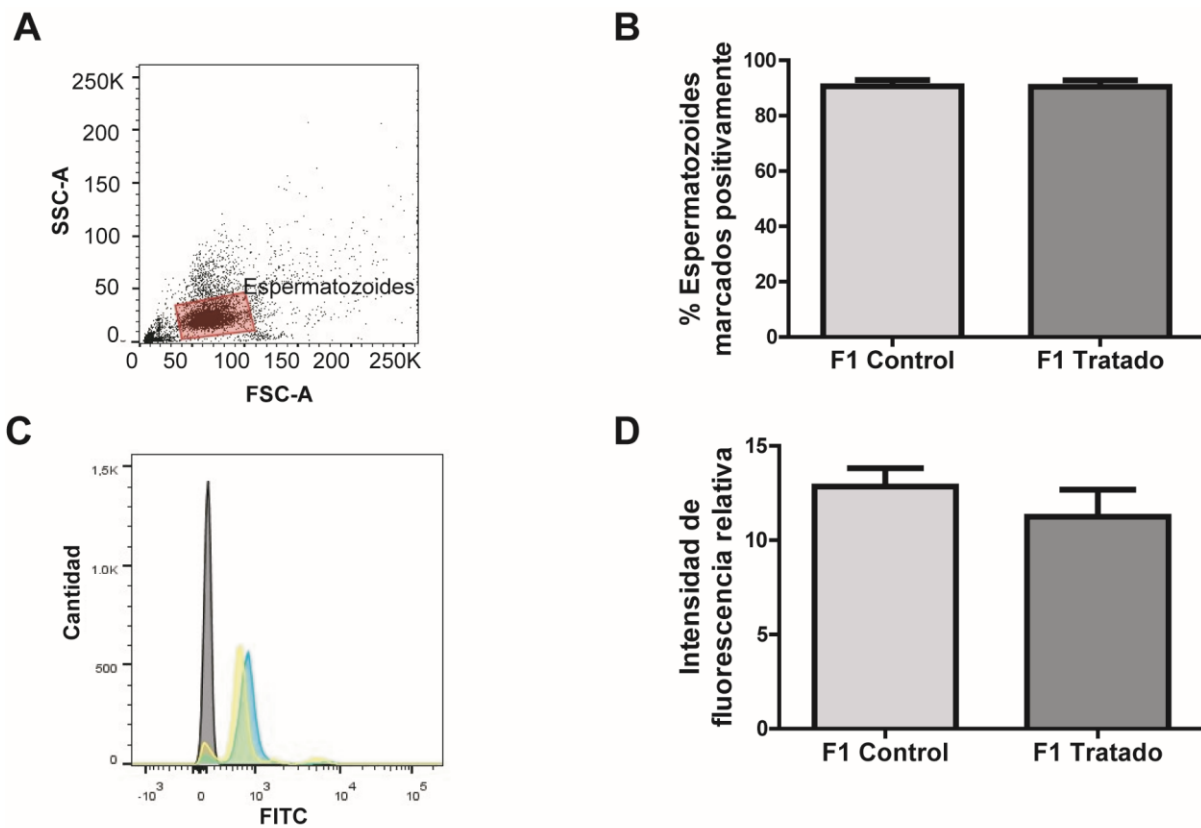


Figura 35: Análisis de especies reactivas de oxígeno (ERO) en muestras espermáticas en la descendencia de los grupos control y tratado. Experimentos representativos, utilizando el análisis por citometría de flujo de espermatozoides marcados con la sonda fluorogénica del Kit CellRox Green, (A) Los datos de “forward” (FSC) y “side scatter” (SSC) fueron obtenidos de la colección de 10000 eventos por muestra. Los límites seleccionados en el equipo para la población estudiada, distinguen a los espermatozoides excluyendo las señales correspondientes a espermatozoides morfológicamente anormales y restos celulares. (B) Porcentaje de espermatozoides marcados positivamente con la sonda fluorogénica, evidenciando la presencia de ERO intracelular. (C) Histograma representativo del espectro de fluorescencia obtenido mediante citometría de flujo en ausencia de sonda (gris) y las muestras de espermatozoides de ratones F1 control (amarillo) o F1 tratado (azul). (D) Intensidad de fluorescencia, relativa al control de autofluorescencia, en muestras espermáticas (marca positiva para ERO relativas al control en ausencia de sonda fluorogénica. $p > 0.05$, Test de Student, $n = 4$ camadas por grupo (3 machos por cada camada). Los datos son expresados como media \pm e.e.m.

2.3. Efecto del consumo paterno de alcohol sobre la descondensación de la cromatina espermática en la F1

Previamente, nuestro grupo mostró que después de 14 días de consumo diario de etanol al 15% (v/v), el porcentaje de espermatozoides descondensados aumentaba significativamente en los ratones tratados (Sanchez et al., 2018). En este estudio, se realizó el mismo experimento en los espermatozoides de la descendencia (F1) de ratones tratados y controles y se cuantificó el porcentaje de descondensación como la suma de los porcentajes de los estadios M y G (%M+G) a los 15, 30 y 60 minutos. No se observaron diferencias entre los grupos a ninguno de los tiempos analizados (Figura 36).

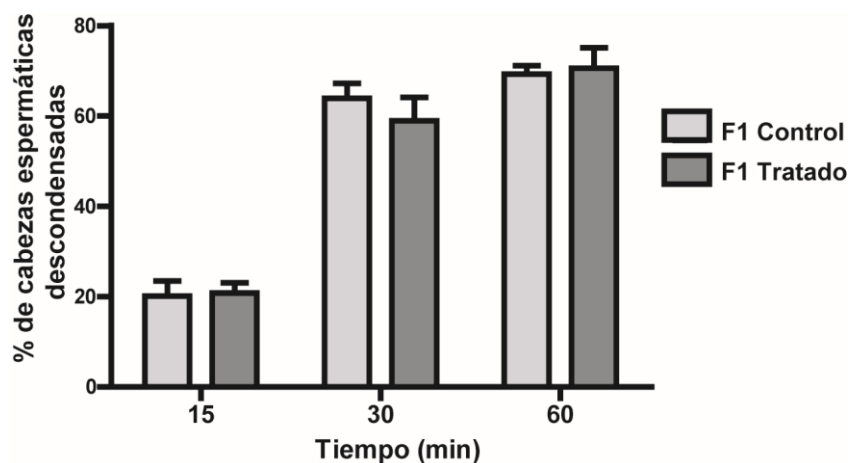


Figura 36: Análisis de la descondensación cromatínica en muestras de espermatozoides de ratones F1 control y F1 tratado. Porcentaje de espermatozoides que presentan descondensación nuclear a tres tiempos analizados (15, 30 y 60 min) (n=7 ratones por grupo, test de Student $p > 0.05$). Los datos son expresados como media \pm e.e.m.

2.4. Peso e histología testicular de la descendencia masculina

Debido a que se encontraron efectos del consumo de etanol en mediciones morfométricas de las gónadas de machos intoxicados, se analizó el peso y la histología testicular para evaluar los efectos del consumo paterno sobre estos parámetros en la descendencia. Se encontró que, tanto el peso testicular absoluto como el peso testicular promedio relativo al peso del animal, se encontraban disminuidos en la descendencia del grupo de ratones tratados, respecto a la descendencia del grupo control (Figura 37 A-B).

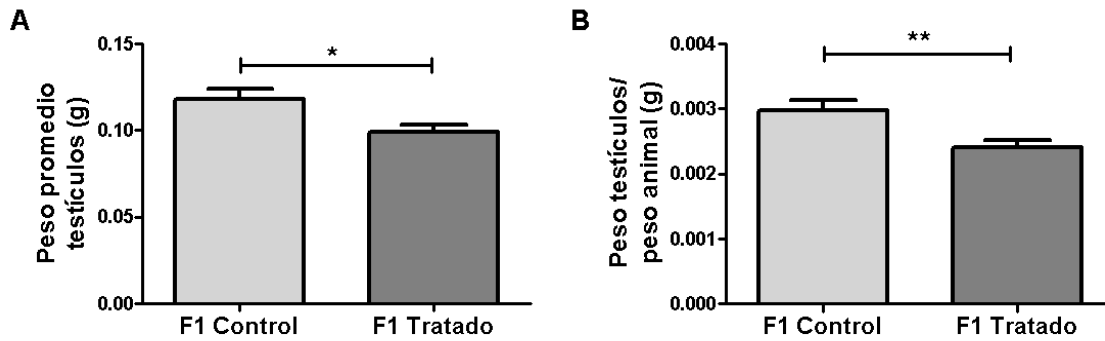


Figura 37: Peso testicular de la progenie (F1). Se analizó el peso promedio testicular (A) y el peso testicular relativo al peso corporal (B) en los ratones F1 control y F1 tratado observándose diferencias significativas en ambos casos. Test de Student, n=11 ratones por grupo. *p < 0.05, **p < 0.01. Los datos son expresados como media ± e.e.m.

La apariencia histopatológica de los cortes de testículos analizados mostró túbulos seminíferos morfológicamente normales en ambos grupos (F1 control y F1 tratado) cuando se observaron con bajo aumento (20x). Sin embargo, cuando se observaron a mayor aumento (100x y 400x), se encontraron espacios irregulares en el epitelio de los túbulos seminíferos en el grupo F1 tratado debido, probablemente, a la descamación de las células espermatogénicas (Figura 38). No se observó alteración en la organización de la estructura de los túbulos seminíferos entre los dos grupos. Sin embargo, se observó una disminución del diámetro de los túbulos seminíferos en la descendencia del grupo F1-tratado respecto del grupo F1-control (Figura 39 A). Esto se atribuyó a una disminución del grosor del epitelio del túbulo seminífero (Figura 39 C). El diámetro del lumen no evidenció diferencias entre ambos grupos (Figura 39 B).

Cuando analizamos la producción diaria de espermatozoides en la descendencia, encontramos una disminución estadísticamente significativa en la eficiencia de DSP (DSP por gramo de testículo) ($p = 0.0152$) y una tendencia similar, pero no significativa, en el DSP ($p > 0.05$) en comparación con el grupo de control (Figura 40 B y A, respectivamente).

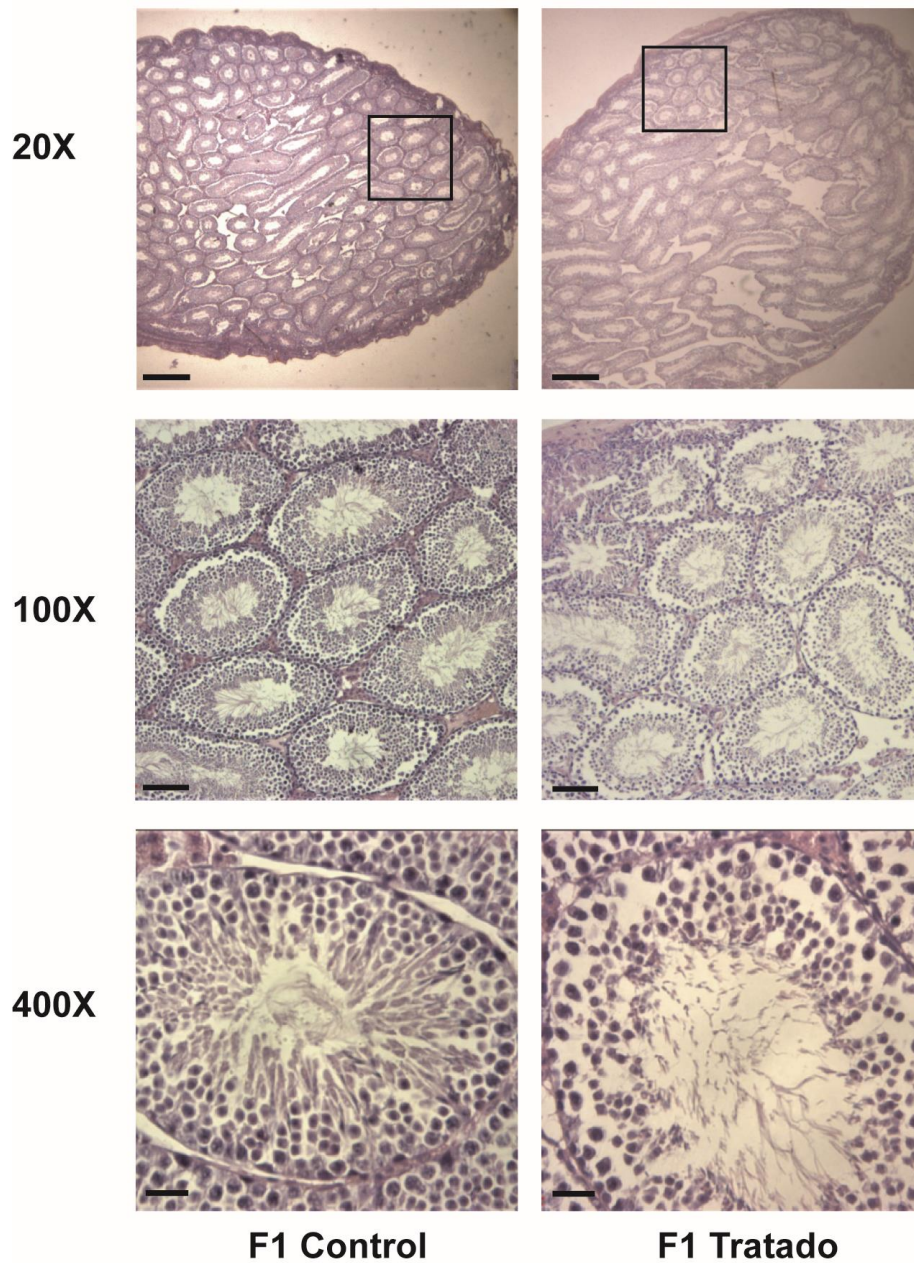


Figura 38: Evaluación de la histología testicular en la descendencia masculina. Imágenes representativas de la morfología testicular en secciones testiculares de ratones F1 control (panel izquierdo) y de ratones F1 tratados (panel derecho) teñidas con Hematoxilina y Eosina. Aumento original de las imágenes: 20X, 100X, 400X (Barra de escala: 500 μm, 100 μm y 25 μm, respectivamente).

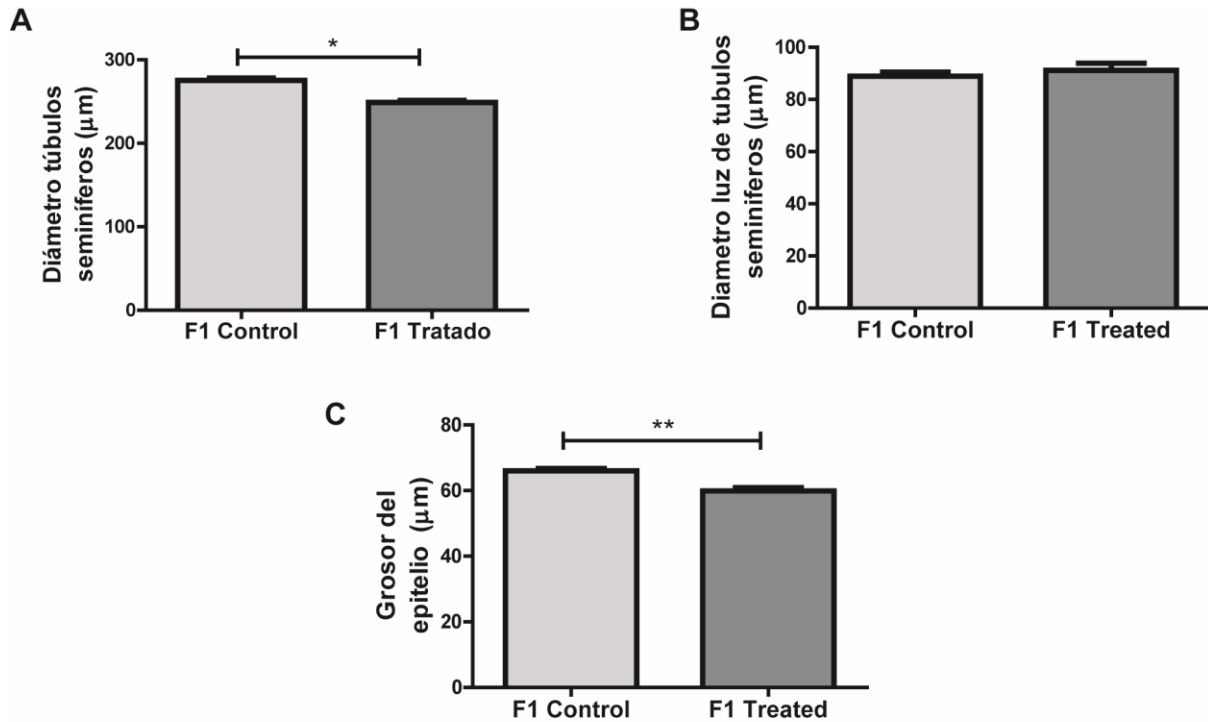


Figura 39: Análisis morfométrico de los cortes histológicos de testículo. A) Diámetro de los túbulos seminíferos, B) diámetro del lumen de los túbulos seminíferos y C) grosor del epitelio germinal medido en los cortes histológicos de los testículos de los animales control o tratados. Al menos 50 túbulos fueron analizados por animal, n=3 camadas por grupo (3/4 animales por camada). Nested test (prueba anidada). *p<0.05, **p<0.01. Los resultados son expresados como media ± e.e.m.

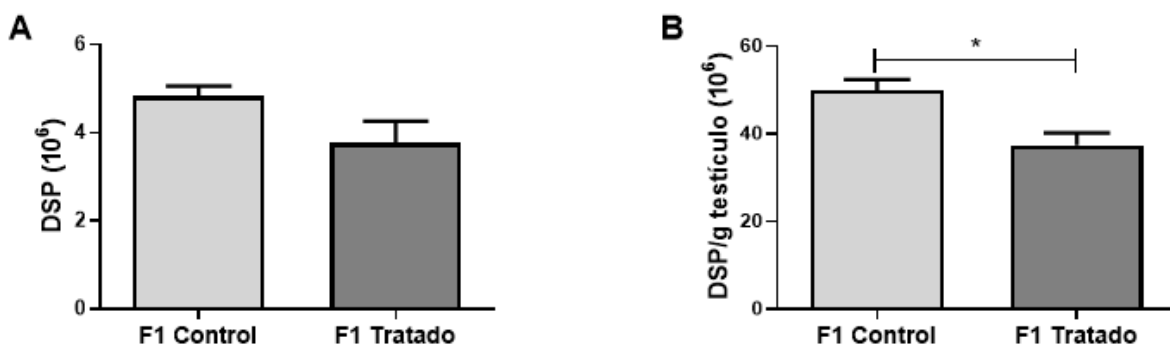


Figura 40 Producción espermática diaria en la descendencia: (A) Producción diaria de espermatozoides (DSP) por testículo y (B) eficiencia (DSP por gramo de testículo) de la producción espermática en la descendencia del grupo control y tratado. n= 5 camadas por grupo (2/3 animales por camada). Nested test (prueba anidada). *p < 0.05

2.5. Evaluación de la fragmentación del DNA mediante la técnica de TUNEL en el epitelio testicular de la descendencia

Con el fin de evaluar si el consumo paterno de alcohol alteraba el porcentaje de células germinales positivas para TUNEL en los testículos de la progenie, tal como se observó en los ratones macho progenitores intoxicados con etanol, se analizó este parámetro en la descendencia masculina. Se observó que el porcentaje de espermatozoides que presentaron una marca positiva para la sonda fluorogénica utilizada, fue el mismo para ambos grupos (Fig. 41 A-B).

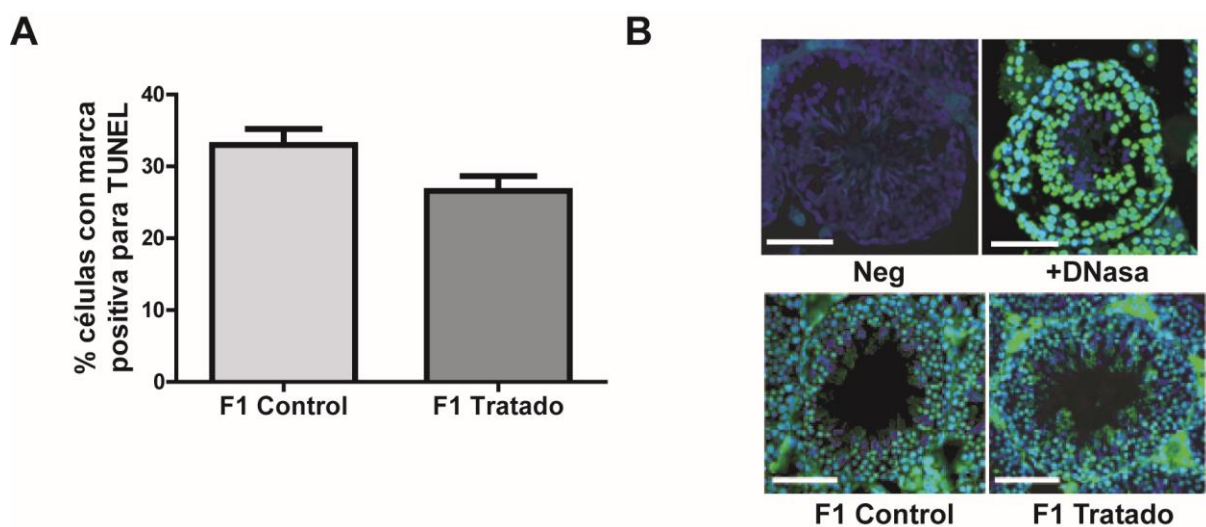


Figura 41: Fragmentación del DNA en la línea germinal de la progenie (F1). (A) Porcentaje de fragmentación del DNA en las poblaciones celulares del epitelio del túbulo seminífero de ambos grupos experimentales. Nested test (prueba anidada), n = 4 capas por grupo (3/4 animales por camada), con un mínimo de 4 campos analizados por testículo. $p > 0.05$. (B) Imágenes de la inmunofluorescencia realizada mediante la técnica de TUNEL en las secciones testiculares (verde: TUNEL positivo; azul: DAPI). Barra de escala, 100 μm .

2.6. Inmunofluorescencia de MPT de histonas en espermatozoides de la descendencia masculina

Al igual que se analizó en la línea parental, en los espermatozoides de ratón de la F1 se analizó la presencia de histonas modificadas, con el fin de evaluar si estas estaban alteradas entre los grupos de la progenie masculina provenientes de los diferentes grupos experimentales. Se observó marca positiva para todas las modificaciones de histonas estudiadas (H3K4me3, H3K27me3, H3K9me2 / me3, H3K4me2, H3K9me, H4K12ac) en los espermatozoides de la F1 de ambos grupos experimentales, al igual que en los padres. El patrón de localización de las histonas modificadas en la cabeza de los espermatozoides fue, en general, homogéneo en todas las muestras analizadas, conservándose el mismo patrón observado en los padres (Figura 33 G). El consumo de alcohol masculino por la línea parental aumentó significativamente la abundancia de las marcas epigenéticas de histonas H3K9me y H4K12ac en los espermatozoides de su descendencia (Figura 42 E y F, respectivamente). Sin embargo, no se encontraron diferencias en las siguientes marcas epigenéticas: H3K4me3, H3K27me3, H3K9me2 / me3, H3K4me2 (Figura 42 A-D).

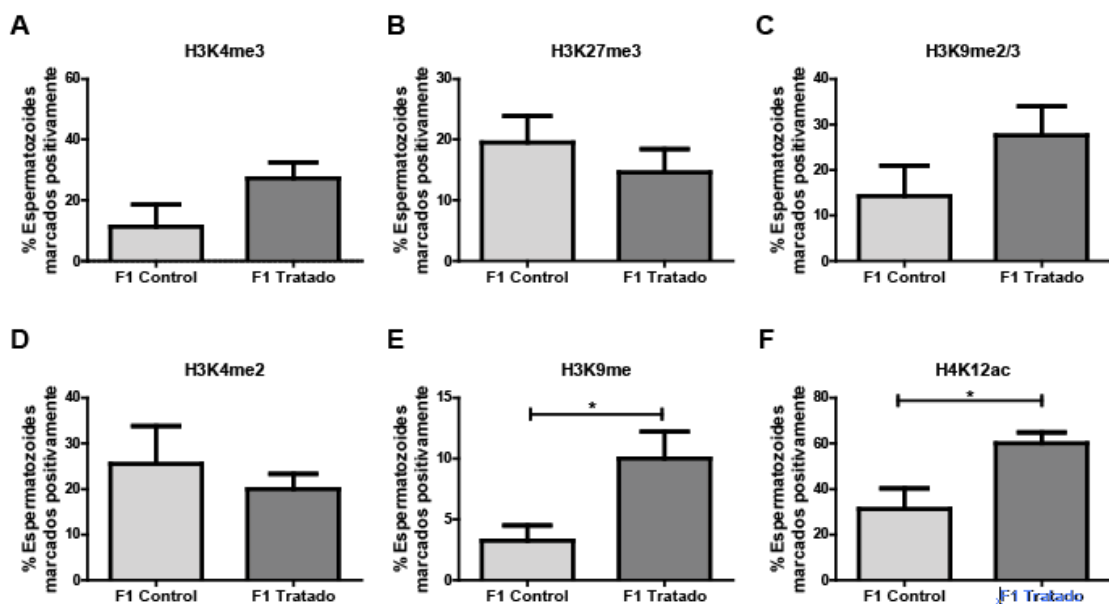


Figura 42 Modificación post traduccional (MPT) de histonas en espermatozoides de la progenie (F1). (A) H3K4me3, (B) H3K27me3, (C) H3K9me2/3, (D) H3K4me2, (E) H3K9me, (F) H4K12ac. Test de Student, n = 5 camadas por grupo (3 animales por camada) *p < 0.05. Los resultados son expresados como media ± e.e.m.

Discusión

En este primer capítulo se evaluó el impacto del consumo de etanol por parte de los padres sobre la función e integridad de los espermatozoides y sus gónadas y algunos aspectos de la salud reproductiva en la descendencia masculina.

El consumo de etanol está ampliamente extendido y culturalmente aceptado en todo el mundo, en un amplio rango etario y demostró tener efecto directo sobre las gónadas (Van Thiel et al., 1978; Dees y Skelley, 1990) y el eje hipotálamo-hipofisario (Cicero y Badger, 1977; Välimäki et al., 1990). Sin embargo, a pesar de estas observaciones, el efecto del consumo de etanol sobre la salud reproductiva no está del todo claro y se encuentran reportes controversiales (Pajarinen et al., 1996; Auger et al., 2001; Martini et al., 2004; Muthusami y Chinnaswamy, 2005). En este sentido, la existencia del modelo murino como modelo experimental es muy útil debido a la similitud de los núcleos espermáticos entre el ratón y humano y, además, permite tener un consumo controlado de etanol para poder analizar diferentes parámetros reproductivos (Anderson et al., 1981; Weston et al., 1994; Morton et al., 2014; Wiecsorek et al., 2015).

En este trabajo de tesis doctoral se utilizó como modelo la administración de etanol a los ratones macho en el agua de bebida. Este método de suministro de etanol en el transcurso de varias horas, días o semanas tiene la ventaja de ser el modo más simple y que imita los patrones de comportamiento humano, de consumo intermitente de alcohol y cambios en la ingesta dietética (Best et al., 1949; Keegan et al., 1995; Brandon-Warner et al., 2012). Los roedores tienen una tasa metabólica (relativamente) rápida (aproximadamente 4 a 5 veces más alta que la de los humanos) lo que puede evitar que BAC alcance niveles lo suficientemente altos, de manera constante, como para ejercer daño importante (Keegan et al., 1995; Yip-Schneider et al., 2011). Según las mediciones de BAC realizada en ratones mantenidos en un régimen de consumo de etanol en agua de bebida (10 a 20% de alcohol (v/v), alternando diariamente durante 8 semanas) en machos, los niveles de BAC alcanzados fueron de entre 55-70 mg / dL (Brandon-Warner et al., 2012). Estas cantidades fueron consideradas como un “consumo moderado” en humanos (Miller y Spicer, 2012). En este trabajo, los niveles de BAC fueron de entre 15-23 mg/dL, siendo menores a los reportados como “consumo moderado” pudiéndose considerar como un “consumo leve”. En muchos otros trabajos encontrados en la literatura, donde se analiza el consumo de etanol y se evalúa su efecto sobre distintas patologías, se utilizan protocolos de intoxicación diferentes. Algunos de estos protocolos incluyen: administración de etanol mediante inyecciones

intraperitoneales; consumo de etanol en el agua de bebida en conjunto con agua potable para que el consumo de etanol sea a elección; administración de etanol en el agua de bebida solo durante el período nocturno que es cuando tienen más actividad los roedores; duración diferente; concentraciones variadas, desde 10% v/v hasta 40% v/v (dado que se observó que el uso de un mayor consumo de etanol se asocia con una mayor mortalidad; se debe tener especial cuidado con qué cepa utilizar, entre otras cosas (Keegan et al., 1995)). En función de estos diferentes protocolos de intoxicación, podrán variar los efectos que se observan, pudiéndose ver que, en algunos de estos protocolos, los consumos son muy severos y no comparables al modelo de consumo humano. Es por esto que, en este trabajo, se buscó realizar un esquema de intoxicación que pudiera asemejarse al que se puede encontrar en el humano para, así, generar mejores aproximaciones sobre el alcance que tiene el efecto del consumo de etanol en los parámetros evaluados.

En primer lugar, se evaluó el efecto directo del consumo de etanol sobre diferentes parámetros reproductivos en los ratones. A diferencia de lo observado en otros trabajos, en los que generalmente se informa una disminución de la motilidad espermática en los animales expuestos al consumo de etanol (Condorelli et al., 2015), en este trabajo de tesis doctoral, no se encontraron diferencias entre los grupos control y tratado. La concentración de espermatozoides tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos analizados. Otros estudios que incluyeron al etanol como punto de investigación no mostraron un impacto significativo en la concentración de espermatozoides, al menos con un consumo moderado. Por el contrario, en los consumidores crónicos de etanol hay pruebas sólidas de deterioro de la espermatogénesis, de reducción en el recuento de espermatozoides y en los niveles de testosterona (Sharpe, 2010). En algunos estudios realizados en humanos, también se informó que la ingesta de etanol afectaba negativamente la concentración espermática (Veron et al., 2018). Sin embargo, si bien este parámetro no se encontró afectado, al medir la producción diaria de espermatozoides encontramos que la misma era significativamente menor en los animales del grupo tratado. Nosotros creemos que una posible explicación para la aparente discrepancia entre ambos resultados, con ausencia de variación en la concentración espermática entre ambos grupos, puede atribuirse al hecho de que los espermatozoides utilizados para determinar el recuento de espermatozoides se recolectaron de la *cauda epididimaria*, representando el total de la acumulación de espermatozoides en un momento particular. Esta condición nos podría haber dificultado evaluar correctamente las alteraciones

en la producción espermática causadas por la intoxicación con etanol durante el curso del tratamiento experimental.

No se encontraron diferencias en el peso testicular o en el diámetro de los túbulos entre los grupos de animales control y tratados, pero sí se observó un aumento en el diámetro de la luz de los túbulos seminíferos de los ratones tratados, y alteraciones a nivel morfológico de los testículos, posiblemente indicando que el consumo de etanol en las condiciones descritas altera las gónadas masculinas. Estas variaciones observadas en el diámetro del lumen de los ratones tratados en la línea parental pueden atribuirse al aumento de especies reactivas de oxígeno, producidas por el etanol, que eventualmente puede resultar en daño a nivel estructural (Kuladip et al., 2010; Jalili et al., 2014). Así mismo, tal como se ha reportado en trabajos previos (Russell et al., 1990; Rocha et al., 2021), el consumo de sustancias posee efectos tóxicos sobre el proceso de espermatogénesis. Este proceso puede verse afectado por: -defectos en los patrones de división de las espermatogonias, -degeneración y fagocitosis de las células germinales, -retardo en la espermatogénesis, -descamación de las células germinales (el cual puede ocurrir por separado o en asociación al parénquima testicular por desregulación hormonal o como resultado del efecto de sustancias tóxicas).

Es bien sabido que los niveles subletales de estrés oxidativo pueden tener un impacto negativo en la integridad del DNA espermático, lo que obstaculiza el desarrollo embrionario y tiene un efecto perjudicial sobre la salud de la progenie (Aitken et al., 1998, Aitken y Curry 2011, Aitken 2018). Al respecto, algunos autores han afirmado que el consumo de etanol aumenta el estrés oxidativo en los espermatozoides (Maneesh et al., 2006; Harikrishnan et al., 2013). Asimismo, en el trabajo de Sánchez et al. (2018 b), se observó que el porcentaje de cabezas de espermatozoides descondensados era significativamente mayor para los machos tratados con etanol, lo que podría hacer que los núcleos de estos espermatozoides fueran más susceptibles al daño. En primer lugar, en este trabajo de tesis doctoral se analizó la presencia de ERO en los espermatozoides maduros para evaluar si el consumo de etanol alteraba este parámetro en nuestras condiciones experimentales, observándose una mayor intensidad de los marcadores de ERO en los espermatozoides de los animales tratados respecto a los controles. Por este motivo, posteriormente se analizó la fragmentación del DNA en secciones transversales de testículos y se encontraron niveles significativamente más altos de daño en el DNA en la línea de células germinales del grupo tratado. En un estudio en el que se investigaron mecanismos hipotéticos responsables de la fragmentación del DNA

espermático, se descubrió que la mayor causa de roturas en el DNA se debía a un proceso apoptótico, probablemente disparado por la deficiencia en la maduración de la cromatina en el testículo y a los niveles de ERO durante el tránsito por el tracto genital masculino (Muratori et al., 2015). Esta observación nos permite pensar que el etanol, probablemente, afecte la formación de espermatozoides maduros sanos. Estos resultados parecen indicar que el consumo de etanol podría estar afectando la integridad de la línea germinal dentro de los testículos, por daños causados a la cromatina, debido al aumento de ERO. Como consecuencia, esto podría causar defectos en la correcta formación de gametas, generando, a su vez, modificaciones epigenéticas heredables que podrían tener efectos adversos en la descendencia.

Por lo expuesto hasta el momento, puede concluirse que el consumo de etanol por parte de los padres, expone a las células de la línea germinal a dicho compuesto produciendo alteraciones en marcas epigenéticas en los espermatozoides que, finalmente, podrían conservarse por varias generaciones a través del mecanismo de retención de histonas. Teniendo en cuenta, también, que otras marcas epigenéticas involucran la metilación de bases, se sabe que la exposición crónica al etanol en ratones macho afecta el patrón de metilación de genes en sus espermatozoides; alteraciones que luego se transmiten a su descendencia, generando trastornos mentales (Liang et al., 2014). Incluso, concentraciones de etanol que no inhiben el desarrollo embrionario, pueden producir anomalías genéticas o cromosómicas en las gametas. En particular, Knezovich y Ramsay (2012) demostraron que los cambios epigenéticos inducidos por el etanol podrían ser responsables de los efectos transgeneracionales en ratones. Como se describió anteriormente, no todas las histonas son reemplazadas por protaminas durante la espermiogénesis, lo que indica que la retención de nucleosomas en ciertas regiones del DNA es probablemente relevante para la fecundación y el desarrollo embrionario. De acuerdo con esto, Hammoud et al. (2009) describieron que el DNA asociado con los nucleosomas retenidos es abundante en promotores de microRNA, genes con impronta particular (“imprinting”) y genes esenciales para el desarrollo temprano de los mamíferos, tales como los genes HOX.

En este trabajo de tesis doctoral, se analizaron seis MPT de histonas para evaluar si el consumo de etanol alteró su enriquecimiento en los espermatozoides maduros. Estas MPT se seleccionaron principalmente debido a su asociación con genes expresados tempranamente en el desarrollo embrionario (Shi y Wu 2009, Brykczynska et al., 2010, Carrell y Hammoud

2010, Boissonnas et al., 2013, Jung et al., 2017). Se pudo observar, para todas las histonas analizadas, la presencia de marca positiva en la cabeza de los espermatozoides y algunas también aparecieron en la cola de los mismos. La tinción observada en la pieza intermedia no es inespecífica. Se ha reportado, en un trabajo realizado en muestras de espermatozoides humanos, realizado por el grupo de Krejci et al. (2015), la presencia de histonas remanentes en la cola de los espermatozoides. En ese trabajo, los análisis de inmunofluorescencia revelaron la presencia de histonas modificadas H3K27me3 y H4ac en las colas de los espermatozoides, motivo por el cual aislaron proteínas de las colas espermáticas y corroboraron mediante Western blot la presencia de histonas en la cola, confirmando que esas marcas no correspondían a una unión inespecífica de los anticuerpos. Estos análisis demostraron claramente que las proteínas extraídas de las colas de los espermatozoides incluían histonas residuales con MPT específicas. No hay evidencias, en la literatura científica, de un estudio similar realizado en ratones, pero creemos firmemente que nuestros hallazgos indican claramente la presencia de histonas remanentes, en las colas de los espermatozoides. Nuestros resultados mostraron niveles reducidos de H3K4me3 en los espermatozoides de los ratones que consumieron etanol, lo que sugiere que el mismo podría estar alterando la retención o incorporación de esta MPT en los espermatozoides. Con respecto a esta marca, Bernstein et al. (2002) reportaron la presencia de H3K4me3 en las regiones codificantes de genes activos y también se ha reportado la presencia de esta marca en espermatozoides humanos, localizada en genes con impronta específica (“imprinted”) expresados paternalmente y en promotores de genes relacionados al desarrollo embrionario. Esto sugiere que esta marca paterna podría jugar un papel clave en el correcto desarrollo y crecimiento embrionario (Samson et al., 2014). La información reportada en la literatura científica indica que la retención de la marca H3K4me3 en los espermatozoides es, probablemente, crucial durante la fecundación y el desarrollo embrionario temprano y que su reducción por consumo de etanol, como se muestra en este estudio, podría afectar negativamente estos procesos.

Como una aproximación al estudio de una herencia transgeneracional de estos cambios y su posible incidencia en la progenie, se continuó con el estudio del efecto del consumo paterno de etanol sobre la salud reproductiva de la descendencia masculina adulta. En esta sección se observó una disminución significativa del peso testicular de la progenie del grupo tratado (F1), que se correlacionó con una disminución del grosor del epitelio de las paredes de los túbulos

donde se encuentra la línea germinal de los espermatozoides y una disminución del diámetro de los mismos. Curiosamente, no encontramos diferencias en el recuento de espermatozoides. Sin embargo, encontramos que el número de espermátidas por peso testicular estaba disminuido respecto al grupo control de la F1. Estos resultados podrían indicar que el consumo paterno de etanol afecta la producción espermática en los hijos. Si bien, estas alteraciones a nivel testicular, en principio no se ven reflejadas en una disminución de las características de gametas, ni en una correcta función reproductiva, ya que este último punto no fue evaluado, creemos que es posible que esta condición en los ratones pueda ser incipiente. De ser así, la F1 de los ratones tratados estaría evidenciando una atrofia testicular temprana, que con el tiempo podría acentuarse y tener consecuencias más severas, por lo cual, sería un punto importante para analizar a futuro y, así, observar si este problema que se observa histológicamente, se acrecienta en animales de mayor edad y genera complicaciones de la función reproductiva y la salud en general, por ejemplo, disminuyendo la concentración de testosterona en sangre.

No se observaron cambios en el porcentaje de cabezas descondensadas en los espermatozoides de la progeie masculina, a diferencia de lo encontrado para la línea parental en un trabajo anterior, donde el consumo de etanol fue de 15 días (Sánchez et al., 2018 b), ni los niveles de ERO espermáticos. Tampoco se observaron diferencias en la fragmentación del DNA de la línea germinal de la descendencia evaluada en cortes de testículos. Estos datos sugieren que sólo el consumo directo de etanol aumenta los niveles de ERO causando fragmentación del DNA en la línea de células germinales y daño en los núcleos de los espermatozoides resultantes, ya que estos parámetros no se vieron afectados en el grupo F1-tratado, siendo semejantes a los resultados obtenidos en el grupo F1-control.

En cuanto a las MPT en los espermatozoides de la progeie, se encontró un aumento de las marcas H3K9me y H4K12ac en el grupo F1-tratado, lo que sugiere un efecto transgeneracional del consumo paterno de etanol sobre las modificaciones epigenéticas de la cromatina de los espermatozoides. Si bien no se observó un aumento de estas marcas en la línea parental, el consumo de etanol podría estar favoreciendo la retención de esta histona modificada en los espermatozoides de la descendencia masculina, a través de algún mecanismo aún por descubrir, o su incorporación *de novo* en las gametas de la descendencia. En base a los resultados observados en este trabajo no podemos establecer una relación causa-efecto de la variación de MPT de histonas afectadas entre la línea parental y su progeie, debido a que

los mecanismos por los cuales se producen estas modificaciones no fueron estudiados. Sin embargo, sabemos que estas modificaciones de histonas alteradas en los espermatozoides son de relevancia para el espermatozoide. Se ha reportado que la modificación de histona H3K9me aumenta durante el proceso de meiosis en la espermatogénesis y luego, hacia el final de la espermiogénesis es esencial que se remueva (Okada et al., 2007; Capra et al.; 2019; Ge et al.; 2019). También se ha asociado a esta marca a los promotores de *Prm1* y *Tnp1* actuando como represora de estos genes cuya expresión es fundamental para el correcto proceso de espermiogénesis. A su vez, Gaydos, et al. han reportado en *C. elegans* que la presencia de H3K9me actúa como una marca represiva mediante formación de heterocromatina en los espermatozoides, y muestran que la metilación de H3K9 proporciona un modo alternativo de transmitir la represión de X a la progenie (probablemente mediante la retención del estado heterocromático que experimentó durante la espermatogénesis). Por otro lado, Van der Heijden et al. (2006), informaron que después de la fecundación, los espermatozoides se descondensan rápidamente y su cromatina se llena de nucleosomas maternos, conservando las marcas espermáticas de H4K12ac. También se ha asociado la marca de H4K12ac con una importante influencia paterna sobre la expresión genética en cigotos debido a que pasa a los mismos y puede estar involucrada en el desarrollo temprano de los embriones (van der Heijden et al., 2006). A su vez se ha observado la presencia de esta marca en cercanía a los sitios de inicio de la transcripción de genes expresados en altos niveles en cigotos tempranos y de genes asociados a la organización de la cromatina (Paradowska et al., 2012). En ese mismo trabajo, también se ha propuesto que una aberrante acetilación de histonas en los espermatozoides puede reflejar fallas en la compactación de la cromatina espermática resultando en una inapropiada transferencia de información epigenética al ovocito. En un trabajo de Vieweg et al. se ha encontrado que la marca de H4K12ac co-localiza con 5mC en el núcleo espermático y que la misma podría tener un rol importante en la acumulación de factores de transcripción y en la regulación de la expresión génica durante la embriogénesis temprana. De manera relevante, Brykczynska et al. (2010) propusieron que los factores ambientales y los hábitos de comportamiento pueden generar variabilidad y retención de histonas modificadas en los espermatozoides y provocar una remodelación incompleta de la cromatina durante el desarrollo de los espermatozoides. En base a estos datos creemos que es necesario evaluar la capacidad reproductiva de los ratones de la F1 con el fin de identificar las posibles consecuencias que estas variaciones epigenéticas podrían tener sobre su

capacidad fecundante o sobre su progenie (F2). Esta fundamentación fue incorporada en la discusión del manuscrito.

Existe un consenso sobre la importancia temprana del ambiente, por ejemplo, *in utero*, jugando un papel fundamental en la reprogramación que determina la salud o la enfermedad del adulto y que, en gran medida, se debe a la epigenética (Aagard-Tillery et al., 2010). Varios autores han analizado el impacto del consumo materno de alcohol en su descendencia, pero el efecto del consumo paterno de alcohol sobre este tema está poco investigado. Recientemente se ha prestado una atención especial al impacto duradero de la exposición prolongada a toxinas introducidas tales como nicotina, alcohol, drogas de abuso y compuestos químicos de síntesis. Con respecto a estos últimos, existe evidencia que los cambios epigenéticos en respuesta a los llamados “disruptores endocrinos” pueden manifestarse en la línea germinal y transmitirse “transgeneracionalmente” (Crewset al., 2012), un concepto que emerge en los campos de estrés prenatal y nutrición fetal. Para poder apreciar cómo un evento que ocurre durante una exposición fetal puede permanecer a través de múltiples generaciones, requiere un entendimiento de la temporalidad y los orígenes de la reprogramación de las células germinales, que ocurre durante el desarrollo fetal y crea una ventana de oportunidad o vulnerabilidad, para la impronta del ambiente a lo largo de y más allá de la vida individual. Se necesitan más estudios que se centren en el consumo paterno para cambiar hacia un paradigma que reconozca la contribución paterna decisiva a los efectos transgeneracionales deletéreos de la intoxicación por alcohol, en lugar de considerar el consumo materno como el único factor causante de estas complicaciones. En lo que respecta a este estudio, aquí proporcionamos contribuciones relevantes sobre el efecto directo de la ingesta de etanol en la línea germinal de individuos masculinos intoxicados, así como algunos de sus efectos indirectos sobre la salud reproductiva de su progenie masculina, con indicaciones muy sugestivas de efectos. Entendemos que la transmisión hereditaria de marcas epigenéticas dependa, también, de otras condiciones tanto propias del individuo como también del ambiente y la conjunción de otros hábitos comportamentales por lo que resulte difícil asignar unidireccionalmente responsabilidades a una determinada modificación post traduccional de histonas, pero los resultados que se han presentado en este trabajo de tesis doctoral ciertamente abren la puerta para un estudio más profundo del papel de la epigenética en los efectos tóxicos de la ingesta de etanol por el macho de la pareja.

Capítulo II. Estudio de las modificaciones epigenéticas en
espermatozoides en el modelo humano y su participación en los
tratamientos de reproducción asistida (TRA)

En este capítulo se analizó la presencia de diferentes marcas epigenéticas en los espermatozoides humanos de donantes normozoospermicos y pacientes infértiles con indicación de realizar tratamientos de reproducción asistida (TRA) y se evaluó su relación con diferentes parámetros espermáticos como también el éxito de los tratamientos.

INTRODUCCIÓN

Infertilidad y tratamientos de reproducción asistida (TRA)

La infertilidad se define como la incapacidad de concebir después de 12 meses de relaciones sexuales sin protección y de 6 meses en el caso de las mujeres mayores a 35 años. Aproximadamente, el 15% de las parejas a nivel mundial se ven afectadas por la infertilidad. La infertilidad debida a un factor masculino afecta al 50% de estas parejas y se observó que actúa como el único contribuyente en un 20% de esos casos y, en conjunto con el factor femenino, en el 30% de los casos restantes (Choy y Eisenberg, 2018). Existe, a su vez, un 6% de los casos en que la infertilidad se debe a causas sin explicación. En el mundo, más de 186 millones de personas sufren de infertilidad y, de estos casos, la mayoría ocurre en países desarrollados (Inhorn y Patrizio, 2015). Si bien la mayor causa del aumento de los casos de infertilidad se debe a la edad materna avanzada, otros factores tales como el estilo de vida y factores ambientales también influyen en este aumento en la incapacidad/dificultad para concebir (Borghet y Wyns, 2018).

Los TRA surgieron en la década del 1970. En 1973, por primera vez se consiguió el primer embarazo mediante TRA en manos del equipo de Monash University, el cual no llegó a su fin y sólo duró unas pocas semanas. Recién en 1978 nació el primer bebé “de probeta”, denominado así por haber sido fecundado de manera *in vitro* a través de la técnica de fecundación *in vitro* (FIV), por los doctores Steptoe y Edwards (Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2010 por sus aportes al desarrollo de la fertilización *in vitro*) (Steptoe y Edwards, 1978; Edwards et al., 1980). Con el éxito de este primer tratamiento se abrió una gran puerta a la investigación y al avance de los TRA, desarrollando protocolos detallados de estimulación ovárica, criopreservación y donación de gametas. Años más tarde se desarrolló la técnica de microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y el diagnóstico genético

preimplantacional (DGP) que son herramientas valiosas para la solución de problemas severos de infertilidad o de enfermedades genéticas hereditarias.

Durante las últimas dos décadas, el número de nacidos vivos por medio de los TRA está en gran aumento, observándose cifras de 14.500 casos en 1996 que, en el año 2016, se habían quintuplicado (76.930) (DeAngelis et al., 2018).

Desarrollo embrionario

En la década de 1950 se caracterizaron, por primera vez, los embriones humanos previos a la implantación (Hertig et al., 1954; Hertig et al., 1956). En ese momento se hicieron observaciones clave incluyendo la dinámica de fecundación. El desarrollo embrionario humano comienza con la transición de ovocito a embrión con una actividad transcripcional reducida que dura, aproximadamente, 3 días. En estos primeros estadios ocurre la fusión del ovocito y el espermatozoide, la migración y fusión de los pronúcleos (singamia), la reprogramación genética y epigenética y las primeras divisiones celulares que culminan con la activación del genoma embrionario entre las etapas de 4 y 8 células (Niakan et al., 2012). En un estudio de Taylor et al. (1997) se informó la detección inicial de transcripciones paternas en la etapa de 3 a 4 células en embriones humanos.

Dobson et al. (2004) observaron que alrededor de 1800 mRNA se modulaban durante los primeros 3 días del desarrollo embrionario, siendo la mayoría dirigidos a su eliminación y muy pocos dirigidos a su síntesis durante los días 1 y 2. En el día 3 se observaba un gran grupo de mensajeros que aumentaba en abundancia, sugiriendo que los mismos eran proporcionados por la activación del genoma embrionario y que, los correspondientes a los días anteriores, se debía a una actividad transcripcional menor proporcionada por el genoma paterno o materno, o por mensajeros maternos estables que se degradan rápidamente. En ese estudio demostraron, también, que la activación del genoma embrionario era independiente del número de células dado que se observaba al día 3, incluso en embriones que se detenían con menos de 8 células. Una vez iniciada la activación del genoma embrionario, el embrión se compacta para formar una mórula que es la primera estructura que marca la ruptura de la simetría radial. Los cambios morfológicos, tales como la compactación o la cavitación, son más dependientes del tiempo de desarrollo post fecundación que del número de células. Las divisiones celulares posteriores, conducen al desarrollo de un blastocisto que comprende un

blastocelo (cavidad llena de líquido) y una masa celular interna (MCI) rodeada de células del trofoblasto (TB) (Niakan et al., 2012).

Empleando las técnicas de “time lapse” (lapso de tiempo) para evaluar la morfología embrionaria, se observó que el desarrollo exitoso a la etapa de blastocisto puede predecirse desde la etapa de 4 células, basándose en los parámetros temporales de las primeras 3 divisiones (Wong et al., 2010). Debido a que esta estimación puede hacerse en embriones previo a la activación del genoma embrionario, es probable que el éxito del mismo esté influenciado, en gran parte, por la herencia de factores maternos/paternos del cigoto (Niakan et al., 2012). En particular, el desarrollo de embriones humanos es ineficaz, con un 50-70% de embriones que habitualmente no alcanzan la etapa de blastocisto *in vitro* (Gardner et al., 2000; French et al., 2010) y hasta un 50% de manera similar fallan *in vivo* (Hertig et al., 1954).

Implicancia de la calidad espermática en el éxito de los TRA y el desarrollo embrionario

Las causas de la subfertilidad masculina son muy variadas y en la mayoría de los casos no se comprende bien. Aunque se dispone de varias pruebas de diagnóstico (Figura 43), su interpretación es imprecisa y, muchas veces, subjetiva. Si bien la técnica de ICSI hizo posible lograr un embarazo con muestras de semen de mala calidad o con espermatozoides extraídos de biopsias testiculares, los efectos de la calidad espermática sobre la descendencia pueden ser de suma importancia (Agarwal et al., 2020). Existe evidencia que la salud paterna al momento de la concepción puede afectar la salud metabólica de la descendencia y su potencial reproductivo, a través de la transmisión transgeneracional de modificaciones epigenéticas (Craig et al., 2017).

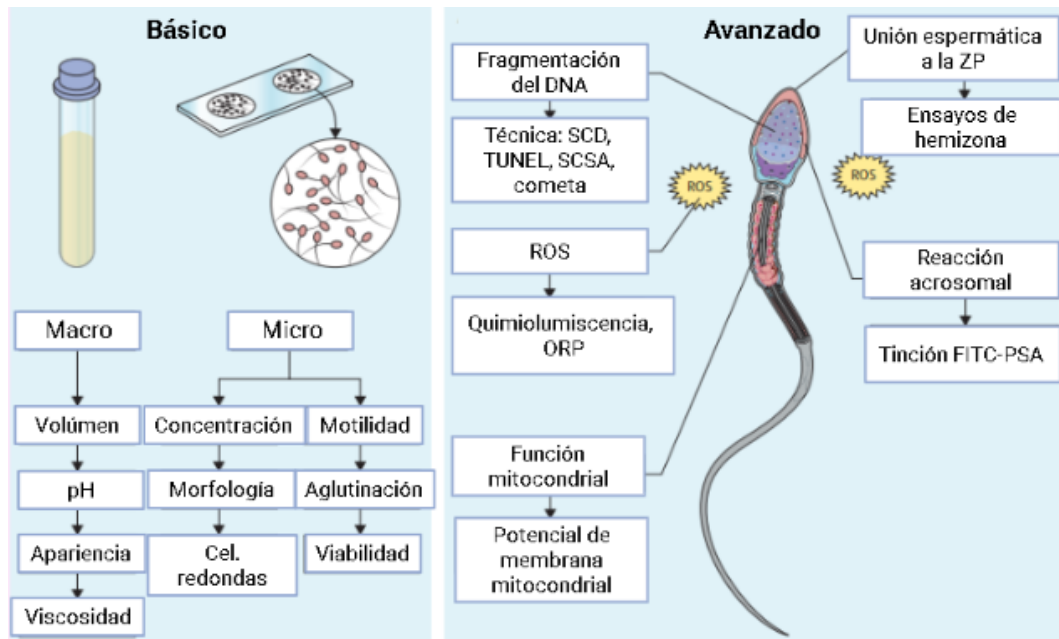


Figura 43: Evaluación de infertilidad masculina. Análisis básico de semen comparando parámetros macroscópicos y microscópicos. Análisis avanzado de funcionalidad espermática a través de la determinación de ROS, fragmentación del DNA, RA, entre otros (Adaptado de Agarwal et al., 2020).

Varios factores paternos, tales como las anomalías en la estructura del espermatozoide, la fragmentación del DNA espermático, los defectos epigenéticos, las aneuploidías y microdeleciones del cromosoma Y (Figura 44), están en juego durante el desarrollo embrionario y afectan significativamente a la calidad embrionaria en los TRA.

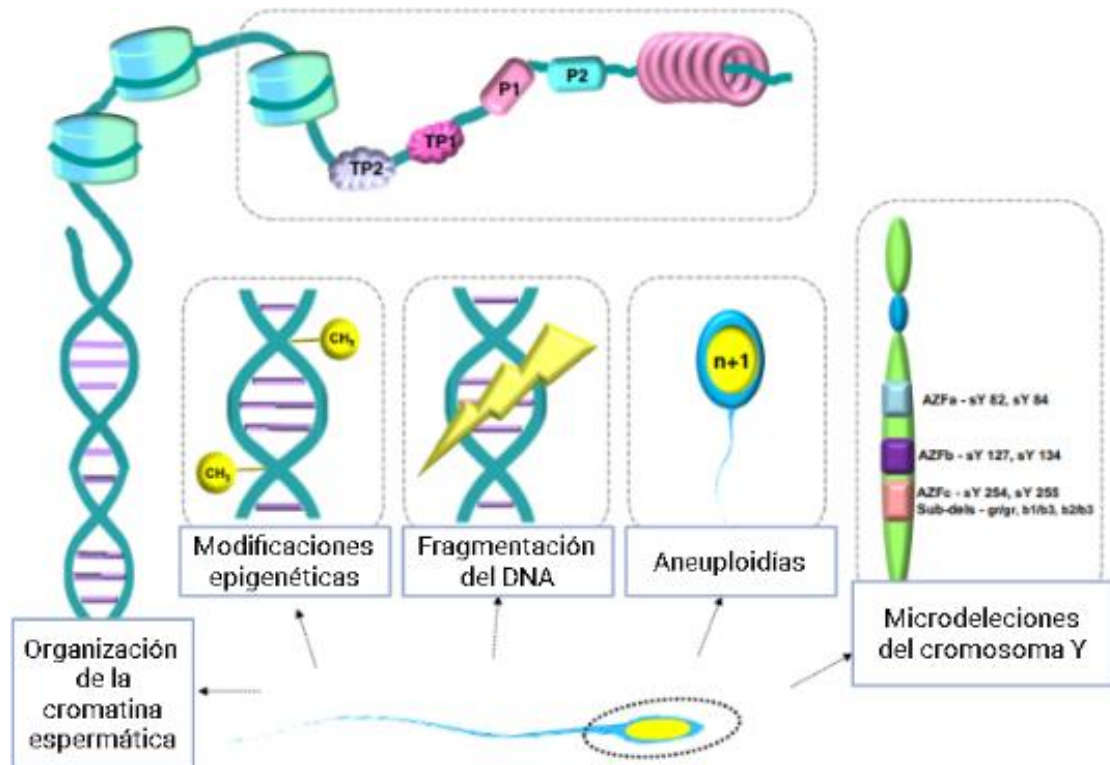


Figura 44: Defectos genéticos detectados en los espermatozoides (Adaptado de Colaco S. y Sakkas D., 2018).

Dichos efectos pueden variar, desde una disminución en el % de fecundación, la blastulación hasta, incluso, afectar la implantación embrionaria (Figura 45). Por este motivo, el análisis de los factores espermáticos es esencial para garantizar la buena calidad embrionaria y su resultado: un niño sano (Colaco y Sakkas, 2018).

La búsqueda de un marcador de calidad embrionaria, que permita seleccionar al mejor embrión individual para la transferencia, aún es un desafío para la ciencia y para los TRA.

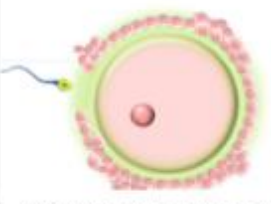



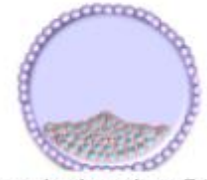

Estadio	a Fecundación	b Cigoto	c Clivado 4-células
			
Defecto	Cromatina descondensada	Cromatina inmadura, P1/P2 alterada, microdeleciones	P1/P2 alterada, ruptura del DNA, defecto en centrosoma
Efecto	Disminuye la capacidad fecundante	Disminuye la tasa de fecundación	Arresto 2-6 células, baja tasa de clivaje, huso anormal
Estadio	d Mórula	e Blastocisto	f Feto
			
Defecto	Cromatina inmadura, alta cantidad de histonas, microdeleciones	Cromatina inmadura, P1/P2 alterada, histonas/protaminas alterada, microdeleciones, fragmentación del DNA	Aneuploidía, P1/P2 alterada, hipermetilación del DNA y fragmentación, microdeleciones
Efecto	Tasa de clivaje alterada	Pobre desarrollo y calidad embrionaria, baja tasa de formación de blastocito	Aneuploidía embrionaria, baja calidad embrionaria, falla implantación y tasa de embarazo

Figura 45: Factores genéticos de origen paterno que impactan en la calidad embrionaria.

(a) Defectos estructurales de la cromatina espermática que disminuye la capacidad fecundante. (b) Alteraciones espermáticas que influyen sobre la tasa de fecundación. (c) Defectos sobre el estadio de 4 células generado por alteraciones espermáticas. (d) Variaciones en la cinética de clivaje con alteraciones espermáticas. (e) Defectos espermáticos conducen a una falla en el desarrollo de blastocistos. (f) El crecimiento fetal posterior a la implantación puede verse alterado por alteraciones a nivel espermático

(Adaptado de Colaco y Sakkas, 2018).

Hipótesis y objetivos

En la actualidad existen varias técnicas de selección de espermatozoides que se utilizan de forma rutinaria en la mayoría de las clínicas de fecundación asistida con el objetivo de seleccionar el espermatozoide más apto para fecundar. Sin embargo, muchas de estas técnicas no tienen como objetivo evaluar características importantes de los espermatozoides que pueden contribuir significativamente a mejorar la calidad embrionaria. Es por este motivo que proponemos el análisis de diferentes modificaciones de histonas como posibles indicadores de funcionalidad espermática y éxito de los TRA.

Un corolario importante de la reprogramación epigenética en ambos, gametas y cigoto, converge con el concepto de programación temprana en la vida. Cada vez se hace más aparente que cambios en los perfiles epigenéticos pueden ocurrir como una consecuencia no atendida de las Técnicas de Reproducción Asistida, tales como la fecundación *in vitro* o el ICSI. Estas preocupaciones se refuerzan por los informes de incrementos en la incidencia de desórdenes de impronta genética (“imprinting”) debido a un mantenimiento inapropiado de la metilación del DNA, conservando el sesgo en la expresión materna o paterna de un limitado, pero importante, grupo de genes. Los síndromes de Beckwith-Wiedemann (DeBaun et al., 2003, Maher et al., 2003) y Angelman (Orstavik et al., 2003), conocidos, aunque raros desórdenes de la impronta genética, presentan una mayor incidencia en nacidos por TRA comparados con la población general.

Por lo tanto, es necesario un mayor cuidado, más investigación basada en la evidencia e impulsada por hipótesis claras y mayor transparencia en los métodos y reactivos utilizados en TRA para asegurar mejores prácticas y menores riesgos (Niemitz y Feinberg, 2004).

Por lo expuesto, proponemos que las modificaciones post traduccionales de las histonas tienen un efecto en el éxito de los tratamientos de reproducción asistida.

De la hipótesis propuesta se desprenden los siguientes objetivos específicos:

- 1- Evaluar en muestras de semen de donantes normozoospermicos y de pacientes infértiles 6 MPT de histonas.
- 2- Correlacionar la abundancia de las MPT de histonas analizadas con diferentes parámetros espermáticos e indicadores de éxito de los TRA.

Resultados

3.1 Análisis de las MPT de histonas en espermatozoides humanos.

Teniendo en cuenta que las histonas remanentes en la cromatina espermática se han encontrado asociadas a promotores de genes relevantes para el desarrollo embrionario temprano, se analizaron las variantes de histonas en muestras de espermatozoides de donantes normozoospermicos y de pacientes infértiles mediante inmunofluorescencia. A su vez, se analizó el patrón de localización de las mismas en la cabeza de los espermatozoides y se observó que el patrón se conservó en todos los individuos analizados, y que la localización particular para cada una de las histonas modificadas fue la misma para ambos grupos experimentales. Se observó la marca positiva de H3K4me3 en la región basal de la cabeza del espermatozoide. La marca positiva de H3K27me3 se localizó, principalmente, en la región del segmento ecuatorial y hacia la región basal de la cabeza. La marca correspondiente a H3K9me2 / me3 se localizó en la región basal de la cabeza. La marca positiva para H3K4me2 se distribuyó homogéneamente por la cabeza al igual que la marca correspondiente a la marca de H3K9me. H4K12ac presentó una marca intensa en la región apical de la cabeza del espermatozoide y en la región basal, sin distribuirse en la región correspondiente al segmento ecuatorial (Figura 46 A-F).

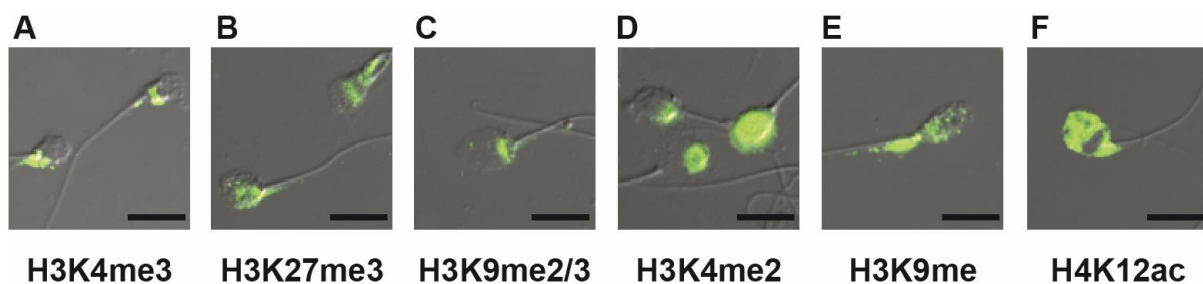


Figure 46 Modificaciones post traduccionales (MPT) de histonas en espermatozoides de donantes y pacientes infértiles. Imágenes representativas de la localización de las marcas positivas (verde) de las MPT de histonas en espermatozoides humanos (A) H3K4me3, (B) H3K27me3, (C) H3K9me2/3, (D) H3K4me2, (E) H3K9me, (F) H4K12ac. Barra de escala, 10 μ m.

Se observó una gran variabilidad en los porcentajes de espermatozoides marcados positivamente entre los individuos pertenecientes a cada grupo: donante (Figura 47) y pacientes infértiles (Figura 48). Al comparar las medias de los porcentajes de espermatozoides marcados para cada histona, entre los dos grupos experimentales no se observaron diferencias significativas entre para las diferentes modificaciones de histonas analizadas (Figura 49).

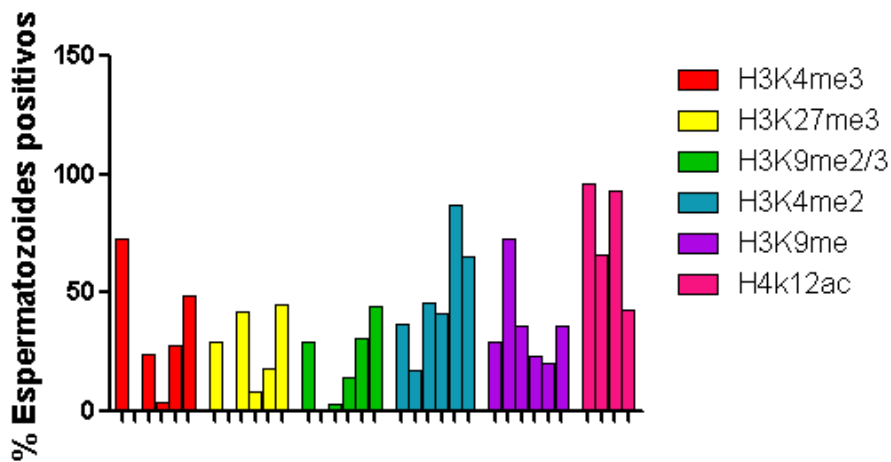


Figura 47: Modificaciones post traduccionales (MPT) de histonas en espermatozoides de donantes. Se analizaron 7 MPT de histonas (H3K4me3, H3K27me3, H3K9me2/3 H3K4me2, H3K9me, H4K12ac) en espermatozoides de donantes (n=6). Se observa heterogeneidad en el porcentaje de espermatozoides marcados positivamente entre los donantes evaluados.

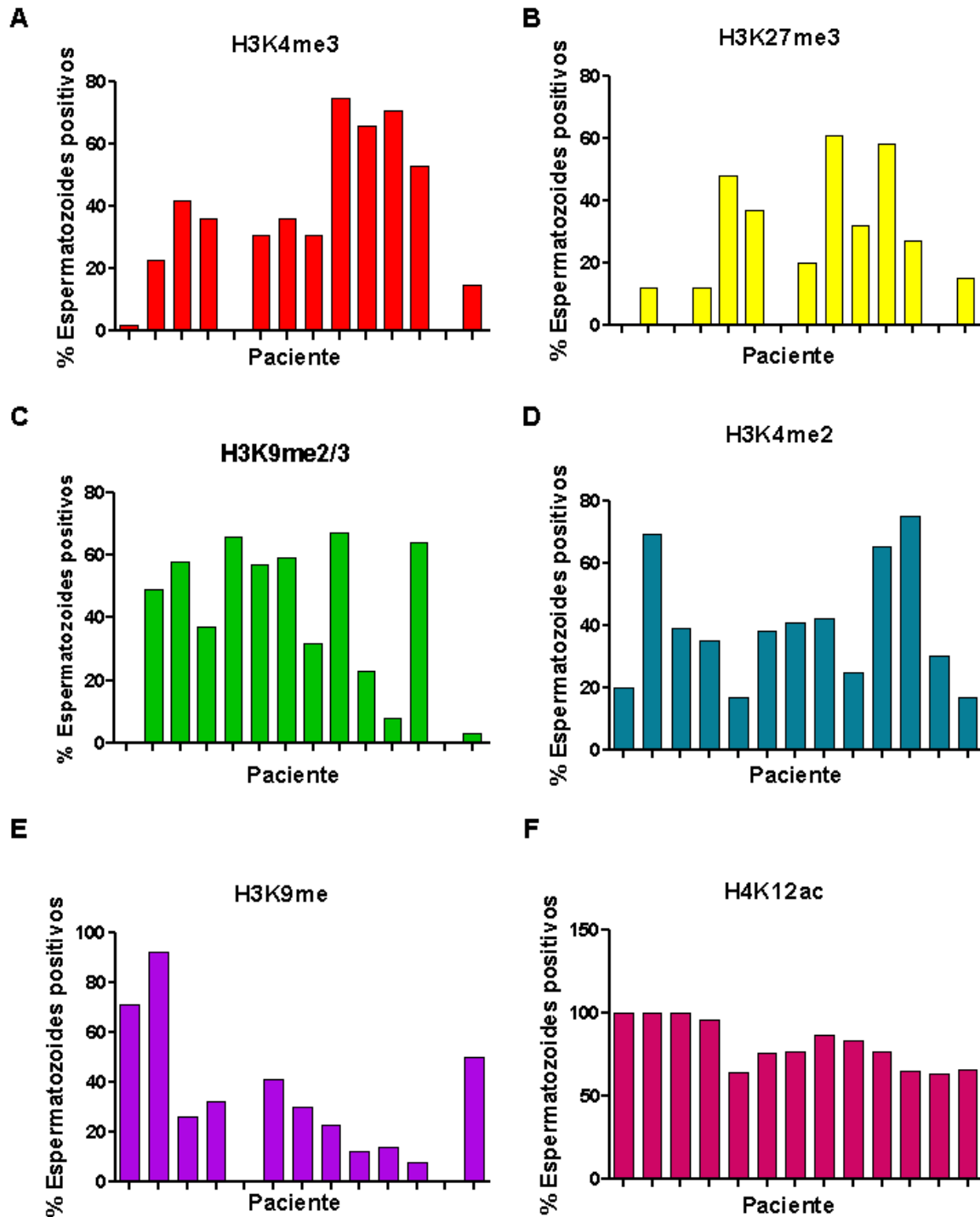


Figura 48: Modificaciones post traduccionales (MPT) de histonas en espermatozoides de pacientes. Se analizaron 7 MPT de histonas (H3K4me3, n=12; H3K27me3, n=12; H3K9me2/3, n=11; H3K4me2, n=10; H3K9me, n=12; H3K12ac, n=11) en espermatozoides de pacientes infértiles. Se observa heterogeneidad en el porcentaje de espermatozoides marcados positivamente entre los pacientes infértiles evaluados.

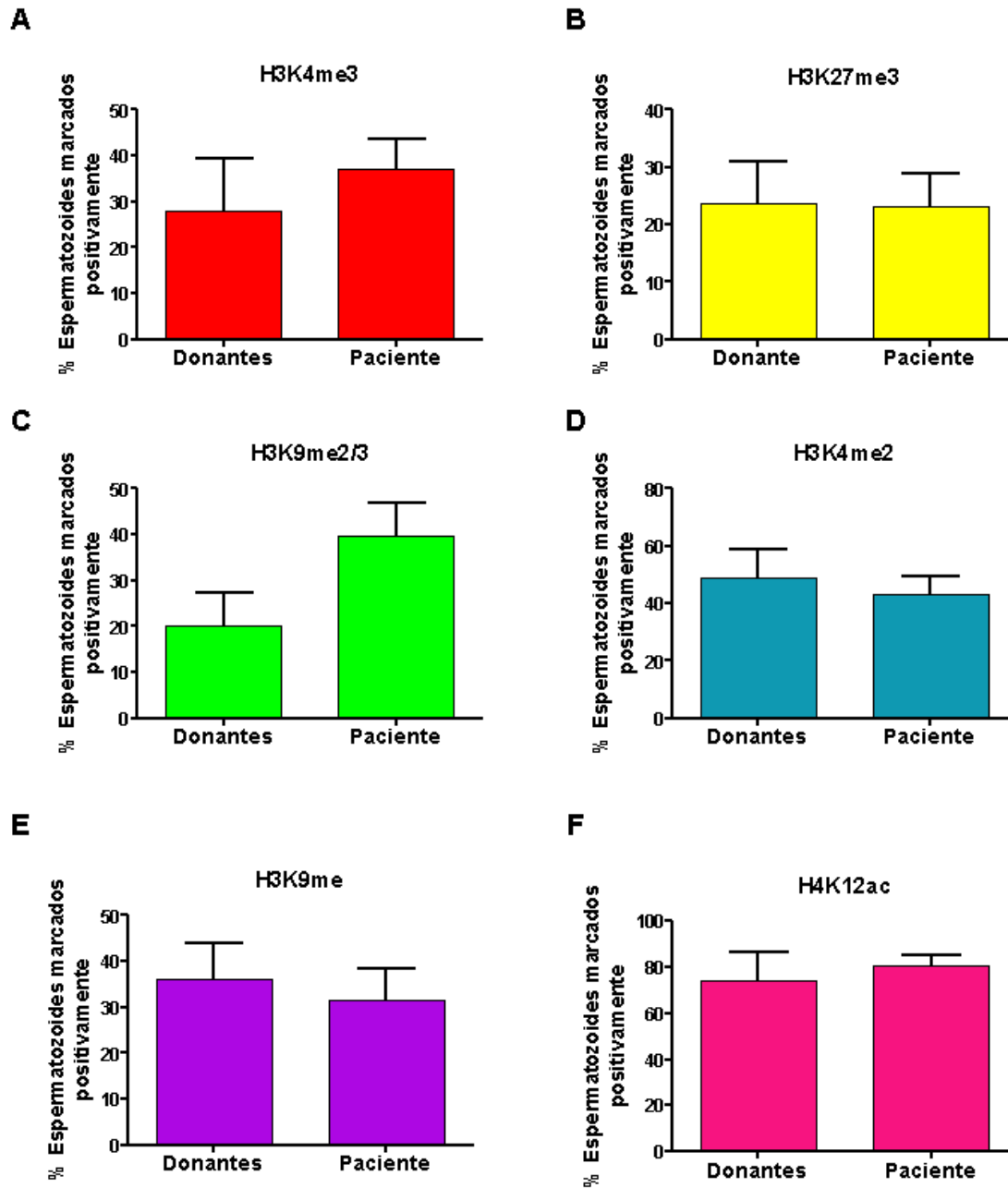


Figura 49: Modificaciones post traduccionales (MPT) de histonas en espermatozoides de donantes y pacientes. Se analizaron las 7 MPT de histonas. A) H3K4me3: donantes n=5, pacientes n=12; B) H3K27me3: donantes n=5, pacientes n=12; C) H3K9me2/3: donantes n=5, pacientes n=11; D) H3K4me2: donantes n=6, pacientes n=10; E) H3K9me: donantes n=6, pacientes n=12; H4K12ac: donantes n=4, pacientes n=11) en espermatozoides de donantes y pacientes y no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de espermatozoides marcados entre los dos grupos. Test de Students, *p > 0.05

3.2. Relación entre las modificaciones de histonas y diferentes parámetros asociados a la calidad espermática

Con el fin de hacer una aproximación de la importancia del análisis de diferentes modificaciones de histonas asociadas a la cromatina espermática en los espermatozoides humanos y su relación con la funcionalidad de estos, se analizó la relación existente entre dichas MPT de histonas con parámetros espermáticos básicos. Para este estudio se utilizaron las muestras de donantes normozoospermicos y de pacientes infértiles.

En los donantes normozoospermicos se observó una correlación negativa entre la modificación en la histona H3K4me3 y la H3K27me3 con la motilidad ($p < 0,05$ en ambos casos). Sin embargo, no existió correlación para el resto de las histonas analizadas (Figura 50).

En los pacientes se encontró una correlación positiva entre la MPT de H3K4me3 con la motilidad espermática ($p < 0.05$) sin encontrarse esta correlación para el resto de las histonas analizadas (Figura 51).

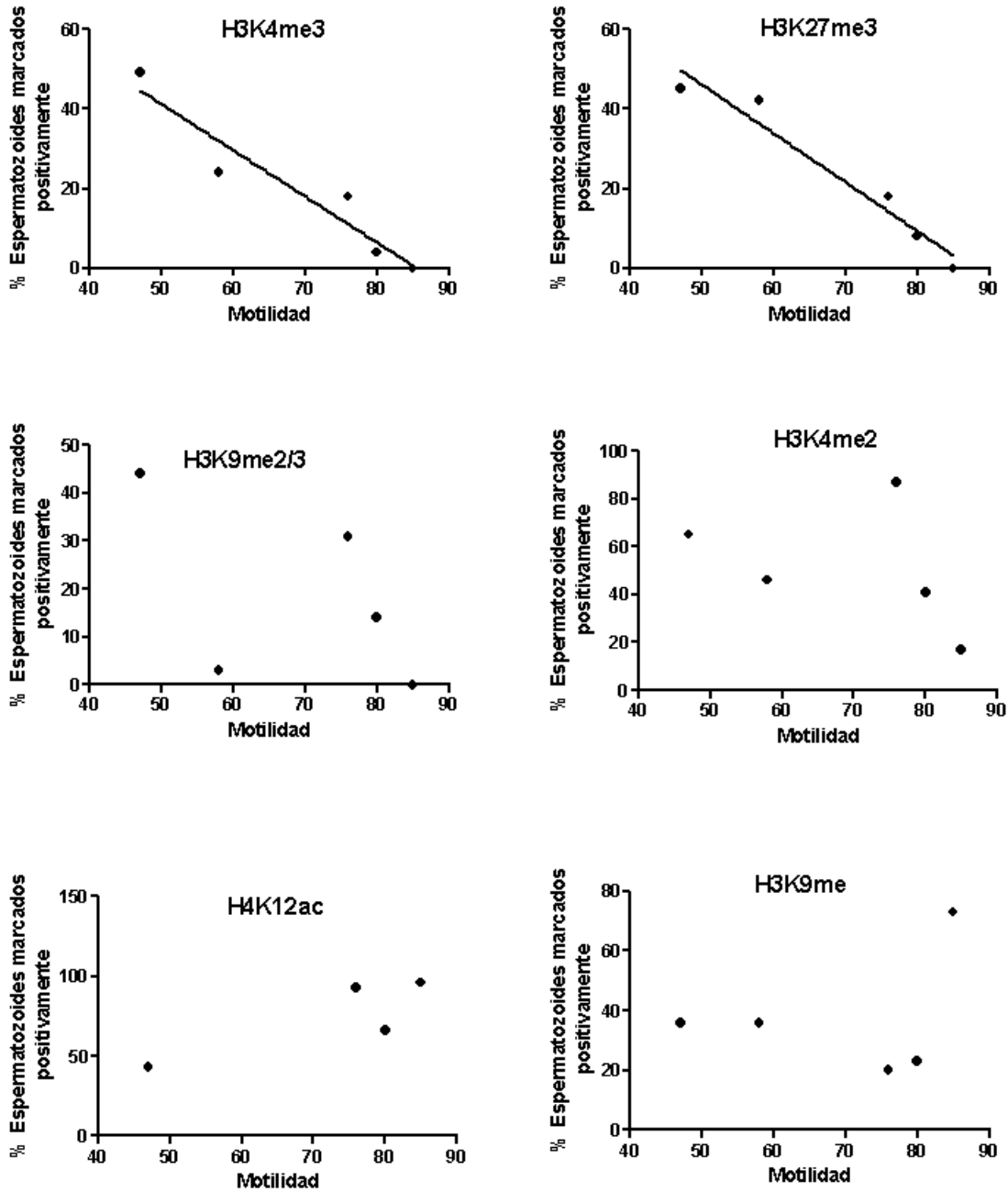


Figura 50: Correlación entre motilidad y MPT de histonas en espermatozoides de donantes. Se analizó la correlación entre las 7 MPT de histonas. A) H3K4me3 n=5; B) H3K27me3 n=5; C) H3K9me2/3n=5; D) H3K4me2 n=6; E) H3K9me n=6; H4K12ac n=4) con la motilidad espermática de la muestra recibida, encontrándose una correlación negativa para H3K4me3 ($p < 0,05$) y con H3K27me3 ($p < 0,05$). Coeficiente de correlación de.

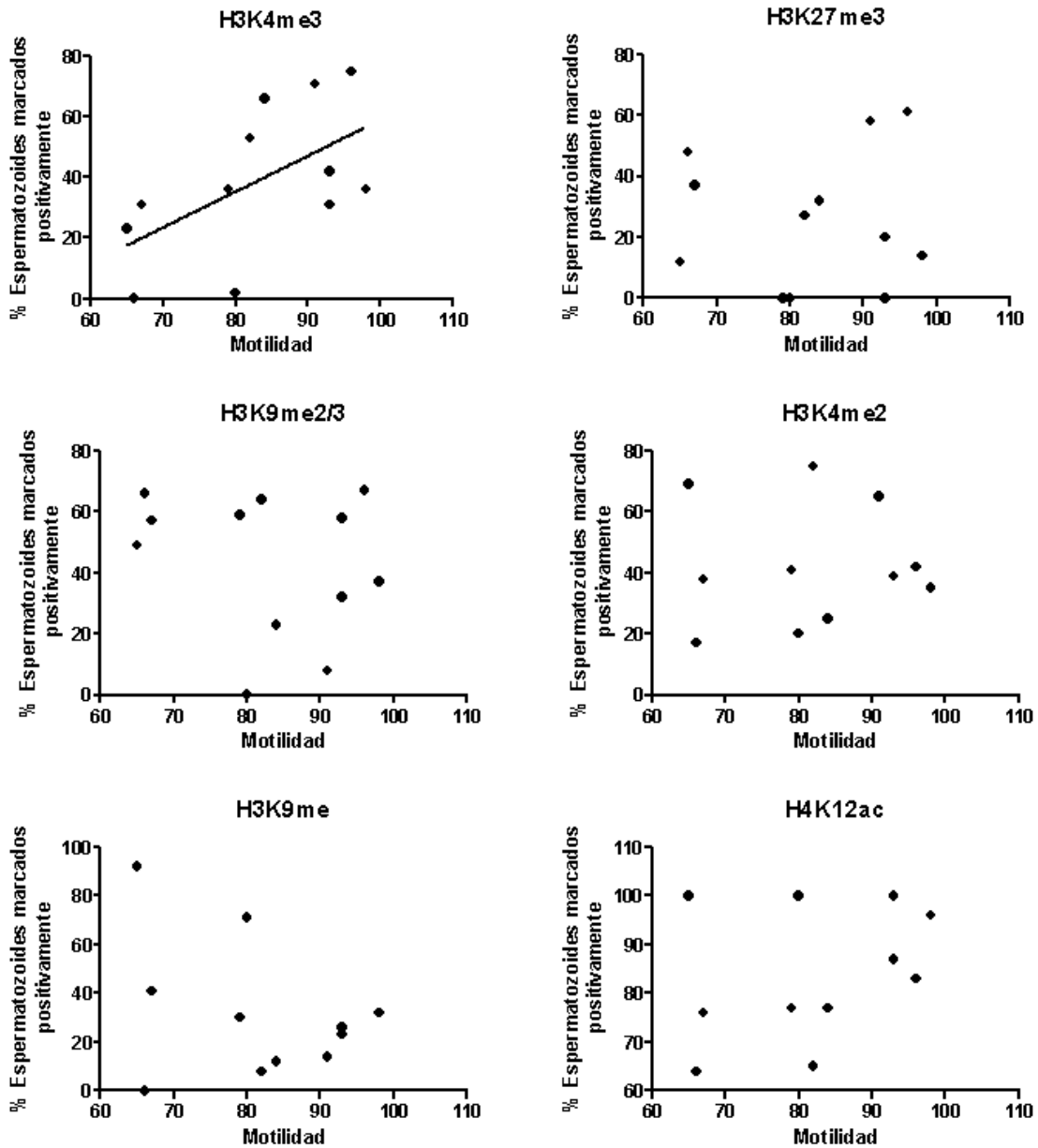


Figura 51: Correlación entre motilidad y MPT de histonas en espermatozoides de pacientes. Se analizó la correlación entre las 7 MPT de histonas. A) H3K4me3 n=12; B) H3K27me3 n=12; C) H3K9me2/3n=11; D) H3K4me2 n=10; E) H3K9me n=12; F) H4K12ac n=11 con la motilidad espermática post selección espermática mediante gradiente de densidad, encontrándose una correlación positiva con H3K4me3 ($p < 0,05$). Coeficiente de correlación de Spearman.

3.3. Relación entre las modificaciones de histonas y diferentes parámetros asociados al éxito de los TRA.

En las clínicas de reproducción asistida realizan una evaluación de la fecundación y clasificación embrionaria con el fin de propiciar un seguimiento y posterior selección del embrión más apto para la transferencia. Esta evaluación posee diferentes etapas, la evaluación de la fecundación, del clivaje y de la calidad embrionaria, las que se realizan a diferentes tiempos y son clave a la hora de decidir el destino de cada embrión. Con el fin de analizar si las modificaciones de histonas asociadas al DNA espermático de pacientes infértiles, se asociaba con estos parámetros, se analizó una posible correlación entre las MPT de histonas estudiadas con el % de fecundación y el score embrionario.

En primer lugar, se observó que la MPT de histonas H3K4me3 correlacionaba negativamente y que la MPT de histona H3K9me correlacionaba positivamente con el porcentaje de fecundación. No se observó correlación de este parámetro para el resto de las histonas analizadas (Figura 52).

Luego, se analizó si existía una correlación de las MPT de histonas con el score embrionario y se observó que la histona H3K27me3 correlacionó negativamente con este parámetro. No se observó correlación alguna para el resto de las histonas analizadas (Figura 53).

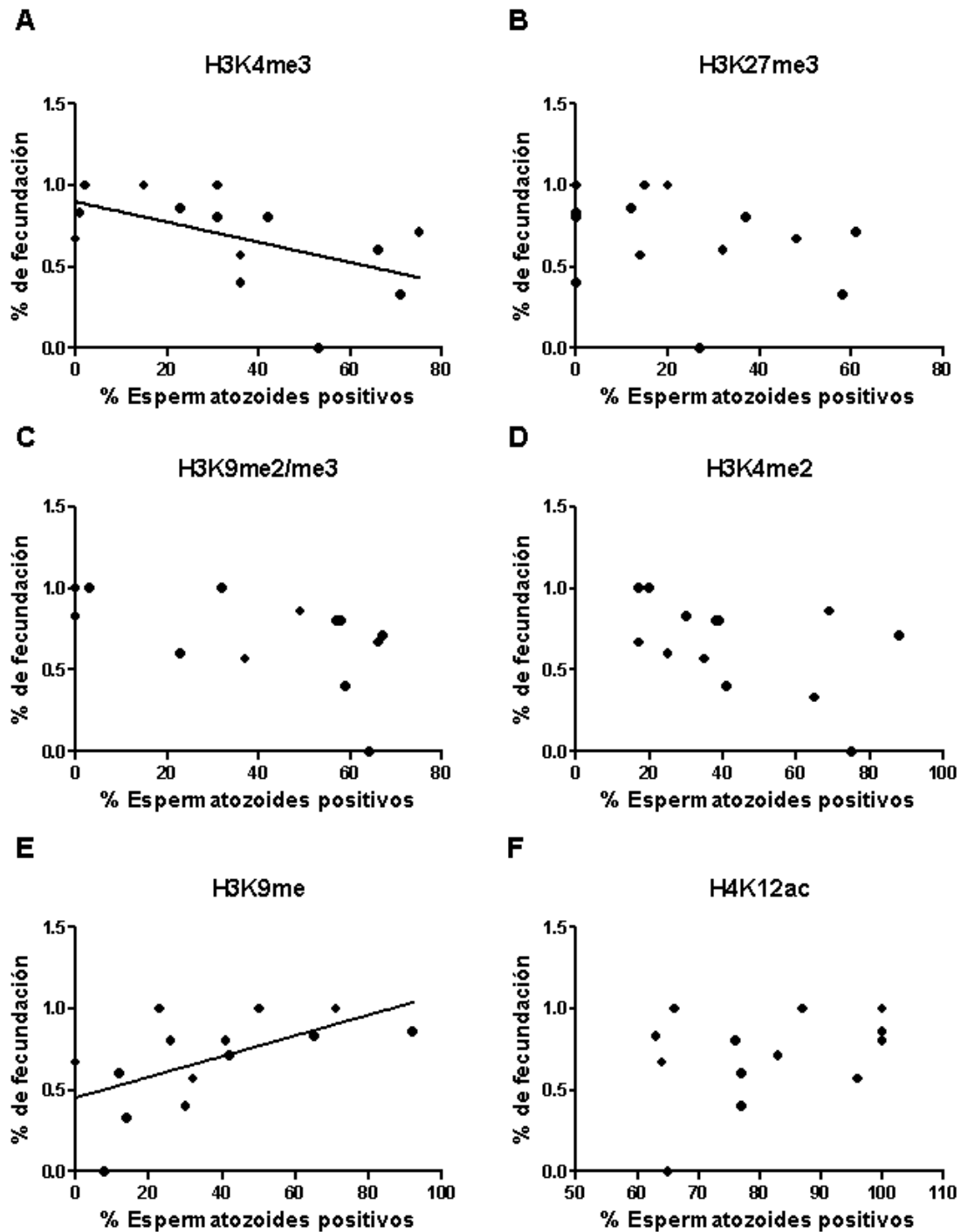


Figura 52: Correlación entre el % de fecundación y las modificaciones post-traduccionales (MPT) de histonas en espermatozoides de pacientes. Se analizó la correlación entre las 7 MPT de histonas: A) H3K4me3 n=14; B) H3K27me3 n=14; C) H3K9me2/3n=14; D) H3K4me2 n=13; E) H3K9me n=13; F) H4K12ac n=13, con el % de fecundación encontrándose una correlación negativa con H3K4me3 ($p < 0,05$) y positiva con H3K9me ($p < 0,05$). Coeficiente de correlación de Spearman.

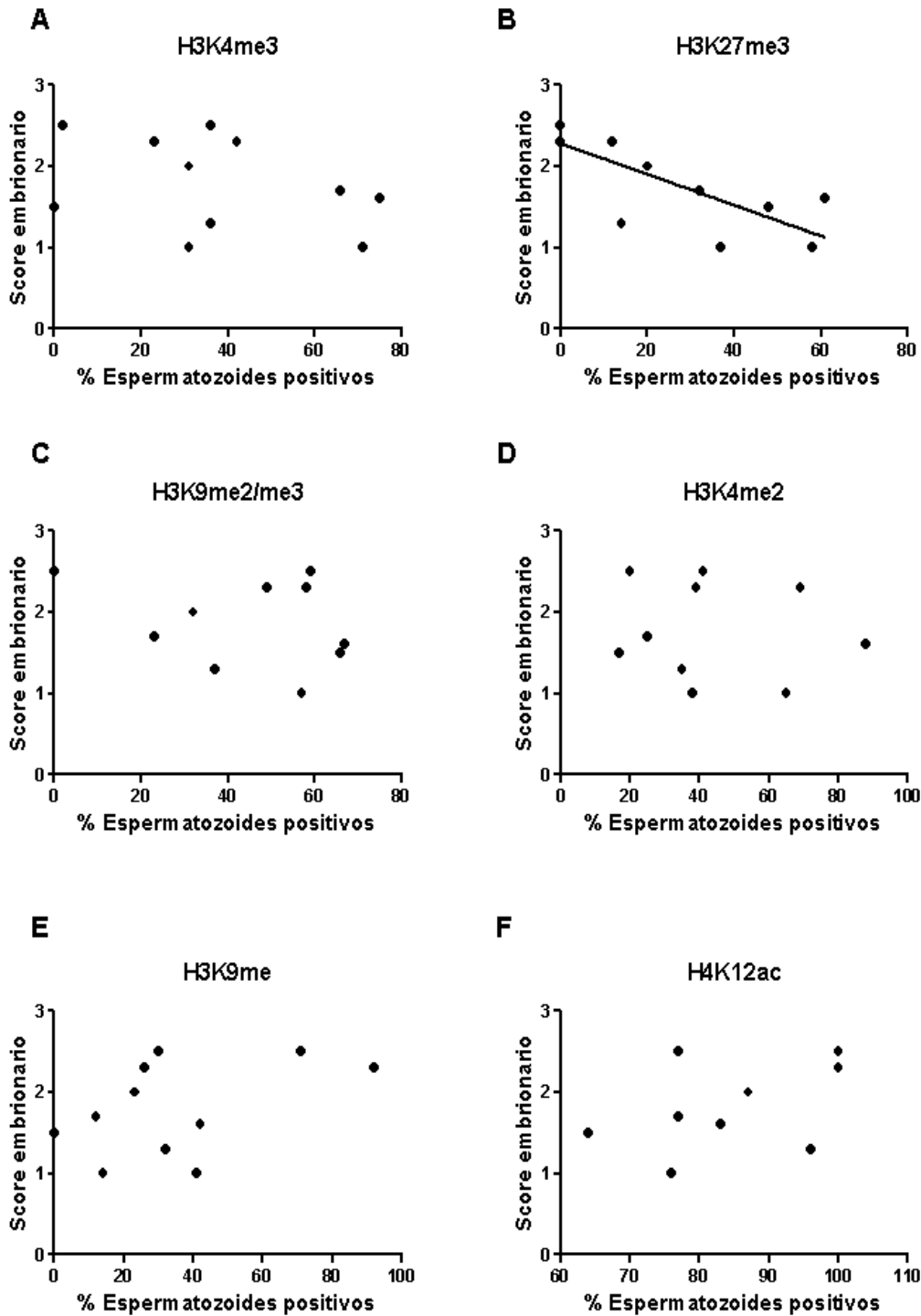


Figura 53: Correlación entre el score embrionario y las modificaciones post-traduccionales (MPT) de histonas en espermatozoides de pacientes. Se analizó la correlación entre las 7 MPT de histonas. A) H3K4me3 n=9; B) H3K27me3 n=9; C) H3K9me2/3n=9; D) H3K4me2 n=8; E) H3K9me n=8; H4K12ac n=8) con el score embrionario encontrándose una correlación negativa con H3K27me3 ($p < 0,05$). Coeficiente de correlación de Spearman.

Discusión

En el segundo capítulo se analizó la relación entre la presencia de diferentes marcas epigenéticas presentes en los espermatozoides humanos de donantes normozoospermicos y pacientes infértiles, con diferentes parámetros espermáticos y con ciertos indicadores de éxito en los tratamientos.

Los TRA son herramientas muy útiles y ampliamente utilizadas en todo el mundo para tratar los problemas de infertilidad o subfertilidad. Sin embargo, no siempre tienen éxito para lograr un embarazo clínico y un bebe nacido, que es el fin esperado. En los casos en que estas técnicas fallan, la gran pregunta a responder es por qué, y, muchas veces, no hay respuesta evidente a este interrogante. Es en estos casos donde uno más tiene que indagar qué sucede para poder, en un futuro, tratar de subsanar estas dificultades. El estudio de los espermatozoides, su integridad, su epigenoma y su implicancia sobre el éxito de los TRA es un desafío para avanzar en el conocimiento del aporte del espermatozoide en el proceso de fecundación, y para mejorar las tasas de éxito de los TRA. En un estudio, analizaron las consecuencias de utilizar espermatozoides de ratón, a los cuales se les había inducido daño al DNA mediante criolesión, para realizar la técnica de ICSI, con el fin de identificar las consecuencias que podría tener un genoma paterno dañado sobre la salud de la descendencia (Fernández-Gonzalez et al., 2008). Ellos observaron que la fragmentación del DNA provocaba pérdida de telómeros en los espermatozoides, acelerando los tiempos del desarrollo embrionario y, al nacer la descendencia, se observaron un número reducido de crías por camada. También, encontraron que los perfiles de metilación que regulan genes de manera epigenética estaban alterados y, en la descendencia adulta, observaron aumento de ansiedad, ausencia de un patrón de habituación y memoria espacial defectuosa. También observaron tumores sólidos en las crías tanto pulmonares como dérmicos, la muerte del 20% de las crías durante los primeros 5 meses de vida y signos de envejecimiento prematuro, en el 25% de las crías restantes. Con estos resultados, los autores sugirieron que la reparación del DNA paterno por los ovocitos era incompleta, lo que conducía a patologías tanto a corto como a largo plazo. Este estudio brinda valiosos aportes sobre la importancia de la integridad del espermatozoide, no solo en el proceso de fecundación sino también sobre la salud de la descendencia, y brinda información clave sobre la importancia del estudio de los espermatozoides previo a la realización de los TRA debido a que, aun siendo exitosos para las clínicas, pueden influir fuertemente sobre las crías.

En nuestro estudio analizamos la presencia de 6 MPT de histonas, seleccionadas minuciosamente mediante el estudio de la bibliografía disponible, según su asociación con el proceso de espermatogénesis y con genes relevantes para el desarrollo embrionario temprano. Observamos que estas MPT de histonas estaban presentes en todas las muestras de espermatozoides analizadas tanto en donantes normozoospermicos como en pacientes que consultan por problemas de fertilidad (que denominamos “infértiles” para abreviar, aunque sabemos que el concepto de infertilidad es demasiado definitivo). Sin embargo, observamos una alta variabilidad en las marcas, sin poder establecer un patrón diferencial de estas, entre muestras de los dos grupos experimentales (donantes o pacientes). Sin embargo, sí encontramos una correlación negativa entre el parámetro espermático de motilidad con las marcas H3K4me3 y H3K27me3 en las muestras de espermatozoides de donantes. Asimismo, observamos una correlación positiva entre el parámetro de motilidad y la MPT de H3K4me3 en muestras de pacientes infértiles. Este resultado contradictorio entre la correlación encontrada para la marca H4K4me3 con la motilidad entre las muestras de donantes y pacientes creemos que se debe al momento en el cual se cuantificó el porcentaje de espermatozoides móviles, tal como se detalló en la sección de Materiales y Métodos. Este cambio en la metodología se debió a la imposibilidad de analizar este parámetro en la muestra fresca (1 hora de transcurrida la licuefacción) de los pacientes infértiles debido a que no es parte del procedimiento de rutina en las clínicas de fertilidad. Por este motivo este parámetro recién pudo analizarse al momento de recibir la muestra ya capacitada. Este proceso, principalmente asociado a la selección de espermatozoides móviles, pudo haber alterado la proporción de espermatozoides marcados positivamente para las distintas MPT de histonas, tal como se dejó en evidencia en algunos estudios donde se observó que el porcentaje de espermatozoides marcados para diferentes histonas varía, dentro de la misma muestra, entre los espermatozoides móviles e inmóviles (La Spina et al., 2014). Al igual que en este trabajo publicado, nosotros pudimos observar cómo la presencia de espermatozoides marcados positivamente para determinadas MPT de histonas se correlaciona con el parámetro de motilidad. Este resultado proporciona una evidencia más de cómo la motilidad de una muestra de semen puede ser un valioso indicador que no debería ser omitido, ya que no solo actuaría como un indicador de funcionalidad a grandes rasgos de la muestra, si no que podría estar aportando información sobre el epigenoma del espermatozoide que, como se mencionó anteriormente, puede tener grandes implicancias durante el proceso de fecundación, el

desarrollo embrionario y hasta en la vida adulta de la descendencia. Este hallazgo también pone una nota de precaución en la absoluta necesidad de tener parámetros estables y muy controlados de manipulación de las muestras que serán utilizadas en estos tratamientos. Muchas veces se pone el énfasis en cambios groseros en morfología u otros parámetros, olvidando que pequeños cambios pueden ser indicativos de una falla subyacente genética o epigenética. Somos conscientes de que los resultados observados muestran una correlación y no una causalidad, pero también creemos que hallar una causa-respuesta entre las MPT de histonas y los parámetros estudiados puede ser muy difícil, aunque tal vez no imposible, y que, además, debería tratar de desarrollarse un sistema de evaluación que no sea destructiva para el espermatozoide a utilizar dado que, lamentablemente, muchas de las determinaciones se realizan en una muestra celular que, luego, no será la misma empleada en el procedimiento.

En los primeros estudios realizados en humanos, analizando los riesgos que los TRA podían tener sobre la salud de los niños nacidos gracias a estos procedimientos, se remarcaba que eran nulos. Sin embargo, un estudio realizado por Hansen y colaboradores en el año 2005, indicó que los niños concebidos mediante TRA poseían mayor riesgo de defectos de nacimiento. En ese mismo estudio se realizó un metaanálisis de 25 estudios donde se analizaba la incidencia de defectos congénitos en bebés concebidos mediante TRA o espontáneamente, encontrándose que el riesgo de desarrollar defectos congénitos aumentaba significativamente entre un 30-40% en los niños concebidos mediante TRA. Los defectos congénitos más comunes relacionados con los TRA fueron la espina bífida, parálisis cerebral, paladar hendido, defectos musculoesqueléticos y cardiovasculares y algunas condiciones gastrointestinales alteradas. A su vez, encontraron que el riesgo de adquirir estos defectos congénitos era mayor cuando se utilizaba la técnica de ICSI respecto a FIV y que el uso de embriones congelados poseía menos riesgo. Los defectos antes nombrados y los riesgos que los TRA pueden tener, no pueden atribuirse únicamente a la gameta masculina, sin embargo, creemos que es de suma importancia estudiar su contribución. En este estudio, particularmente abordamos el análisis de las MPT de histonas ya mencionadas y encontramos que algunas correlacionaron negativamente con el porcentaje de fecundación. Los ovocitos que presentan pronúcleo femenino y masculino son considerados fecundados (Flaherty et al., 1995 a.b), debido a que la mera entrada del espermatozoide al ovocito no puede considerarse fecundación dado que, en el proceso de ICSI, donde se inyecta al espermatozoide dentro del

ovocito no resulta en un 100% de ovocitos desarrollados. La descondensación inadecuada de la cromatina de los espermatozoides y su transformación en el pronúcleo masculino, junto con la falta de activación del ovocito, parecen ser las principales causas de la baja eficiencia de ICSI en algunas especies (Kren et al., 2003; Lee et al., 2004). En humanos se encontró que el 70-80% de los ovocitos de ICSI no fecundados permanecían detenidos en metafase II (MII) y, por lo tanto, no se activaron. Otros, por el contrario, aun mostrando evidencia de estar activados, no mostraron formación del pronúcleo masculino, lo que sugiere que la activación de ovocitos humanos no siempre está asociada con la formación de pronúcleos masculinos (Lee et al., 2003). Los resultados mostrados en este trabajo de tesis doctoral, en los que se observa que, a medida que hay mayor porcentaje de espermatozoides marcados positivamente para H3K4me3 y H3K27me3, disminuye el % de fecundación, nos podría indicar que estas marcas asociadas al DNA espermático podrían estar involucradas en la correcta formación del pronúcleo masculino. Si bien el mecanismo por el cual la presencia de estas MPT de histonas podría estar alterando este mecanismo no está claro, y no es parte del estudio de este trabajo, creemos que estas MPT podrían estar alterando la estructura de la cromatina espermática de manera tal que el proceso de descondensación se viera afectado tanto en tiempo, como en las etapas involucradas. Para poder dilucidar esta hipótesis, en un futuro se podrían analizar ambos parámetros para ver si existe correlación entre ellos, si se observa un retraso en la cinética de descondensación o en el porcentaje de descondensación de los espermatozoides según la presencia o la abundancia de las MPT de histonas analizadas. Si bien este estudio no analizó el tiempo de aparición de los pronúcleos, se sabe por bibliografía que el mismo es de suma importancia como marcador de buen desarrollo embrionario, generando o no, un embrión apto para transferir o criopreservar (Payne et al., 1997; Coticchio et al., 2018). A su vez, en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se observó que la cinética de descondensación en los pacientes infértiles responden a dos patrones diferentes, pudiéndose diferenciar dos grupos, descondensadores rápidos o lentos que se diferenciaban de los donantes normozoospermicos que, en su totalidad, descondensaban rápidamente. En ese trabajo, además de caracterizarse la cinética de descondensación tanto en donantes como en pacientes, se evaluó su relación con parámetros asociados a éxito de los TRA, encontrándose que aquellos que eran descondensadores lentos poseían peores resultados (Galotto et al., 2019). Es en este sentido que creemos que sería un gran aporte poder analizar la relación de las histonas con estos dos índices.

Mediante técnicas de ChIP-Seq se evaluó el destino de las histonas paternas en etapas embrionarias tempranas (Legoff et al., 2019). En ese trabajo, se observó que las marcas de H3K4me3 luego de la fecundación, se agotan en los cigotos y solo se observan después de la activación del genoma embrionario que ocurre en la etapa tardía de dos células, y que el enriquecimiento de H3K4me3 paterno es más débil que el materno. A su vez, observaron que las marcas de H3K4me3 paterna estaban presentes en cigotos, por lo cual sugirieron la posibilidad de que estas marcas pudieran estar asociadas con algunos promotores para programar una activación génica tardía y, de esta forma, transmitir una memoria epigenética paterna. Estos datos son consistentes con la noción de que las marcas de histonas se adquieren nuevamente después de la fecundación a través de un mecanismo que aún no se ha determinado. En este trabajo de tesis doctoral, encontramos que la histona H3K27me3 correlaciona negativamente con el score embrionario, de manera tal que en la medida que una muestra de semen presenta alto porcentaje de espermatozoides que poseen esta marca, la calidad embrionaria disminuye. Siguiendo con los resultados reportados en el trabajo de Legoff antes mencionado, los datos aportados en esta tesis, podrían indicar que la marca H3K27me3 se asocia a una programación génica activa o represiva de genes relevantes para el desarrollo embrionario en etapas tempranas.

La información epigenética contenida en los espermatozoides y el ovocito sufre una fuerte remodelación en el embrión temprano luego de fecundación. Estas marcas son únicas y deben reprogramarse de manera efectiva para permitir la transición a un cigoto totipotente y activo genéticamente. Sin embargo, el restablecimiento del contenido epigenético en los espermatozoides no es completo, ya que los cambios inducidos por el ambiente sobre el epigenoma espermático se han relacionado con fenotipos de la descendencia (Lambrot et al., 2013; Radford et al., 2014; Ly et al., 2017). No obstante, faltan explicaciones mecanicistas basadas en evidencias moleculares, de cómo el epigenoma paterno puede influir sobre la descendencia. Se ha observado que las histonas H3K4me3 escapan a la reprogramación genética luego de la fecundación, por lo cual podría tener implicancias en la transmisión de fenotipos a la descendencia (Lismer et al., 2020). En este caso, observaron que el enriquecimiento en la histona H3K4me3 en los espermatozoides estaba implicado en la transmisión de fenotipos anormales en la descendencia. En este momento, se desconoce cómo H3K4me3 escapa a la reprogramación epigenética tanto en el desarrollo embrionario como en la línea germinal. En levaduras y moscas, H3K27me3 se identificó como una señal

epigenética capaz de mediar la herencia no genética entre generaciones (Gaydos et al., 2014; Coleman et al., 2017; Zenk et al., 2017) y se observó que las marcas de histonas H3K9me3 y H3K27me3 estaban implicadas en la herencia transgeneracional en *C. elegans* después de la exposición al disruptor endocrino bisfenol A (Camacho et al., 2018). A su vez, se observó que la marca correspondiente a H3K4me3 se relaciona con la activación de la transcripción en regiones donde hay apertura de la cromatina y que en embriones tempranos hay bajos niveles de esta marca paterna (Liu et al., 2016; Zheng et al., 2016) tal como se reportó en el trabajo de Limer y colaboradores, antes mencionado, y que su sobreexpresión generaba fenotipos alterados de la descendencia. La marca de H3K4me3 se preserva asociada a genes importantes para la reprogramación genética, la meiosis y la espermiogénesis (Lesch et al., 2013), y se ha encontrado que esta marca junto con H3K27me3 está enriquecida en muchos promotores de células madre embrionarias.

Por otro lado, en humanos, hay datos de granjeros suecos mostrando que el estado nutricional de los abuelos tiene efectos transgeneracionales en un número de medidas metabólicas realizadas en sus hijos y nietos (Pembrey et al., 2006; Kaati et al., 2007). Estos efectos fueron, también, corroborados en ratones cuando el padre experimentaba un ayuno de 24 h previo al apareo. Las crías de ambos sexos presentaban niveles elevados de glucosa y corticosterona séricas (Anderson et al., 2006). Además, en ratones, también se observaron efectos debidos a dietas ricas en grasas, bajas en proteínas, edad paterna, con efecto multi y transgeneracional (Dunn and Bale., 2009; García-Palomares et al., 2009; Harrison and Langley-Evans, 2009). Interesantemente, las características paternas también tuvieron efecto en el comportamiento de las crías. Como ejemplo, un ambiente enriquecido para el padre, por 28 días previos al apareo, tuvo efecto sobre las crías, tanto machos como hembras (Curley et al., 2011; Mychasiuk et al., 2012). Cómo aparecen estas modificaciones epigenéticas a partir de perturbaciones ambientales (nutricionales, químicas o físicas) y cómo se transmiten hereditariamente, es parte del tópico de este trabajo de tesis doctoral al intentar aportar algunos datos en esta dirección. Por supuesto que, para hablar de efectos transgeneracionales en la transmisión de cambios heredados, estos cambios epigenéticos (o genéticos) deben manifestarse en la línea germinal. Para establecer si un cambio es social, multigeneracional o transgeneracional, debe expresarse solamente en la primera generación, en F1 o F2, o en F3, respectivamente. De todos modos, si aparece expresado en F2, es bastante probable que sea transgeneracional. Con respecto al impacto en humanos, estos

hallazgos tienen una importancia agregada en tanto y en cuanto participen las técnicas de reproducción asistida. Es conocido que el propio tratamiento puede tener consecuencias en un incremento en la incidencia de desórdenes por la impronta genética, tal vez debido a las manipulaciones propias de estas técnicas (cambios en medios de cultivo, reactivos, metodología) y a las que podrían agregarse los cambios provenientes del efecto ambiental sobre alguno de los padres.

Todos estos aportes nos conducen a pensar que nuestros hallazgos pueden estar asociados a eventos de herencia transgeneracional en la descendencia y que el aporte de estos conocimientos permitiría continuar con el avance de métodos de detección de marcas epigenéticas en los espermatozoides de pacientes que concurren a realizar TRA. De esta manera se podría utilizar esta medición como un método más de evaluación de calidad espermática en las clínicas de reproducción asistida y, en principio, brindar pronósticos de éxito de los TRA. En un futuro, con el avance del conocimiento, se podrían brindar herramientas que modifiquen la abundancia de estas marcas epigenéticas en los pacientes que concurren a las clínicas, tal como ocurre con el consumo de antioxidantes para disminuir el estrés oxidativo en los espermatozoides.

Conclusión general

Los resultados descritos en esta tesis doctoral contribuyen con nuevos aportes al conocimiento de la importancia de la herencia epigenética por parte del padre sobre la descendencia, tanto a nivel embrionario como en la adultez. Se entiende como herencia epigenética a cualquier cambio en la expresión génica y la transmisión de variaciones fenotípicas a generaciones posteriores, que no sean el resultado de alteraciones en la secuencia del DNA. Por diferentes aportes bibliográficos, es probable que las modificaciones y la organización de las histonas sean uno de los principales contribuyentes a la herencia epigenética transgeneracional.

Cada célula de nuestro cuerpo deriva de una única célula generada en la concepción. Sin embargo, a pesar de tener cada célula la misma información genómica, en la etapa de blastocisto emergen dos tipos celulares bien diferenciados: los trofoblastos y las células del macizo celular interno. La respuesta a esta diferenciación se encuentra en el entendimiento de la regulación epigenética dentro de estos tipos celulares.

La fecundación ofrece una ventaja única para apreciar la naturaleza específica de tipo celular en el patrón epigenético. Ambos, el espermatozoide y ovocito poseen un empaquetamiento cromatínico muy diferente y marcas epigenéticas específicas para su propósito como gametas. El papel central de la epigenética en la reproducción, es evidente en la reprogramación del cigoto unicelular hacia un individuo totalmente diferenciado que, a su vez, es capaz de reproducirse. Cada célula debe pasar por cierto grado de programación epigenética para lograr el fenotipo final que, en gran medida, se encuentra programado durante el desarrollo.

En el primer capítulo se describieron los efectos del consumo directo de etanol sobre la integridad espermática y de la línea germinal en el modelo murino. Se evaluaron las marcas epigenéticas de diferentes MPT de histonas relevantes para el correcto desarrollo de la espermatogénesis como también para el desarrollo embrionario exitoso. Estos resultados revelaron alteraciones de la integridad del DNA de la línea germinal en desarrollo y en los niveles de estrés oxidativo en los espermatozoides, como producto del consumo directo de etanol que, en consecuencia, afectan la integridad del núcleo espermático alterando la riqueza de H3K4me3 asociada al DNA. También se reportaron alteraciones a nivel histológico en las gónadas que, a largo plazo, podrían alterar la producción espermática dado que la producción diaria se encontró afectada. Además, continuando con el estudio del aporte masculino sobre la descendencia, en este primer capítulo también se analizó el efecto

indirecto del consumo paterno de etanol sobre la integridad espermática y de la línea germinal en la F1. Aquí se encontraron alteraciones importantes a nivel gonadal, donde tanto el peso testicular como su histología revelaron variaciones relevantes a la funcionalidad del órgano. Asimismo, también se encontró alterada la abundancia de las marcas H3K9me y H4K12ac en los espermatozoides correspondientes al grupo F1-tratado. Estos resultados aportarían información clave sobre cómo el consumo paterno de etanol estaría alterando de manera directa a la salud reproductiva de los ratones expuestos y, de manera indirecta, mediante mecanismos de herencia intergeneracional, a la salud reproductiva de su descendencia masculina.

En el segundo capítulo se reportaron resultados preliminares, pero de gran importancia, sobre cómo el epigenoma masculino en el modelo humano puede alterar la calidad y funcionalidad espermática tanto a la hora de fecundar como en el momento post-fecundación, revelando posibles implicancias de determinadas MPT sobre el éxito de los TRA, evaluando como parámetros el % de fecundación y el score de calidad embrionaria. Entendemos que la correlación no indica causalidad y que se deberían realizar experimentos más exhaustivos para poder determinar la relación causa-efecto.

Se sabe que, durante procesos como la replicación del DNA, daño del DNA y la activación de la expresión génica, las histonas no canónicas se incorporan a los nucleosomas y, en este sentido, es importante destacar que la alteración de alguno de estos procesos durante el desarrollo gametogénico podrían tener graves consecuencias no sólo a nivel reproductivo sino también a nivel de la progenie, tal como se reportó en esta tesis doctoral.

Resultados observados recientemente en la literatura demuestran, mediante ensayos de secuenciación e inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-Seq), que el mismo *locus* puede estar ocupado a veces con histonas y otras con protaminas, resultado que se explica como la posibilidad de que algunos espermatozoides reemplacen ciertas histonas por protaminas durante su desarrollo y otros no. Frente a esto, es difícil pensar cómo las marcas epigenéticas presentes en sólo una proporción de espermatozoides podrían explicar los efectos paternos que parecen ser penetrantes en la siguiente generación. En este caso, se podría pensar que, si esta característica se encuentra solo en un cierto porcentaje de espermatozoides, solo ese porcentaje es capaz de fecundar, o que sólo ese porcentaje se verá representado en la descendencia o, tal vez, pensar, que el fenotipo de la descendencia integra información de múltiples *loci* independientes. Son múltiples las posibilidades en que el epigenoma puede

estar interactuando y afectando a la descendencia y es clave pensar e investigar los mecanismos a través de los que afecta para, así, poder explicar de qué manera los resultados observados en este trabajo de tesis doctoral estarían involucrados y seguir estudiando el alcance que puedan tener.

Es casi indiscutible que las experiencias paternas pueden programar fenotipos alterados en la descendencia. La pregunta a responder es: cuánta información ambiental es capaz de entregar el espermatozoide a la próxima generación. Sin embargo, es enormemente difícil parametrizar el mundo posible de experiencias al que ha sido sometido un padre. En este sentido, el ir abarcando pequeños entornos controlados con los modelos animales permite encontrar algunas respuestas en los fenotipos dirigidos.

Por lo tanto, dada la evidencia que aquí se presenta indicando que la exposición paterna al alcohol tiene efectos posiblemente intergeneracionales, creemos que es de suma importancia que continuemos con este estudio. Consideramos que es particularmente relevante evaluar la presencia de las modificaciones de histonas en diferentes etapas del desarrollo embrionario temprano y evaluar el potencial reproductivo de la descendencia masculina de los machos tratados con alcohol. Asimismo, creemos que es de suma importancia avanzar con el estudio de la ingesta de etanol en el modelo humano evaluando el efecto de dicho consumo por parte de pacientes infértiles sobre la funcionalidad e integridad espermática y el éxito de los tratamientos de reproducción asistida.

Referencias

Aagard-Tillery KM, Suter MA, Harris A, Abramovici A, Cantu J. Epigenetics and reproduction and the developmental origins of health and disease. *Anim. Reprod.* 2010;7, 103-116.

Abarikwu SO, Duru QC, Chinonso OV, Njoku RC. Antioxidant enzymes activity, lipid peroxidation, oxidative damage in the testis and epididymis, and steroidogenesis in rats after co-exposure to atrazine and ethanol. *Andrologia.* 2016;48(5):548-557. doi:10.1111/and.12478

Abel EL, Tan SE. Effects of paternal alcohol consumption on pregnancy outcome in rats. *Neurotoxicol Teratol.* 1988;10(3):187-192. doi:10.1016/0892-0362(88)90016-5

Abel EL, Moore C, Waselewsky D, Zajac C, Russell LD. Effects of cocaine hydrochloride on reproductive function and sexual behavior of male rats and on the behavior of their offspring. *J Androl.* 1989;10(1):17-27. doi:10.1002/j.1939-4640.1989.tb00051.x

Abrieu A, Dorée M, Picard A. Mitogen-activated protein kinase activation down-regulates a mechanism that inactivates cyclin B-cdc2 kinase in G2-arrested oocytes. *Mol Biol Cell.* 1997;8(2):249-261. doi:10.1091/mbc.8.2.249

Addolorato G, Capristo E, Greco AV, Stefanini GF, Gasbarrini G. Energy expenditure, substrate oxidation, and body composition in subjects with chronic alcoholism: new findings from metabolic assessment. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997;21(6):962-967.

Adenot PG, Mercier Y, Renard JP, Thompson EM. Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development.* 1997;124(22):4615-4625.

Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, et al. Male infertility. *Lancet.* 2021;397(10271):319-333. doi:10.1016/S0140-6736(20)32667-2. *Lancet.* 23;397(10271):319-333.

Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1998;59(5):1037-1046. doi:10.1095/biolreprod59.5.1037

Aitken RJ, Ryan AL, Curry BJ, Baker MA. Multiple forms of redox activity in populations of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 2003;9(11):645-661. doi:10.1093/molehr/gag086

Aitken RJ, Sawyer D. 2003. The human spermatozoon--not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol.* 518:85-98.

Aitken RJ, Curry BJ. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(3):367-381. doi:10.1089/ars.2010.3186

Aitken RJ. Not every sperm is sacred; a perspective on male infertility. *Mol Hum Reprod.* 2018;24(6):287-298. doi:10.1093/molehr/gay010

Akama K, Sato H, Hasegawa S, Shimada I, Nakano M. Transition protein 1 from boar late spermatid nuclei having DNA-melting activity is a dimeric protein. *Biochem Mol Biol Int.* 1998;44(2):315-323. doi:10.1080/15216549800201332

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod.* 2011 Jun;26(6):1270-83. doi: 10.1093/humrep/der037. Epub 2011 Apr 18. PMID: 21502182.

Anderson RA Jr, Furby JE, Oswald C, Zaneveld LJ. Tetratological evaluation of mouse fetuses after paternal alcohol ingestion. *Neurobehav Toxicol Teratol.* 1981;3(2):117-120.

Anderson RA Jr. Endocrine balance as a factor in the etiology of the fetal alcohol syndrome. *Neurobehav Toxicol Teratol.* 1981;3(2):89-104.

Anderson RA Jr, Willis BR, Oswald C, Zaneveld LJ. Ethanol-induced male infertility: impairment of spermatozoa. *J Pharmacol Exp Ther.* 1983;225(2):479-486.

Anderson LM, Riffle L, Wilson R, Travlos GS, Lubomirski MS, Alvord WG. Preconceptional fasting of fathers alters serum glucose in offspring of mice. *Nutrition.* 2006;22(3):327-331. doi:10.1016/j.nut.2005.09.006

Aragón AS, Kalberg WO, Buckley D, Barela-Scott LM, Tabachnick BG, May PA. Neuropsychological study of FASD in a sample of American Indian children: processing simple versus complex information. *Alcohol Clin Exp Res.* 2008;32(12):2136-2148. doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00802.x

Aranda A. 1997. La complejidad y la forma. Mexico. FCE.

Arpanahi A, Brinkworth M, Iles D, et al. Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res.* 2009;19(8):1338-1349. doi:10.1101/gr.094953.109

Arts EG, Kuiken J, Jager S, Hoekstra D. Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa. Specific involvement of the equatorial segment after acrosome reaction. *Eur J Biochem.* 1993;217(3):1001-1009. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb18331.x

Austin CR. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature.* 1952;170(4321):326. doi:10.1038/170326a0

Austin CR, Bishop MW. Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1958;149(935):241-248. doi:10.1098/rspb.1958.0066

Austin, C.R. Sperm maturation in the male and female genital tracts. *Biol. Fertil.* 1985;121-55

Avella MA, Xiong B, Dean J. The molecular basis of gamete recognition in mice and humans. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(5):279-289. doi:10.1093/molehr/gat004

Avella MA, Baibakov B, Dean J. A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans. *J Cell Biol.* 2014;205(6):801-809. doi:10.1083/jcb.201404025

Baker MA, Aitken RJ. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;216(1-2):47-54. doi:10.1016/j.mce.2003.10.068

Bal W, Dyba M, Szewczuk Z, et al. Differential zinc and DNA binding by partial peptides of human protamine HP2. *Mol Cell Biochem.* 2001;222(1-2):97-106.

Balhorn R, Cosman M, Thornton K, Krishnan VV, Corzett M, Bench G, Kramer C, Lee IV J, Hud NV, Allen M, et al. Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm. In *The Male Gamete: From Basic Knowledge to Clinical Applications*, edited by Gagnon C. Vienna, IL: Cache River Press.1999;55-70

Balhorn R, Gledhill BL, Wyrobek AJ. Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. *Biochemistry.* 1977;16(18):4074-4080. doi:10.1021/bi00637a021

Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol.* 1982;93(2):298-305. doi:10.1083/jcb.93.2.298

Bedford JM. Mechanisms of conception: the maturation and interaction of mammalian gametes. *Mead Johnson Symp Perinat Dev Med.* 1979;(16):7-17.

Bedford JM. Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2004;79(2):429-460. doi:10.1017/s146479310300633x

Best CH, Hartroft WS. Liver damage produced by feeding alcohol or sugar and its prevention by choline. *Br Med J.* 1949;2(4635):1002-1006. doi:10.1136/bmj.2.4635.1001

Bhatia S, Drake DM, Miller L, Wells PG. Oxidative stress and DNA damage in the mechanism of fetal alcohol spectrum disorders. *Birth Defects Res.* 2019;111(12):714-748. doi:10.1002/bdr2.1509

Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature.* 2014;508(7497):483-487. doi:10.1038/nature13203

Bielawski DM, Zaher FM, Svinarich DM, Abel EL. Paternal alcohol exposure affects sperm cytosine methyltransferase messenger RNA levels. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002;26(3):347-351. Boissonnas CC, Jouannet P, Jammes H. Epigenetic disorders and male subfertility. *Fertil Steril.* 2013;99(3):624-631. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.01.124

Brandon-Warner E, Walling TL, Schrum LW, McKillop IH. Chronic ethanol feeding accelerates hepatocellular carcinoma progression in a sex-dependent manner in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Alcohol Clin Exp Res.* 2012;36(4):641-653. doi:10.1111/j.1530-0277.2011.01660.x

Brewer LR, Corzett M, Balhorn R. Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Science.* 1999;286(5437):120-123. doi:10.1126/science.286.5437.120

Brunner AM, Nanni P, Mansuy IM. Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines. *Epigenetics Chromatin.* 2014;7(1):2. Published 2014 Jan 20. doi:10.1186/1756-8935-7-2

Bryczynska U, Hisano M, Erkek S, Ramos L, Oakeley EJ, Roloff TC, Hammoud SS, Purwar J, Pflueger C, Cairns BR, Carrell DT. 2009. Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertil Steril.* 94(5):1728–33

Bryczynska U, Hisano M, Erkek S, et al. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(6):679-

687. doi:10.1038/nsmb.1821 Bernstein, B. E., *et al.* 2002. Methylation of Histone H3 Lys 4 in Coding Regions of Active Genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(13), 8695-700.

Buffone MG, Hirohashi N, Gerton GL. Unresolved questions concerning mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Biol Reprod.* 2014;90(5):112. doi:10.1095/biolreprod.114.117911

Camacho J, Truong L, Kurt Z, *et al.* The Memory of Environmental Chemical Exposure in *C. elegans* Is Dependent on the Jumonji Demethylases *jmjd-2* and *jmjd-3/utx-1*. *Cell Rep.* 2018;23(8):2392-2404. doi:10.1016/j.celrep.2018.04.078

Capra E, Lazzari B, Turri F, Cremonesi P, Portela A, Ajmone-Marsan P, Stella A, & Pizzi F. Epigenetic analysis of high and low motile sperm populations reveals methylation variation in satellite regions within the pericentromeric position and in genes functionally related to sperm DNA organization and maintenance in *Bos taurus*. *BMC genomics.* 2019;20(1), 940. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6317-6>

Caron N, Veilleux S, Boissonneault G. Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Mol Reprod Dev.* 2001;58(4):437-443. doi:10.1002/1098-2795(20010401)58:4<437::AID-MRD12>3.0.CO;2-Q

Carone BR, Hung JH, Hainer SJ, *et al.* High-resolution mapping of chromatin packaging in mouse embryonic stem cells and sperm. *Dev Cell.* 2014;30(1):11-22. doi:10.1016/j.devcel.2014.05.024

Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link?. *Hum Reprod Update.* 2007;13(3):313-327. doi:10.1093/humupd/dml057

Carrell DT, Hammoud SS. The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. *Mol Hum Reprod.* 2010;16(1):37-47. doi:10.1093/molehr/gap090

Ceccanti M, Alessandra Spagnolo P, Tarani L, *et al.* Clinical delineation of fetal alcohol spectrum disorders (FASD) in Italian children: comparison and contrast with other

racial/ethnic groups and implications for diagnosis and prevention. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007;31(2):270-277. doi:10.1016/j.neubiorev.2006.06.024

Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis.* 2012;16(4):667-685. doi:10.1016/j.cld.2012.08.002

Chastain LG, Sarkar DK. Alcohol effects on the epigenome in the germline: Role in the inheritance of alcohol-related pathology. *Alcohol.* 2017;60:53-66. doi:10.1016/j.alcohol.2016.12.007

Choi T, Fukasawa K, Zhou R, et al. The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(14):7032-7035. doi:10.1073/pnas.93.14.7032

Choy JT, Eisenberg ML. Male infertility as a window to health. *Fertil Steril.* 2018;110(5):810-814. doi:10.1016/j.fertnstert.2018.08.015

Cicero TJ, Adams ML, O'Connor L, Nock B, Meyer ER, Wozniak D. Influence of chronic alcohol administration on representative indices of puberty and sexual maturation in male rats and the development of their progeny. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;255(2):707-715.

Cleaton MA, Dent CL, Howard M, et al. Fetus-derived DLK1 is required for maternal metabolic adaptations to pregnancy and is associated with fetal growth restriction. *Nat Genet.* 2016;48(12):1473-1480. doi:10.1038/ng.3699

Colaco S, Sakkas D. Paternal factors contributing to embryo quality. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(11):1953-1968. doi:10.1007/s10815-018-1304-4

Coleman RT, Struhl G. Causal role for inheritance of H3K27me3 in maintaining the OFF state of a *Drosophila* HOX gene. *Science.* 2017;356(6333):eaai8236. doi:10.1126/science.aai8236

Cooper TG. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl.* 1998;53:119-136.

Coticchio G, Mignini Renzini M, Novara PV, et al. Focused time-lapse analysis reveals novel aspects of human fertilization and suggests new parameters of embryo viability. *Hum Reprod.* 2018;33(1):23-31. doi:10.1093/humrep/dex344

Cowell IG, Aucott R, Mahadevaiah SK, et al. Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals. *Chromosoma.* 2002;111(1):22-36. doi:10.1007/s00412-002-0182-8

Crabb D. W., Bosron W.F y Li T. K. Ethanol metabolism. *Pharmac Ther.* 1987;34 (1), 59-73

Craig JR, Jenkins TG, Carrell DT, Hotaling JM. Obesity, male infertility, and the sperm epigenome. *Fertil Steril.* 2017;107(4):848-859. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.02.115

Crews D, Gillette R, Scarpino SV, Manikkam M, Savenkova MI, Skinner MK. Epigenetic transgenerational inheritance of altered stress responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(23):9143-9148. doi:10.1073/pnas.1118514109

Cummings SA, Thorgaard GH. Extraction of DNA from fish blood and sperm. *Biotechniques.* 1994;17(3):426-430.

Curley JP, Mashoodh R, Champagne FA. Epigenetics and the origins of paternal effects. *Horm Behav.* 2011;59(3):306-314. doi:10.1016/j.yhbeh.2010.06.018

Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Treviño CL. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev.* 2011;91(4):1305-1355. doi:10.1152/physrev.00028.2010

Daxinger L, Whitelaw E. Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nat Rev Genet.* 2012;13(3):153-162. Published 2012 Jan 31. doi:10.1038/nrg3188

de Rooij DG, Grootegoed JA. Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10:694–701.

DeAngelis AM, Martini AE, Owen CM. Assisted Reproductive Technology and Epigenetics. *Semin Reprod Med.* 2018;36(3-04):221-232. doi:10.1055/s-0038-1675780

DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet.* 2003;72(1):156-160. doi:10.1086/346031

Dees WL, Skelley CW. Effects of ethanol during the onset of female puberty. *Neuroendocrinology.* 1990;51(1):64-69. doi:10.1159/000125317

Dobson AT, Raja R, Abeyta MJ, et al. The unique transcriptome through day 3 of human preimplantation development. *Hum Mol Genet.* 2004;13(14):1461-1470. doi:10.1093/hmg/ddh157

Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis.* 1999;14(5):505-512. doi:10.1093/mutage/14.5.505

Drobnis EZ, Yudin AI, Cherr GN, Katz DF. Kinematics of hamster sperm during penetration of the cumulus cell matrix. *Gamete Res.* 1988;21(4):367-383. doi:10.1002/mrd.1120210406

Ducibella T, Fissore R. The roles of Ca²⁺, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. *Dev Biol.* 2008;315(2):257-279. doi:10.1016/j.ydbio.2007.12.012

Ducibella T, LeFevre L. Study of protein kinase C antagonists on cortical granule exocytosis and cell-cycle resumption in fertilized mouse eggs. *Mol Reprod Dev.* 1997;46(2):216-226. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199702)46:2<216::AID-MRD12>3.0.CO;2-Z

Dunn GA, Bale TL. Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. *Endocrinology.* 2009;150(11):4999-5009. doi:10.1210/en.2009-0500

Dym M, Fawcett DW. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod.* 1970;3(3):308-326. doi:10.1093/biolreprod/3.3.308

Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Fertilization and cleavage in vitro of preovulator human oocytes. *Nature.* 1970;26;227(5265):1307-9.

Erkek S, Hisano M, Liang C, Gill M, Murr R, Dieker J, Schubeler D, Vlag JVD, Stadler MB, Peters AHFM. Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(7):868–875.

Ernesto JI, Weigel Muñoz M, Battistone MA, Vasen G, Martínez-López P, Orta G, Figueiras-Fierro D, De la Vega-Beltran JL, Moreno IA, Guidobaldi HA, Giojalas L, Darszon A, Cohen DJ, Cuasnicú PS. CRISP1 as a novel CatSper regulator that modulates sperm motility and orientation during fertilization. *J. Cell Biol.* 2015;210:1213–24.

Escoffier J, Lee HC, Yassine S, Zouari R, Martinez G, Karaouzène T, Coutton C, Kherraf Z, Halouani L, Triki C, Nef S, Thierry-Mieg N, Savinov SN, Fissore R, Ray PF, Arnoult C. Homozygous mutation of PLCZ1 leads to defective human oocyte activation and infertility that is not rescued by the WWbinding protein PAWP. *Hum. Mol. Genet.* 2016;25:878–891.

Fabro G, Rovasio R.A, Civalero S, et al. Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel directionality-based assay. *Biol Reprod.* 2002;67:1565–1571.

Fayomi AP, Orwig KE. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res.* 2018;29:207-214.

Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, et al. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod.* 2008;78(4):761-772. doi:10.1095/biolreprod.107.065623

Ferrer Casero, E.A. 2016. Preformismo y epigénesis en la historia de la embriología. *MEDISAN*, 20(9), 2164-2174. Recuperado en 16 de abril de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192016000900017&lng=es&tlng=es.

Finegersh A, Homanics GE. Paternal alcohol exposure reduces alcohol drinking and increases behavioral sensitivity to alcohol selectively in male offspring. *PLoS One.* 2014;9(6):e99078. Published 2014 Jun 4. doi:10.1371/journal.pone.0099078

Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Mattews CD. Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1995;10(10):2623-2629. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a135757

Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Mattews CD. Assessment of fertilization failure and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod Fertil Dev.* 1995;7:197-210.

French DB, Sabanegh ES Jr, Goldfarb J, Desai N. Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles?. *Fertil Steril.* 2010;93(4):1097-1103. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.10.

Fujimoto S, Yoshida N, Fukui T, et al. Mammalian phospholipase C ζ induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. *Dev Biol.* 2004;274(2):370-383. doi:10.1016/j.ydbio.2004.07.025

Gabriel K, Hofmann C, Glavas M, Weinberg J. The hormonal effects of alcohol use on the mother and fetus. *Alcohol Health Res World*. 1998;22(3):170-177.

Galotto C, Cambiasso MY, Julianelli VL, et al. Human sperm decondensation in vitro is related to cleavage rate and embryo quality in IVF. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(11):2345-2355. doi:10.1007/s10815-019-01590-y

García-Palomares S, Navarro S, Pertusa JF, et al. Delayed fatherhood in mice decreases reproductive fitness and longevity of offspring. *Biol Reprod*. 2009;80(2):343-349. doi:10.1095/biolreprod.108.073395

Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB. Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod*. 2000;15 Suppl 6:9-23.

Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science*. 1987;236(4804):962-964. doi:10.1126/science.3576213

Gaydos LJ, Wang W, Strome S. Gene repression. H3K27me and PRC2 transmit a memory of repression across generations and during development. *Science*. 2014;345(6203):1515-1518. doi:10.1126/science.1255023

Ge S, Zhao P, Liu X, Zhao Z, Liu M. Necessity to Evaluate Epigenetic Quality of the Sperm for Assisted Reproductive Technology. *Reprod Sci*. 2019;26(3):315-322. doi:10.1177/1933719118808907

Giacone F, Cannarella R, Mongioì LM, et al. Epigenetics of Male Fertility: Effects on Assisted Reproductive Techniques. *World J Mens Health*. 2019;37(2):148-156. doi:10.5534/wjmh.180071

Greally JM. A user's guide to the ambiguous word 'epigenetics'. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(4):207-208. doi:10.1038/nrm.2017.135

Guidobaldi HA, Teves ME, Uñates DR, Giojalas LC. Sperm transport and retention at the fertilization site is orchestrated by a chemical guidance and oviduct movement. *Reproduction*. 2012;143(5):587-596. doi:10.1530/REP-11-0478

Gusse M, Sautière P, Bélaiche D, et al. Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochim Biophys Acta*. 1986;884(1):124-134. doi:10.1016/0304-4165(86)90235-7

Gutteridge JM, Halliwell B. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol*. 1989;2(2):195-256. doi:10.1016/s0950-3536(89)80017-4

Hammoud SS, Nix DA, Hammoud AO, Gibson M, Cairns BR, Carrell DT. Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum Reprod*. 2011;26(9):2558-2569. doi:10.1093/humrep/der192

Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature*. 2009;460(7254):473-478. doi:10.1038/nature08162

Hansen M, Bower C, Milne E, de Klerk N, Kurinczuk JJ. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects--a systematic review. *Hum Reprod*. 2005;20(2):328-338. doi:10.1093/humrep/deh593

Hansen ML, Thulstrup AM, Bonde JP, Olsen J, Håkonsen LB, Ramlau-Hansen CH. Does last week's alcohol intake affect semen quality or reproductive hormones? A cross-sectional study among healthy young Danish men. *Reprod Toxicol*. 2012;34(3):457-462. doi:10.1016/j.reprotox.2012.06.004

Harikrishnan R, Abhilash PA, Syam Das S, et al. Protective effect of ascorbic acid against ethanol-induced reproductive toxicity in male guinea pigs. *Br J Nutr.* 2013;110(4):689-698. doi:10.1017/S0007114512005739

Harrison M, Langley-Evans SC. Intergenerational programming of impaired nephrogenesis and hypertension in rats following maternal protein restriction during pregnancy. *Br J Nutr.* 2009;101(7):1020-1030. doi:10.1017/S0007114508057607

Hertig A, Rock J, Adams E, Mulligan W. On the preimplantation stages of the human ovum: a description of four normal and four abnormal specimens ranging from the second to the fifth day of development. *Contrib. Embryol. Carnegie Instn.* 1954;35, 119–220

Hertig AT, Rock J, Adams EC. A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *Am. J. Anat.* 1956;98, 435–493

Heytens E, Parrington J, Coward K, et al. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod.* 2009;24(10):2417-2428. doi:10.1093/humrep/dep207

Hicks Gómez JJ. *Bioquímica*. México, McGraw-Hill, 2001, 900p.

Hinrichsen MJ, Blaquier JA. Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. *J Reprod Fertil.* 1980;60(2):291-294. doi:10.1530/jrf.0.0600291

Ho HC, Suarez SS. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction.* 2001;122(4):519-526. doi:10.1530/rep.0.1220519

Holt WV, Fazeli A. Do sperm possess a molecular passport? Mechanistic insights into sperm selection in the female reproductive tract. *Mol Hum Reprod.* 2015;21(6):491-501. doi:10.1093/molehr/gav012

Hoodbhoy T, Talbot P. Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Mol Reprod Dev.* 1994;39(4):439-448. doi:10.1002/mrd.1080390413

Hsu JM, Buddemeyer E, Chow BF. Role of pyridoxine in glutathione metabolism. *Biochem J.* 1964;90(1):60-64. doi:10.1042/bj0900060

Ihara M, Meyer-Ficca ML, Leu NA, et al. Paternal poly (ADP-ribose) metabolism modulates retention of inheritable sperm histones and early embryonic gene expression. *PLoS Genet.* 2014;10(5):e1004317. Published 2014 May 8. doi:10.1371/journal.pgen.1004317

Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update.* 2015;21(4):411-426. doi:10.1093/humupd/dmv016

Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature.* 2005;434(7030):234-238. doi:10.1038/nature03362

Jalili C, Salahshoor MR, Naseri A. Protective effect of *Urtica dioica* L against nicotine-induced damage on sperm parameters, testosterone and testis tissue in mice. *Iran J Reprod Med.* 2014;12(6):401-408.

Jana K, Samanta PK, De DK. Nicotine diminishes testicular gametogenesis, steroidogenesis, and steroidogenic acute regulatory protein expression in adult albino rats: possible influence on pituitary gonadotropins and alteration of testicular antioxidant status. *Toxicol Sci.* 2010;116(2):647-659. doi:10.1093/toxsci/kfq149

Jana K, Jana N, De DK, Guha SK. Ethanol induces mouse spermatogenic cell apoptosis in vivo through over-expression of Fas/Fas-L, p53, and caspase-3 along with cytochrome c translocation and glutathione depletion. *Mol Reprod Dev.* 2010;77(9):820-33.

Jayaramaiah Raja S, Renkawitz-Pohl R. Replacement by *Drosophila melanogaster* protamines and Mst77F of histones during chromatin condensation in late spermatids and role of sesame

in the removal of these proteins from the male pronucleus, *Mol. Cell. Biol.* 2005;25:6165–6177.

Johnson L, Petty CS, and Neaves WB. A comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rats. *Biology of Reproduction.* 1980;22, 1233–1243. doi:10.1093/biolreprod/22.5.1233

Jung YH, Sauria MEG, Lyu X, et al. Chromatin States in Mouse Sperm Correlate with Embryonic and Adult Regulatory Landscapes. *Cell Rep.* 2017;18(6):1366-1382. doi:10.1016/j.celrep.2017.01.034

Kaati G, Bygren LO, Pembrey M, Sjöström M. Transgenerational response to nutrition, early life circumstances and longevity. *Eur J Hum Genet.* 2007;15(7):784-790. doi:10.1038/sj.ejhg.5201832

Kaji K, Oda S, Shikano T, et al. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat Genet.* 2000;24(3):279-282. doi:10.1038/73502

Kawano N, Araki N, Yoshida K, et al. Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(11):4145-4150. doi:10.1073/pnas.1320715111

Keegan A, Martini R, Batey R. Ethanol-related liver injury in the rat: a model of steatosis, inflammation and pericentral fibrosis. *J Hepatol.* 1995;23(5):591-600. doi:10.1016/0168-8278(95)80067-0

Kierszenbaum AL, Tres LL. Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. *J Cell Biol.* 1975;65(2):258-270. doi:10.1083/jcb.65.2.258

Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T. Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(50):18028-18033. doi:10.1073/pnas.0506825102

Kim P, Choi CS, Park JH, et al. Chronic exposure to ethanol of male mice before mating produces attention deficit hyperactivity disorder-like phenotype along with epigenetic dysregulation of dopamine transporter expression in mouse offspring. *J Neurosci Res.* 2014;92(5):658-670. doi:10.1002/jnr.23275

Knezovich JG, Ramsay M. The effect of preconception paternal alcohol exposure on epigenetic remodeling of the h19 and rasgrf1 imprinting control regions in mouse offspring. *Front Genet.* 2012;22;3:10.

Krejčí J, Stixová L, Pagáčová E, et al. Post-Translational Modifications of Histones in Human Sperm. *J Cell Biochem.* 2015;116(10):2195-2209. doi:10.1002/jcb.25170

Kren R, Kikuchi K, Nakai M, et al. Intracytoplasmic sperm injection in the pig: where is the problem?. *J Reprod Dev.* 2003;49(4):271-273. doi:10.1262/jrd.49.271

Kumar S, Murarka S, Mishra VV, Gautam AK. Environmental y lifestyle factors in deterioration of male reproductive health. *Indian J Med Res.* 2014;140 Suppl(Suppl 1):S29-35.

Kvist U, Björndahl L. Zinc preserves an inherent capacity for human sperm chromatin decondensation. *Acta Physiol Scand.* 1985 Jun;124(2):195-200.

Kyjovska ZO, Boisen AMZ, Jackson P, et al. Daily sperm production: Application in studies of prenatal exposure to nanoparticles in mice. *Reproductive Toxicology.* 2013;36, 88–97. doi:10.1016/j.reprotox.2012.12.005

La Spina FA, Romanato M, Brugo-Olmedo S, De Vincentiis S, Julianelli V, Rivera RM y Buffone MG. Heterogeneous distribution of histone methylation in mature human sperm. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31:45–49

La Spina FA, Puga Molina LC, Romarowski A, et al. Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Dev Biol.* 2016;411(2):172-182. doi:10.1016/j.ydbio.2016.02.006

LaBarba RC, White JL, Stewart A, Buckley N. The effects of litter size on emotional reactivity in BALB/c mice. *Bull. Psychonomic Soc.* 1973;1 (1), 37–38.

Lambrot R, Xu C, Saint-Phar S, et al. Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. *Nat Commun.* 2013;4:2889. doi:10.1038/ncomms3889

Lan N, Yamashita F, Halpert AG, et al. Prenatal ethanol exposure alters the effects of gonadectomy on hypothalamic-pituitary-adrenal activity in male rats. *J Neuroendocrinol.* 2006;18(9):672-684. doi:10.1111/j.1365-2826.2006.01462.x

Larkby C, Day N. The effects of prenatal alcohol exposure. *Alcohol Health Res World.* 1997;21(3):192-8.

Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science.* 2000;287(5451):319-321. doi:10.1126/science.287.5451.319

Lee JW, Yang X. Factors affecting fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic injection of sperm. *Mol Reprod Dev.* 2004;68(1):96-102. doi:10.1002/mrd.20044

Lee JW, Tian XC, Yang X. Failure of male pronucleus formation is the major cause of lack of fertilization and embryo development in pig oocytes subjected to intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod.* 2003;68(4):1341-1347. doi:10.1095/biolreprod.102.009001

Legoff L, D'Cruz SC, Tevosian S, Primig M, Smagulova F. Transgenerational Inheritance of Environmentally Induced Epigenetic Alterations during Mammalian Development. *Cells.* 2019;8(12):1559. Published 2019 Dec 3. doi:10.3390/cells8121559

Lesch BJ, Dokshin GA, Young RA, McCarrey JR, Page DC. A set of genes critical to development is epigenetically poised in mouse germ cells from fetal stages through completion of meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(40):16061-16066. doi:10.1073/pnas.1315204110

Lévesque D, Veilleux S, Caron N, Boissonneault G. Architectural DNA-binding properties of the spermatidal transition proteins 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;252(3):602-609. doi:10.1006/bbrc.1998.9687

Liang F, Diao L, Jiang N, et al. Chronic exposure to ethanol in male mice may be associated with hearing loss in offspring. *Asian J Androl*. 2015;17(6):985-990. doi:10.4103/1008-682X.160267

Liang F, Diao L, Liu J, et al. Paternal ethanol exposure and behavioral abnormalities in offspring: associated alterations in imprinted gene methylation. *Neuropharmacology*. 2014;81:126-133. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.01.025

Lieber CS. Perspectives: do alcohol calories count?. *Am J Clin Nutr*. 1991;54(6):976-982. doi:10.1093/ajcn/54.6.976

Lismer A, Siklenka K, Lafleur C, Dumeaux V, Kimmins S. Sperm histone H3 lysine 4 trimethylation is altered in a genetic mouse model of transgenerational epigenetic inheritance. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(20):11380-11393. doi:10.1093/nar/gkaa712

Liu X, Wang C, Liu W, et al. Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos. *Nature*. 2016;537(7621):558-562. doi:10.1038/nature19362

Longo FJ. Fertilization: a comparative ultrastructural review. *Biol. Reprod*. 1973;9:149–215.

Luo LF, Hou CC, Yang WX. Small non-coding RNAs and their associated proteins in spermatogenesis. *Gene*. 2016;578(2):141-157. doi:10.1016/j.gene.2015.12.020

Ly L, Chan D, Aarabi M, et al. Intergenerational impact of paternal lifetime exposures to both folic acid deficiency and supplementation on reproductive outcomes and imprinted gene methylation. *Mol Hum Reprod*. 2017;23(7):461-477. doi:10.1093/molehr/gax029

Maher ER, Afnan M, Barratt CL. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: epigenetics, imprinting, ART and icebergs?. *Hum Reprod.* 2003;18(12):2508-2511. doi:10.1093/humrep/deg486

Mali P, Sandberg M, Vuorio E, Yelick PC, Hecht NB, Parvinen M. Localization of protamine 1 mRNA in different stages of the cycle of the rat seminiferous epithelium. *J Cell Biol.* 1988;107(2):407-412. doi:10.1083/jcb.107.2.407

Mancinelli R, Ceccanti M, Laviola G. Fetal alcohol spectrum disorders (FASD): from experimental biology to the search for treatment. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007;31(2):165-167. doi:10.1016/j.neubiorev.2006.08.003

Maneesh M, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM. Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2006;50(3):291-296.

Mann MR, Bartolomei MS. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. *Genome Biol.* 2002;3(2):REVIEWS1003. doi:10.1186/gb-2002-3-2-reviews1003

Marcho C, Oluwayiose OA, Pilsner JR. The preconception environment and sperm epigenetics. *Andrology.* 2020;8(4):924-942. doi:10.1111/andr.12753

Marjonen H, Sierra A, Nyman A, et al. Early maternal alcohol consumption alters hippocampal DNA methylation, gene expression and volume in a mouse model. *PLoS One.* 2015;10(5):e0124931. Published 2015 May 13. doi:10.1371/journal.pone.0124931

Matsumoto, Y., Goto, S., Hashimoto, H., Koikeguchi, S., Shiotani, M., y Okada, H. 2010. A healthy birth after intracytoplasmic sperm injection using ejaculated spermatozoa from a patient with Kartagener's syndrome. *Fertil Steril* 93, 2074-2079.

McPherson S, Longo FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem.* 1993;37(2):109-128

Meek LR, Myren K, Sturm J, Bureau D. Acute paternal alcohol use affects offspring development and adult behavior. *Physiol Behav.* 2007;91(1):154-160. doi:10.1016/j.physbeh.2007.02.004

Meistrich ML, Trostle-Weige PK, Lin R, Bhatnagar YM, Allis CD. Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol Reprod Dev.* 1992;31(3):170-181. doi:10.1002/mrd.1080310303

Meistrich ML, Wilson G, Porter KL, Huhtaniemi I, Shetty G, Shuttlesworth GA. Restoration of spermatogenesis in dibromochloropropane (DBCP)-treated rats by hormone suppression. *Toxicol Sci.* 2003;76(2):418-426. doi:10.1093/toxsci/kfg237

Meyer RG, Ketchum CC, Meyer-Ficca ML. Heritable sperm chromatin epigenetics: a break to remember. *Biol Reprod.* 2017;97(6):784-797.

Miki K, Clapham DE. Rheotaxis guides mammalian sperm. *Curr Biol.* 2013;23:443–452.

Millar MR, Sharpe RM, Weinbauer GF, Fraser HM, Saunders PT. Marmoset spermatogenesis: organizational similarities to the human. *Int J Androl.* 2000;23(5):266-277. doi:10.1046/j.1365-2605.2000.00236.x

Miller TR, Spicer RS. Hospital-admitted injury attributable to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res.* 2012;36(1):104-112. doi:10.1111/j.1530-0277.2011.01593.x

Miska EA, Ferguson-Smith AC. Transgenerational inheritance: Models and mechanisms of non-DNA sequence-based inheritance. *Science.* 2016;354(6308):59-63. doi:10.1126/science.aaf4945

Miyado K, Yamada G, Yamada S, et al. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*. 2000;287(5451):321-324. doi:10.1126/science.287.5451.321

Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, et al. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(35):12921-12926. doi:10.1073/pnas.0710608105

Morgan MY, Levine JA. Alcohol and nutrition. *The Proceedings of the Nutrition Society*.1988;47(2), pp.85–98.

Muro Y, Hasuwa H, Isotani A, et al. Behavior of Mouse Spermatozoa in the Female Reproductive Tract from Soon after Mating to the Beginning of Fertilization. *Biol Reprod*. 2016;94(4):80. doi:10.1095/biolreprod.115.135368

Muthusami KR, Chinnaswamy P. Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertil Steril*. 2005;84(4):919–24.

Mychasiuk R, Zahir S, Schmold N, Ilnytskyy S, Kovalchuk O, Gibb R. Parental enrichment and offspring development: modifications to brain, behavior and the epigenome. *Behav Brain Res*. 2012;228(2):294-298. doi:10.1016/j.bbr.2011.11.036

Nanassy L, Carrell DT. Paternal effects on early embryogenesis. *J Exp Clin Assist Reprod*. 2008;5:2. Published 2008 May 16. doi:10.1186/1743-1050-5-2

Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RA. Human pre-implantation embryo development. *Development*. 2012;139(5):829-841. doi:10.1242/dev.060426

Niemitz EL, Feinberg AP. Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation. *Am J Hum Genet*. 2004;74(4):599-609. doi:10.1086/382897

Okada Y, Scott G, Ray MK, Mishina Y, Zhang Y. Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature*. 2007;450(7166):119-123. doi:10.1038/nature06236

Okuwaki M, Sumi A, Hisaoka M, et al. Function of homo- and hetero-oligomers of human nucleoplasmin/nucleophosmin family proteins NPM1, NPM2 and NPM3 during sperm chromatin remodeling. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(11):4861-4878. doi:10.1093/nar/gks162

Oliva R, Bazett-Jones D, Mezquita C, Dixon GH. Factors affecting nucleosome disassembly by protamines in vitro. Histone hyperacetylation and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins. *J Biol Chem*. 1987;262(35):17016-17025.

Oliva R, Bazett-Jones DP, Locklear L, Dixon GH. Histone hyperacetylation can induce unfolding of the nucleosome core particle. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(9):2739-2747. doi:10.1093/nar/18.9.2739

Oliva R, Mezquita C. Marked differences in the ability of distinct protamines to disassemble nucleosomal core particles in vitro. *Biochemistry*. 1986;25(21):6508-6511. doi:10.1021/bi00369a025

Ørstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB, et al. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet*. 2003;72(1):218-219. doi:10.1086/346030

Ouko LA, Shantikumar K, Knezovich J, Haycock P, Schnugh DJ, Ramsay M. Effect of alcohol consumption on CpG methylation in the differentially methylated regions of H19 and IG-DMR in male gametes: implications for fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009;33(9):1615-1627. doi:10.1111/j.1530-0277.2009.00993.x

Paradowska AS, Miller D, Spiess AN, Vieweg M, Cerna M, Dvorakova-Hortova K, Bartkuhn M, Schuppe HC, Weidner W, & Steger K. Genome wide identification of promoter binding sites

for H4K12ac in human sperm and its relevance for early embryonic development. *Epigenetics*. 2012;7(9),1057-1070. <https://doi.org/10.4161/epi.21556>

Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod*. 1997;12(3):532-541. doi:10.1093/humrep/12.3.532

Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, et al. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Hum Genet*. 2006;14(2):159-166. doi:10.1038/sj.ejhg.5201538

Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010;365(1546):1663-1678. doi:10.1098/rstb.2010.0026

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

Puga Molina LC, Luque GM, Balestrini PA, Marín-Briggiler CI, Romarowski A, Buffone MG. Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. *Front. Cell Dev. Biol*. 2018;6:72.

Radford EJ, Ito M, Shi H, et al. In utero effects. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. *Science*. 2014;345(6198):1255903. doi:10.1126/science.1255903

Ralt D, Goldenberg M, Fetterolf P, et al. Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:2840–2844

Ralt D, Manor M, Cohen-Dayag A, et al. Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors. *Biol Reprod*. 1994;50:774–785.

Rathke C, Baarends W.M, Jayaramaiah-Raja S, Bartkuhn M, Renkawitz R, Renkawitz-Pohl R. Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*, *J. Cell Sci*. 2007;120:1689–1700.

Raz T, Shalgi R. Early events in mammalian egg activation. *Hum Reprod.* 1998;13 Suppl 4:133-145. doi:10.1093/humrep/13.suppl_4.133

Richards EJ. Inherited epigenetic variation — revisiting soft inheritance. *Nat. Rev. Genet.* 2006;7, 395–401.

Rocha NR, Braz JKFDS, de Souza SRG, et al. Testicular morphometry of rats with Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine. *Anim Reprod.* 2021;18(2):e20200051. doi:10.1590/1984-3143-AR2020-0051

Rompala GR, Mounier A, Wolfe CM, Lin Q, Lefterov I, Homanics GE. Heavy Chronic Intermittent Ethanol Exposure Alters Small Noncoding RNAs in Mouse Sperm and Epididymosomes. *Front Genet.* 2018;9:32. Published 2018 Feb 8. doi:10.3389/fgene.2018.00032

Russell L. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am. J. Anat.* 1977;148 (3), 313–328.

Russell LD, Sinhá-Hikim AP, Ettlin RA, Clegg ED. Evaluation of the testis: histological and histopathological. 1ed. Cache River Press, 1990.

Saitou M, Kurimoto K. 2014. Paternal nucleosomes: Are they retained in developmental promoters or gene deserts? *Dev Cell.* 30(1):6–8.

Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N, Barratt CL. Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes?. *Hum Reprod Update.* 2015;21(6):711-726. doi:10.1093/humupd/dmv042

Salaspuro MP, Lieber CS. Non-uniformity of blood ethanol elimination: its exaggeration after chronic consumption. *Ann Clin Res.* 1978;10(5):294-297.

Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril*. 2003;79 Suppl 3:1597-1605. doi:10.1016/s0015-0282(03)00337-6

Samans B, Yang Y, Krebs S, et al. Uniformity of nucleosome preservation pattern in Mammalian sperm and its connection to repetitive DNA elements. *Dev Cell*. 2014;30(1):23–35.

Samson M, Jow MM, Wong CC, et al. The specification and global reprogramming of histone epigenetic marks during gamete formation and early embryo development in *C. elegans*. *PLoS Genet*. 2014;10(10):e1004588. Published 2014 Oct 9. doi:10.1371/journal.pgen.1004588

Sánchez MC, Fontana VA, Galotto C, et al. Murine sperm capacitation, oocyte penetration and decondensation following moderate alcohol intake. *Reproduction*. 2018;155(6):529-541. doi:10.1530/REP-17-0507

Sansone A, Di Dato C, de Angelis C, et al. Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018;16(1):3. Published 2018 Jan 15. doi:10.1186/s12958-018-0320-7

Saunders CM, Larman MG, Parrington J, et al. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development*. 2002;129(15):3533-3544.

Schagdarsurengin U, Paradowska A, Steger K. Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction. *Nat Rev Urol*. 2012;9:609–619.

Sharma A, Gill JP, Bedi JS. Monitoring of pesticide residues in human blood from Punjab, India. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2015;94(5):640-6.

Sharpe RM. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 2010;365(1546), 1697–1712.

Shi L, Wu J. Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7, 59.

Siervo GE, Vieira HR, Ogo FM, et al. Spermatic and testicular damages in rats exposed to ethanol: influence of lipid peroxidation but not testosterone. *Toxicology*. 2015;330:1-8. doi:10.1016/j.tox.2015.01.016

Skinner MK, Guerrero-Bosagna C. Environmental signals and transgenerational epigenetics. *Epigenomics*. 2009;1(1):111-117. doi:10.2217/epi.09.11

Skvortsova K, Iovino N, Bogdanović O. Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(12):774-790. doi:10.1038/s41580-018-0074-2

Stephens PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978;2(8085):366. doi:10.1016/s0140-6736(78)92957-4.

Stival C, Puga Molina Ldel C, Paudel B, Buffone MG, Visconti PE, Krapf D. Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2016;220:93-106. doi:10.1007/978-3-319-30567-7_5

Stouder C, Somme E, Paoloni-Giacobino A. Prenatal exposure to ethanol: a specific effect on the H19 gene in sperm. *Reprod Toxicol*. 2011;31(4):507-12.

St-Pierre J, Hivert MF, Perron P, et al. IGF2 DNA methylation is a modulator of newborn's fetal growth and development. *Epigenetics*. 2012;7(10):1125-1132. doi:10.4161/epi.21855

Streissguth AP, Landesman-Dwyer S, Martin JC, Smith DW. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. *Science*. 1980;209(4454):353-361. doi:10.1126/science.6992275

Suarez SS. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell Tissue Res*. 2016;363:185–194.

Sun F, Bahat A, Gakamsky A, et al. Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants. *Hum Reprod.* 2005;20:761–767.

Tanaka, T. Effects of litter size on behavioral development in mice. *Reprod. Toxicol.* 1998;12(6), 613–617

Taylor DM, Ray PF, Ao A, Winston RM, Handyside AH. Paternal transcripts for glucose-6-phosphate dehydrogenase and adenosine deaminase are first detectable in the human preimplantation embryo at the three- to four-cell stage. *Mol Reprod Dev.* 1997;48(4):442-448. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199712)48:4<442::AID-MRD4>3.0.CO;2-Q

Tegelenbosch RA, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res.* 1993;290(2):193-200. doi:10.1016/0027-5107(93)90159-d

Teperek M, Simeone A, Gaggioli V, et al. Sperm is epigenetically programmed to regulate gene transcription in embryos. *Genome Res.* 2016;26(8):1034-1046. doi:10.1101/gr.201541.115

Toshimori K, Eddy EM. The Spermatozoon. *Knobil Neill's Physiol. Reprod. Physiol.* 2015;99–148

Toyoda Y, Chang MC. Capacitation of epididymal spermatozoa in a medium with high K-Na ratio and cyclic AMP for the fertilization of rat eggs in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 1974;36:125–34.

Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998;13(7):1864-71.

van der Heijden GW, Derijck AA, Ramos L, et al. Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev Biol.* 2006;298(2):458-69.

Van Thiel DH, Gavaler JS, Lester R, et al. Alcohol-induced ovarian failure in the rat. *Journal of Clinical Investigation*. 1978;61:624–632.

Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem*. 2018;62:2-10.

Vieweg M, Dvorakova-Hortova K, Dudkova B, et al. Methylation analysis of histone H4K12ac-associated promoters in sperm of healthy donors and subfertile patients. *Clinical epigenetics*. 2015;7(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0058-4>

Vigil P, Orellana RF, Cortés ME. Modulation of spermatozoon acrosome reaction. *Biol. Res*. 2011;44:151–9.

Villanueva-Diaz C, Vadillo-Ortega F, Kably- Ambe A, et al. Evidence that human follicular fluid contains a chemoattractant for spermatozoa. *Fertil Steril*. 1990;54:1180–1182.

Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, et al. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*. 1995;121(4):1139-1150.

Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*. 1995;121(4):1129-1137.

Visconti PE, Krapf D, de la Vega-Beltrán JL, Acevedo JJ, Darszon A. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl*. 2011;13(3):395-405. [doi:10.1038/aja.2010.69](https://doi.org/10.1038/aja.2010.69)

Wachten D, Jikeli JF, Kaupp UB. Sperm Sensory Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(7):a028225. Published 2017 Jul 5. [doi:10.1101/cshperspect.a028225](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028225)

Waring AJ, Rottenberg H, Ohnishi T, Rubin E. The effect of chronic ethanol consumption on temperature-dependent physical properties of liver mitochondrial membranes. *Arch Biochem Biophys*. 1982;216(1):51-61. doi:10.1016/0003-9861(82)90187-4

Weber A, Karst J, Gilbert B, Kimmins JP. *Thuja plicata* exclusion in ectomycorrhiza-dominated forests: testing the role of inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia*. 2005;143(1):148-156. doi:10.1007/s00442-004-1777-y

Willis BR, Anderson RA Jr, Oswald C, Zaneveld LJ. Ethanol-induced male reproductive tract pathology as a function of ethanol dose and duration of exposure. *J Pharmacol Exp Ther*. 1983;225(2):470-478.

Wolf DE, Lipscomb AC, Maynard VM. Causes of nondiffusing lipid in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biochemistry*. 1988;27(3):860-865. doi:10.1021/bi00403a004

Wozniak DF, Cicero TJ, Kettinger L 3rd, Meyer ER. Paternal alcohol consumption in the rat impairs spatial learning performance in male offspring. *Psychopharmacology (Berl)*. 1991;105(2):289-302. doi:10.1007/BF02244324

Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* 2003;7(4), 277-284.

Yanagimachi R. Mammalian Fertilization. *Physiol. Reprod*. 1994;189–317

Yanagimachi R, Chang MC. Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature*. 1963;200:281–2.

Yanagimachi R, Bhattacharyya A. Acrosome-reacted guinea pig spermatozoa become fusion competent in the presence of extracellular potassium ions. *J. Exp. Zool*. 1988;248:354–360.

Yip-Schneider MT, Doyle CJ, McKillop IH, et al. Alcohol induces liver neoplasia in a novel alcohol-preferring rat model. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011;35.

Young TA, Bailey SM, Van Horn CG, et al. Chronic ethanol consumption decreases mitochondrial and glycolytic production of ATP in liver. *Alcohol Alcohol*. 2006;41 (3), 254-260.

Zeid, D, Gould TJ. Impact of nicotine, alcohol, and cocaine exposure on germline integrity and epigenome. *Neuropharmacology*. 2020;173, 108127.

Zenk F, Loeser E, Schiavo R, Kilpert F, Bogdanović O, Iovino N. Germ line-inherited H3K27me3 restricts enhancer function during maternal-to-zygotic transition. *Science*. 2017;357(6347):212-216. doi:10.1126/science.aam5339

Zhang X, Sliwowska JH, Weinberg J. Prenatal alcohol exposure and fetal programming: effects on neuroendocrine and immune function. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005;230(6):376-388. doi:10.1177/15353702-0323006-05

Zheng H, Huang B, Zhang B, et al. Resetting Epigenetic Memory by Reprogramming of Histone Modifications in Mammals. *Mol Cell*. 2016;63(6):1066-1079. doi:10.1016/j.molcel.2016.08.032

Receta medio de cultivo A+B:

Solución A (50 ml):

Componente	Cantidad	PM/Concentración
NaCl	0.5803g	58.44g/mol
Glucosa	0.1g	180g/mol
KCl	0.0201g	74.56g/mol
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0.0056g	177.99g/mol
Piruvato de Na	0.0055g	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.0264g	147.02g/mol
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.0102g	203.30g/mol
Lactato	0.35 ml	
Penicilina	0.0063g	
Streptomycina	0.0050g	
Rojo fenol	Punta de tip	

Solución B (50 ml):

Componente	Cantidad	PM/Concentración
NaHCO ₃	0.2106g	84.01g/mol

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

El día del experimento, preparar 10 ml de medio: 5 ml sol A + 5 ml sol B + 30 mg de BSA. Agregar la albúmina por encima del medio, sin agitar. Incubar en la estufa de CO₂ a 37°C por lo menos 30 minutos para equilibrar (no cerrar la tapa del tubo totalmente para que pueda entrar el CO₂). Mantener el medio siempre a 37°C y colocar en la estufa cuando no se usa.