
Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS



EFFECTO FACILITADOR DEL GLUTATION REDUCIDO EN LA
DESCONDENSACION NUCLEAR INDUCIDA POR LA HEPARINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

SERGIO GONZALEZ VALENCIA

GUADALAJARA, JALISCO NOVIEMBRE 1988

Al M.V.Z. GABRIEL MORENO LLAMAS

Por su acertada dirección y
colaboración en esta tesis.

Al Biol. NESTOR M. DELGADO P. y

A la M. en C. ROSALINA REYES L.

Por su apoyo y por darme la oportunidad
de penetrar al mundo de sus conoci-
mientos.

A MIS PADRES:

Con todo mi agradecimiento por
el esfuerzo incalculable,
coadyuvando de manera íntegra
al logro de esta realidad.

A MIS HERMANOS:

Por su comprensión durante
el trayecto de mi
profesionalización.

A MIS AMIGOS Y COMPANEROS:

Por ayudarme con sus
comentarios y discusiones.

EFECTO FACILITADOR DEL GLUTATION REDUCIDO EN LA
DESCONDENSACION NUCLEAR INDUCIDA POR LA HEPARINA.

SERGIO GONZALEZ VALENCIA

I N D I C E

| | Pág. |
|--|------|
| INTRODUCCION | 1 |
| OBJETIVOS | 6 |
| HIPOTESIS | 7 |
| MATERIAL Y METODOS | 8 |
| -Tratamiento de los espermatozoides humanos en diferentes condiciones de incubación con Glutation reducido, Heparina e iones. | 8 |
| -Determinación del número de espermatozoides. | 10 |
| -Diagrama de trabajo. | 13 |
| -Incubación de espermatozoides humanos con Glutation reducido, en presencia de 41.6 uM de Heparina. | 14 |
| -Incubación de espermatozoides humanos con Heparina en presencia de 5 mM de Glutation. | 14 |
| -Incubación de espermatozoides humanos con diferentes iones en presencia de 31.6 uM de Heparina y 5 mM de GSH. | 14 |
| -Incubación de espermatozoides humanos en presencia de Heparina 31.6 uM con 10 mM de Mercaptoetanol, Ditiotretior y Glutation Oxidado. | 15 |

| | Pág. |
|--------------|------|
| RESULTADOS. | 17 |
| DISCUSION. | 22 |
| RESUMEN | 27 |
| CONCLUSIONES | 28 |
| BIBLIOGRAFIA | 29 |

INTRODUCCION.

Los espermatozoides son el estadio final de la espermatogénesis, proceso mediante el cual, las espermatogonias pasando por diversas etapas de diferenciación, adquieren la estructura y fisiología adecuada para cumplir con su destino biológico más aparente, fertilizar al óvulo depositando el complemento masculino de ADN en el citoplasma del gameto femenino.

En las fases iniciales de la espermatogénesis, son producidas un gran número de células diploides por mitosis sucesivas, acompañadas de fenómenos característicos de diferenciación, hasta llegar al estadio de espermatoцитos primarios, los cuales reducen su número de cromosomas durante la meiosis, transformándose en espermatoцитos secundarios (haploides) y posteriormente en espermátides. La diferenciación de las espermátides hasta convertirse en espermatozoides es llamada espermiogénesis y comprende como parte de los fenómenos de adquisición de la morfología característica del espermatozoide, la estructuración del núcleo.

El núcleo de los espermatozoides de mamíferos es un organelo altamente condensado y excepcionalmente estable, para adquirir estas propiedades los espermatozoides de mamíferos deben ser sometidos a una larga serie de procesos complicados que se inician en el testículo con el reemplazamiento de las histonas de tipo somático por protaminas ricas en cisteínas específicas del espermatozoide y con la formación de enlaces

disulfuros (S-S) entre las cisteínas de la protamina (6), este complicado proceso necesita ser revertido después de la fecundación como un prerrequisito para la transcripción de la información genética del espermatozoide.

La obtención in vitro de cromatina espermática de células eyaculadas y maduras requieren de tratamientos drásticos (8), sin embargo, la descondensación in vivo de la cromatina nuclear se lleva a cabo rápidamente cuando el espermatozoide se incorpora al citoplasma del óvulo, para iniciarse inmediatamente la formación del pronúcleo masculino (38, 49).

Recientemente se ha venido estudiando la descondensación del núcleo del espermatozoide induciéndola in vitro, por una gran variedad de tratamientos (14, 32). Pero aún se desconocen por completo los mecanismos involucrados en la transición del estado heterocromático (CONDENSADO) al eucromático (DESCONDENSADO) en la cromatina nuclear espermática, y en el incremento de la accesibilidad del templado del ADN nuclear, evidencias considerables han presentado que la reducción de enlaces disulfuro establecidos entre las protaminas ricas en cisteínas y la cromatina espermática de eutéricos puede ser el mecanismo básico por el cual se completa la actividad descondensante del espermatozoide humano (51). Por otro lado, la experiencia de varias investigaciones indican que los compuestos sulfhidrilos por sí solos, aún a una concentración más alta que la que se encuentra en condiciones fisiológicas, son incapaces de inducir la descondensación del núcleo del

espermatozoide (24, 25), y que éstos requieren de la adición de cualquier detergente (10, 18 y 24), o de otro tipo de compuestos para llevarla a cabo (20, 41).

Investigaciones recientes han demostrado que la incubación de espermatozoides en presencia de heparina, logra descondensarlos y el hinchamiento que se produce en los núcleos empieza aproximadamente 30 minutos después de añadir la heparina, siendo un fenómeno dependiente de la concentración, alcanzando hasta un 83% de núcleos descondensados después de 6 horas de incubación con 30 mg de heparina por mililitro (15). Se ha postulado que este efecto corresponde en gran medida a la presencia de receptores específicos para los mucopolisacáridos en la membrana del espermatozoide (16).

Por otro lado, se ha reportado que el plasma seminal de origen prostático tiene la habilidad de proteger rápidamente contra la acción descondensante de la heparina (40), y del do desilsulfato (SDS) (22). La posible identificación del componente prostático que actúa como estabilizador de la cromatina nuclear en el plasma seminal ha sido propuesta por Kvist - - (28), quien encontró que los espermatozoides sometidos a la acción del SDS sufrieron descondensación de su cromatina si éstos eran pretratados con sustancias que se conoce pueden liberar zinc de los espermatozoides (EDTA, ALBUMINA), sólo el zinc y ningún otro catión prostático (Ca^{++} Mg^{++}), puede inhibir la descondensación nuclear inducida por la heparina llevada a cabo experimentalmente, de manera que el zinc podría te-

ner un efecto inhibitorio reversible sobre los grupos tiol - intracelulares derivados de los rompimientos de los puentes (S-S) presentes en la cromatina; por lo tanto los espermatozoides con grupos tiol libres son fácilmente oxidados en el medio atmosférico (34), sin embargo, los grupos tiol unidos al zinc son considerablemente menos susceptibles a la oxidación. La importancia del zinc en el espermatozoide podría ser la de proteger los grupos tiol de la destrucción oxidativa después de la eyaculación (30), así que el espermatozoide podría tener un mecanismo intrínseco para controlar la descondensación que estaría temporalmente inhibida por el zinc y al liberarlo en el tracto genital femenino, este mecanismo se reactivaría (29).

Recientemente se ha involucrado al Glutatión en la reducción de enlaces disulfuro y en la subsecuente dispersión de la cromatina espermática durante la fertilización, sin embargo, el Glutatión reducido (GSH) que es el principal grupo tiol intracelular (35), ha sido implicado en jugar un papel importante en estos eventos (11, 33, 38).

Por ejemplo, el tratamiento in vitro de los óvulos maduros de hamster con un oxidante específico del GSH, como la diamina, inhibe reversiblemente la descondensación del núcleo de espermatozoides (38), y la disminución sistémica del GSH ovárico con L-butionina-S,R - Sulfoximina (BSO), que es un inhibidor específico de la síntesis de GSH (22), bloqueó la descondensación nuclear del espermatozoide de ratón durante

la fertilización in vitro (11). Por algún tiempo se ha conocido de la habilidad de los óvulos de muchas especies de mamíferos para descondensar el núcleo del espermatozoide y que esto es directamente proporcional al estado de maduración del óvulo (1, 2, 7, 36, 43, 46).

Por tal motivo en el presente trabajo se estudió el efecto de compuestos tiol (DTT, Mercaptoetanol, GSH), Iones (Ca^{++} y Zn^{++}) y GSSG ya sea solos o combinados con heparina para tratar de dilucidar cuáles de estos compuestos participan en la descondensación nuclear y si de alguna manera pudieran ser las condiciones que se presentan fisiológicamente.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el posible mecanismo de descondensación nuclear del espermatozoide humano en el óvulo.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar el papel del glutatión en la descondensación del núcleo del espermatozoide humano inducida por la heparina.
2. Estudiar el efecto de los iones divalentes en la descondensación nuclear por la heparina en presencia del glutatión.
3. Estudiar la descondensación de los núcleos de los espermatozoides humanos a diferentes concentraciones de heparina y glutatión.

HIPOTESIS.

Ya que la descondensación del núcleo del espermatozoide ha sido inducida in vitro por el tratamiento de las células con la heparina, además de las evidencias que indican que el glutatión presente en los óvulos maduros le confieren a estos últimos, actividad descondensante sobre los espermatozoides y que tanto la heparina como el glutatión se encuentran de manera fisiológica en el citoplasma del óvulo (3, 38), -- nos hace postular que el glutatión participa como facilitador en el fenómeno de descondensación inducida por la heparina en los espermatozoides previamente liberados de Zn y que estos fenómenos pudieran ser el mecanismo de descondensación nuclear para la formación del pronúcleo masculino que se lleva a cabo en el citoplasma del óvulo bajo condiciones fisiológicas.

MATERIAL Y METODOS.

EL TRATAMIENTO DE LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS EN DIFERENTES CONDICIONES DE INCUBACION CON GLUTATION REDUCIDO, HEPARINA E IONES.

EQUIPO

- Centrífuga Sorvall, Modelo GLC-1
- Baño María, Dubonoff Metabolic, Shaking Incubator, ajustado a 37°C.
- Potenciómetro Metrohm Hersau Modelo Compensator E-388.
- Microscopio óptico Carl Zeiss.

REACTIVOS

- 1). Solución amortiguadora "A" (26).

Cloruro de potasio 113 mM, fosfato monobásico de potasio 12.5 mM. Fosfato dibásico de potasio 2.5 mM, Cloruro de magnesio 3 mM. Tris (hidroximetilamino metano) 20mM, adicionada con antibióticos.

Pesar 0.609 gr de cloruro de potasio, 1.70 gr de fosfato monobásico de potasio, 0.57 gr de fosfato dibásico de potasio 2.425 gr de cloruro de potasio, 0.6099 gr de cloruro de magnesio, 500 mg de estreptomina, 1000,000 UI de penicilina.

Disolver completamente cada reactivo en el orden dado, -

ajustar el pH a 7.4 con ácido clorhídrico IN y aforar a 1000 ml con agua destilada.

2). Fijador de Microscopía electrónica.

Pesar 2 gr de Paraformaldehído, adicionar 50 ml de agua desionizada y disolver a 60°C, agregando 3 gotas de NaOH I N enfriar y agregar 20 ml de glutaraldehído al 25%, añadir 90-ml de cacodilato de sodio 0.2 M, ajustar el pH a 7.4 y aforarla a 200 ml con agua desionizada (50).

3). Solución de cacodilato de sodio 0.2 M, pH 7.4.

Pesar 3.2 gr de cacodilato de sodio, disolver y aforar a 100 ml con agua desionizada, ajustar el pH a 7.4 con NaOH I N.

4). Eosina 5% y azul de anilina 5%.

Pesar 5 gr de eosina y 5 gr de azul de anilina, disolver y aforar a 100 ml con la solución amortiguadora "A" (13).

METODO.

El sémen fue obtenido de donadores jóvenes sanos y de fertilidad comprobada.

Las células espermáticas se separaron del plasma seminal centrifugando a 2,500 rpm durante 20 minutos, posteriormente se lavaron 2 veces con la solución amortiguadora "A" centrifugando a 2,500 rpm por 15 min y se resuspendieron a una concentración final de 25×10^6 células por mililitro.

DETERMINACION DEL NUMERO DE ESPERMATOZOIDES.

EQUIPO

- Cámara de Neubauer
- Micropipeta para glóbulos blancos
- Microscopio óptico Carl Zeiss
- Agitador para pipetas Mod. Yankee

REACTIVOS

1). Solución para contar espermatozoides.

Citrato de sodio 2.9% en formol 1%.

Se pesan 2.9 gr de citrato de sodio, se mide 1 ml de formol, se mezclan y se aforan a 100 ml con agua desionizada.

METODO

La cuantía del número de espermatozoides se lleva a cabo por el método propuesto por Belsey (4) que consiste en el uso de la cámara Neubauer y la micropipeta para glóbulos blancos, con esta última se aspira la suspensión celular a contar (volumen conocido) hasta la marca 0.5 y se completa hasta el aforo 1.1 con la solución para contar espermatozoides. La pipeta se agita perfectamente y se desechan las 3 primeras gotas. La cámara del hemacitómetro se llena con la suspensión celular y se deja reposar de 5 a 10 min con el objeto de que las-

células se sedimenten. El hemacitómetro se coloca en un microscopio óptico y se localiza la cuadrícula para glóbulos rojos procediendo a contar las células contenidas en los cuadros de cada esquina y el cuadro del centro, (Fig. 1), se suma la cantidad de células de los 5 cuadros y el resultado se multiplica por 20, que es la dilución empleada en la pipeta, por 5, ya que se contó la quinta parte de la cuadrícula y por 10,000, ya que el volumen de la cámara es de 10^{-4} ml, obteniéndose así el número de espermatozoides expresados en millones/ml. de la suspensión celular.

Fig. 1 Representación esquemática de la cuadrícula del hematocitómetro Neubauer utilizado para contar espermatozoides.

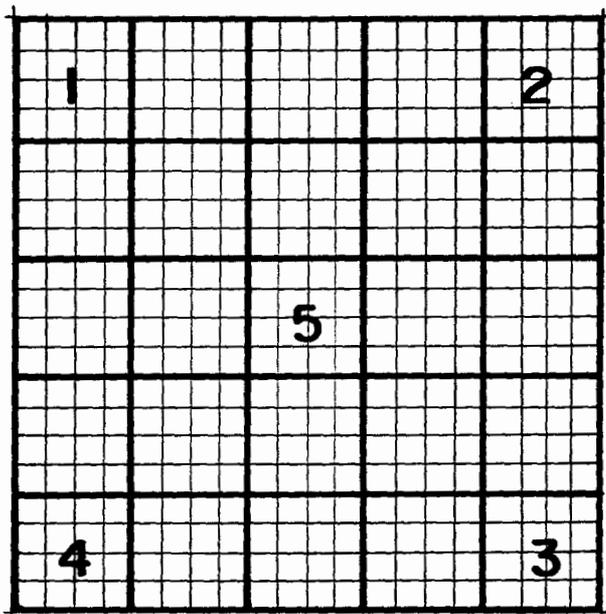


FIG. No. 1

DIAGRAMA DE TRABAJO

SEMEN

CENTRIFUGACION
(2,500 rpm/20 min.)

ESPERMATOZOIDES
2 lavados con la
sol. "A" y con-
tar (25×10^6 -
cél. por ml.)

INCUBACION

25×10^6 cél. con
41.6 mM de heparina
+ 0, 0.1, 0.5, 1,
5 y 10 μM de GSH a
37°C, por 20, 40, 60,
90 y 120 min.

INCUBACION

25×10^6 cél. con 5 mM de GSH
+ 31.6 μM de heparina, +
1.- 31.6 μM de CaCl_2
2.- 31.6 μM de ZnCl_2
3.- 31.6 μM de CaSO_4
4.- 31.6 μM de ZnSO_4

INCUBACION

25×10^6 cél. con
5 mM de GSH + 0, 1.6,
11.6, 21.6 y 31.6 μM
de heparina a 37°C
por 20, 40, 60, 90 y
120 min.

INCUBACION

25×10^6 cél. en 31.6
 μM de heparina con:
1.- 10 mM de mercapto
etanol.
2.- 10 mM de DTT.
3.- 10 mM de GSSG.

FIJACION

fijador de microscopía electrónica

TINSION

Eosina 5%, y azul de anilina 5%

MICROSCOPIA OPTICA

Observación de 20 campos por tubo
en contraste de fases.

I) INCUBACION DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS CON GLUTATION REDUCIDO, EN PRESENCIA DE 41.6 μ M DE HEPARINA.

Se incubaron 25×10^6 células en un mililitro de la solución amortiguadora "A" (26), y 41.6 μ M de heparina (PM=13,000) con 0, 0.1, 0.5, 1.5, y 10 mM de glutatión reducido (GSH), (PM=307.3), a 37°C por 20, 40, 60, 90 y 120 minutos, después de este tiempo, los espermatozoides se fijaron con glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 1% (50), y se tiñeron con azul de anilina al 5% y eosina al 5% (13), para observar el grado de descondensación por lo menos en 20 campos por tubo, en microscopía de contraste de fases.

II). INCUBACION DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS CON HEPARINA EN PRESENCIA DE 5mM DE GLUTATION.

Se incubaron 25×10^6 células en un mililitro de la solución amortiguadora "A" (26), con 5 mM de glutatión y 0, 1.6, 11.6, 21.6, y 31.6 μ M de heparina, a 37°C por 20, 40, 60, 90 y 120 minutos; después de este tiempo las células se fijaron con glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 1% (50), y se tiñeron con azul de anilina al 5% y eosina al 5% (13), para observar el grado de descondensación por lo menos en 20 campos por tubo en microscopía de contraste de fases.

III). INCUBACION DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS CON DIFERENTES IONES EN PRESENCIA DE 31.6 μ M DE HEPARINA Y 5 mM DE

GSH.

Se incubaron 25×10^6 células por mililitro con la Sol. amortiguadora "A" (26) en glutati6n reducido 5 mM y heparina 31.6 uM con: a) CaCl_2 , b) ZnCl_2 , c) CaSO_4 , d) ZnSO_4 , a una concentraci6n de 31.6 uM y una temperatura de 37°C por 10, 20, 30, 40, 60 y 90 minutos. Despu6s de este tiempo las células se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en paraformaldehído al 1% (50), y se tiñeron con eosina al 5% y azul de anilina al 5% (13), para observar el grado de descondensaci6n por lo menos en 20 campos por tubo en microscopía de contraste de fases.

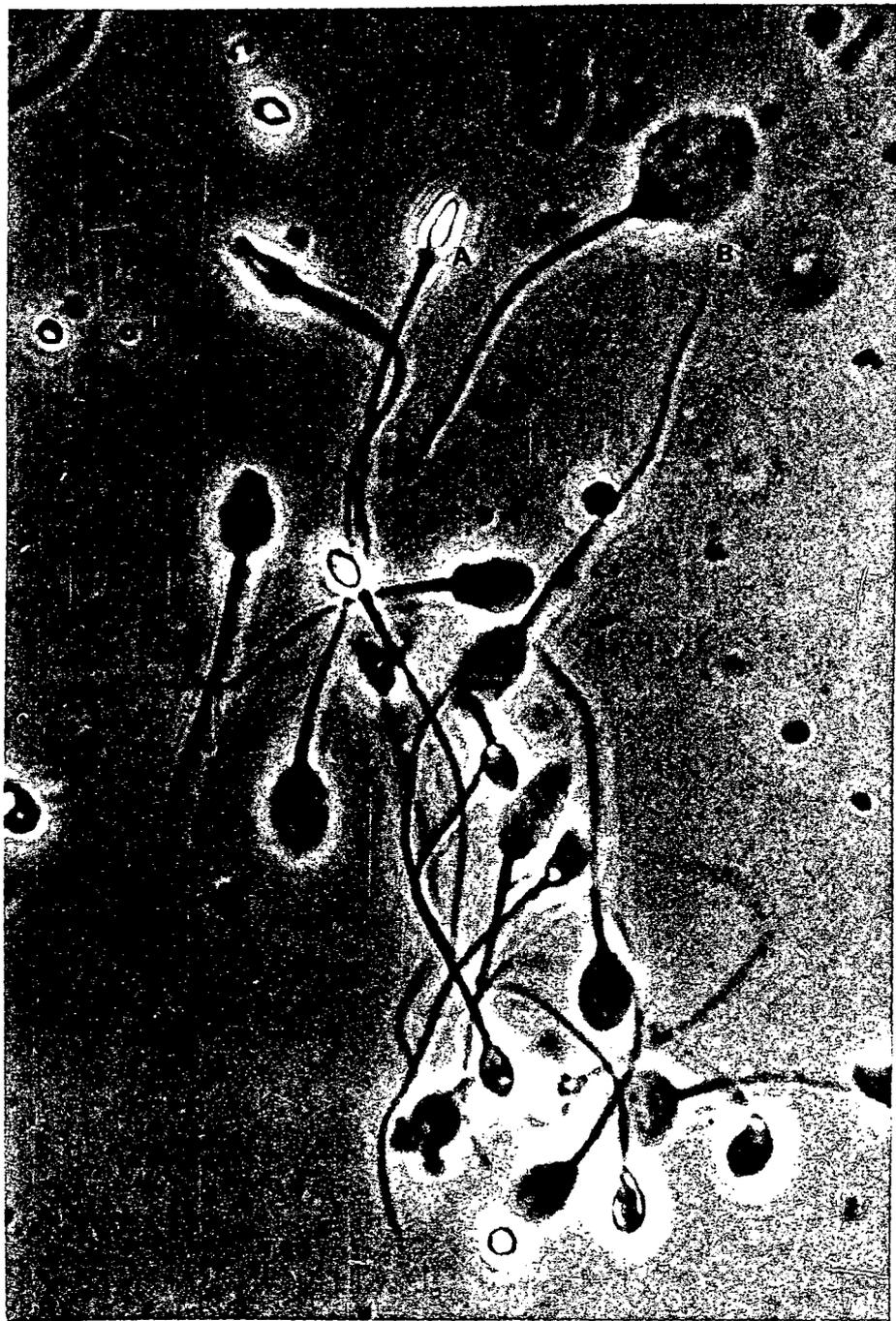
IV. INCUBACION DE ESPERMATOSOIDES HUMANOS EN PRESENCIA DE HEPARINA 31.6 uM CON 10 mM DE MERCAPTOETANOL, DITIOETREITOL Y GLUTATION OXIDADO.

Se incubaron 25×10^6 células por mililitro con la soluci6n amortiguadora "A" (26), en 31.6 uM de heparina con: a) mercaptoetanol 10 mM, b) DDT (Ditiotreitol) 10 mM, c) GSSG (Glutati6n Oxidado) 10 mM, a 37°C por 10, 20, 30, 40, 60 y 90 minutos, despu6s de este tiempo de incubaci6n las células se fijaron con glutataldehído al 2.5% en paraformaldehído al 1% (50), y se tiñeron con eosina al 5% y azul de anilina al 5% (13), para observar el grado de descondensaci6n de los espermatozoides por lo menos en 20 campos por tubo en microscopía de contraste de fases.

MICROFOTOGRAFIA. Microfotografía en microscopio de contraste de fases, de espermatozoides humanos tratados con heparina y glutatión.

A. Núcleo de Espermatozoide Normal.

B. Núcleo de Espermatozoide Descondensado.



RESULTADOS.

Ninguno de los reactivos empleados ya sea solos o combinados, tales como: DTT, GSH, GSSG y 2- MERCAPTOETANOL a concentraciones de 10 mM, bajo condiciones experimentales, funcionaron como promotores de la descondensación nuclear en los espermatozoides humanos, aún en tiempos de incubación prolongados (24 hrs.), (tabla 1), o cuando fueron incubados por arriba de la temperatura corporal (37°C), sin embargo sólo cuando se empleó 153 mM de heparina, ésta fue capaz de inducir un pequeño incremento en la descondensación nuclear después de 6 hrs. (Microfotografía).

Por otro lado, la incubación de heparina 153 μ M con DTT-10 mM, GSH 10 mM ó Mercaptoetanol 10 mM indujeron un incremento mucho más rápido, en el número de núcleos descondensados; sin embargo, el Mercaptoetanol fue el más activo (Tabla 1).

La Fig. 2 indica que la presencia de 41.6 μ M de heparina con 5 mM de GSH fue capaz de inducir la descondensación de un 86% de los núcleos de espermatozoides después de 60 minutos de incubación y que aún a concentraciones tan bajas como 0.1 mM de GSH son capaces de inducir un incremento significativo en el número de núcleos descondensados (28% a 120 min.), la figura 2 muestra también que en tiempos cortos de incubación, los excesos de GSH (10 mM) inducen un efecto inhibitorio importante en la descondensación nuclear de los espermatozoides.

TABLA 1

EFFECTO DE ALGUNOS COMPUESTOS SULFHIDRILOS SOBRE LA DESCONDEN-
SACION DEL NUCLEO DEL ESPERMATOZOIDE.

Los siguientes datos muestran los porcentajes de descondensación de los núcleos de espermatozoides en la presencia de los compuestos sulfhidrilos - - (10 mM), solos o combinados e incubados 6 horas a 37°C. La heparina fue - usada a 153 uM.

| REACTIVOS | DTT | GSH | GSSG | 2-MERCAPTO- ETANOL | HEPARINA |
|------------|-----|-----|------|-----------------------|----------|
| DTT | 0* | 0 | 0 | 0 | 40 |
| GSH | 0 | 0* | 0 | 0 | 96 |
| GSSG | 0 | - | 0* | 0 | 0 |
| 2-MERCAPTO | 0 | 0 | 0 | 0* | 98 |
| HEPARINA | 40 | 96 | 0 | 98 | 10 |

* La incubación fue prolongada arriba de 24 horas.

Fig. 2 La descondensación del núcleo del espermatozoide humano dependiente del tiempo de incubación con: - - 41.6 uM de heparina en presencia de diferentes concentraciones de GSH: 0.1 mM □-□ ; 1 mM *-*; 5 mM Δ-Δ ; 10 mM o-o.

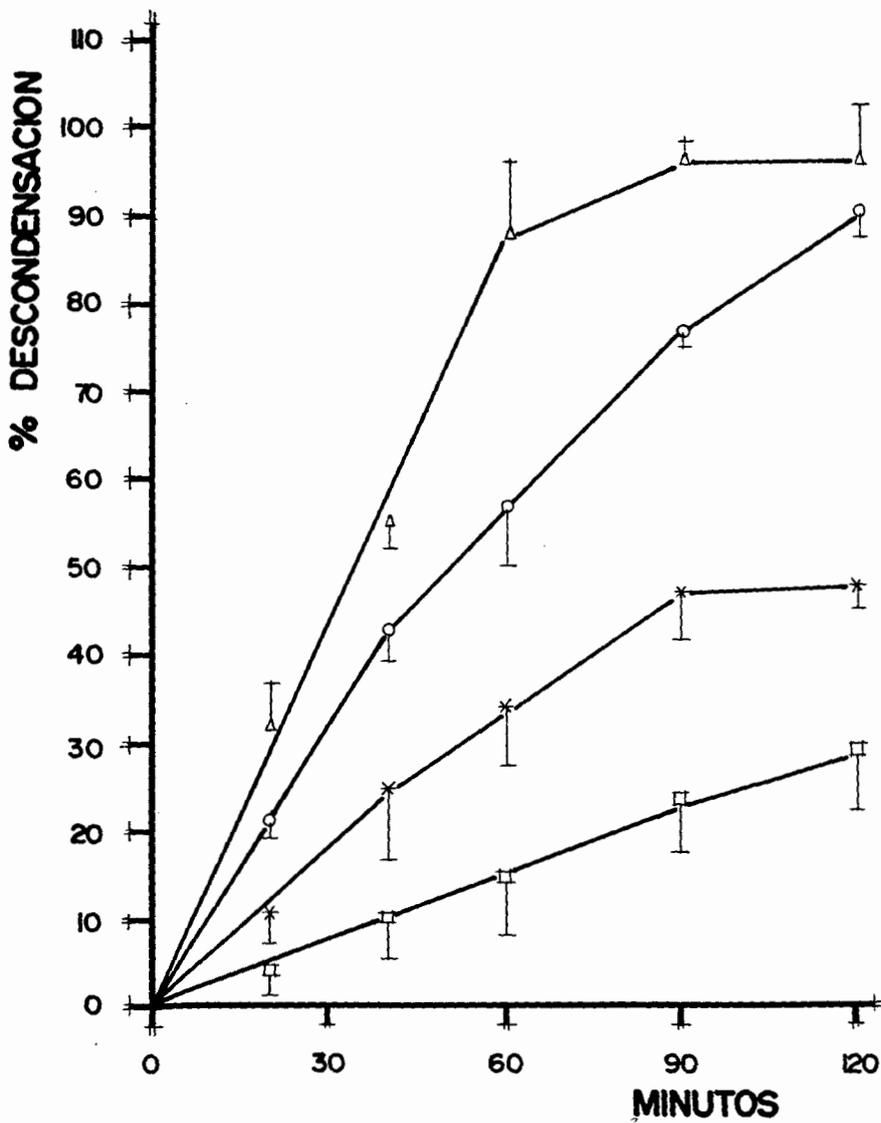


FIG. No. 2.

Sin embargo, cuando la concentración de GSH se mantuvo constante a 5 mM (Fig. 3), la descondensación nuclear fue inducida con concentraciones tan bajas como 1.6 μ M de heparina y una descondensación máxima con 31.6 μ M de heparina; ésto es, 5 veces menos que la concentración activa mínima de heparina, de cuando se usó sola y 70 veces menor que la concentración reportada que descondensa un 85% de espermatozoides humanos en 6 horas de incubación (15). También es posible observar que bajo condiciones constantes de GSH, la heparina alcanza una velocidad máxima de acción con (21.6 μ M); la cual no aumenta con el incremento de la concentración de glicosaminoglicanos. Como puede verse (Fig. 4), bajo condiciones óptimas, 5 mM de GSH y entre 1.6 a 31.6 μ M de heparina, los tiempos cortos de incubación fueron prácticamente inefectivos para inducir la descondensación. Sin embargo la descondensación máxima ocurrió rápidamente entre 20 y 60 minutos de incubación. Después de 60 min de incubación bajo estas condiciones, no se observó ningún incremento en el número de núcleos descondensados. Por otro lado, cabe hacer notar que con la adición de los iones Zn^{++} y Ca^{++} a concentraciones de 41.6 μ M en presencia de glutatión a 10 mM y heparina a 31.6 μ M, se logró un efecto inhibitorio en el que sólo se pudo observar de un 10 a 20% de espermatozoides descondensados después de 1 hora de incubación a 37°C. (Datos no presentados).

Fig. 3 La descondensación del núcleo del espermatozoide humano dependiente del tiempo de incubación con heparina en presencia de 5 mM de GSH: 20 min; Δ - Δ 40-min o-o 60 min; \square - \square 90 min; o-o 120 min. *-*

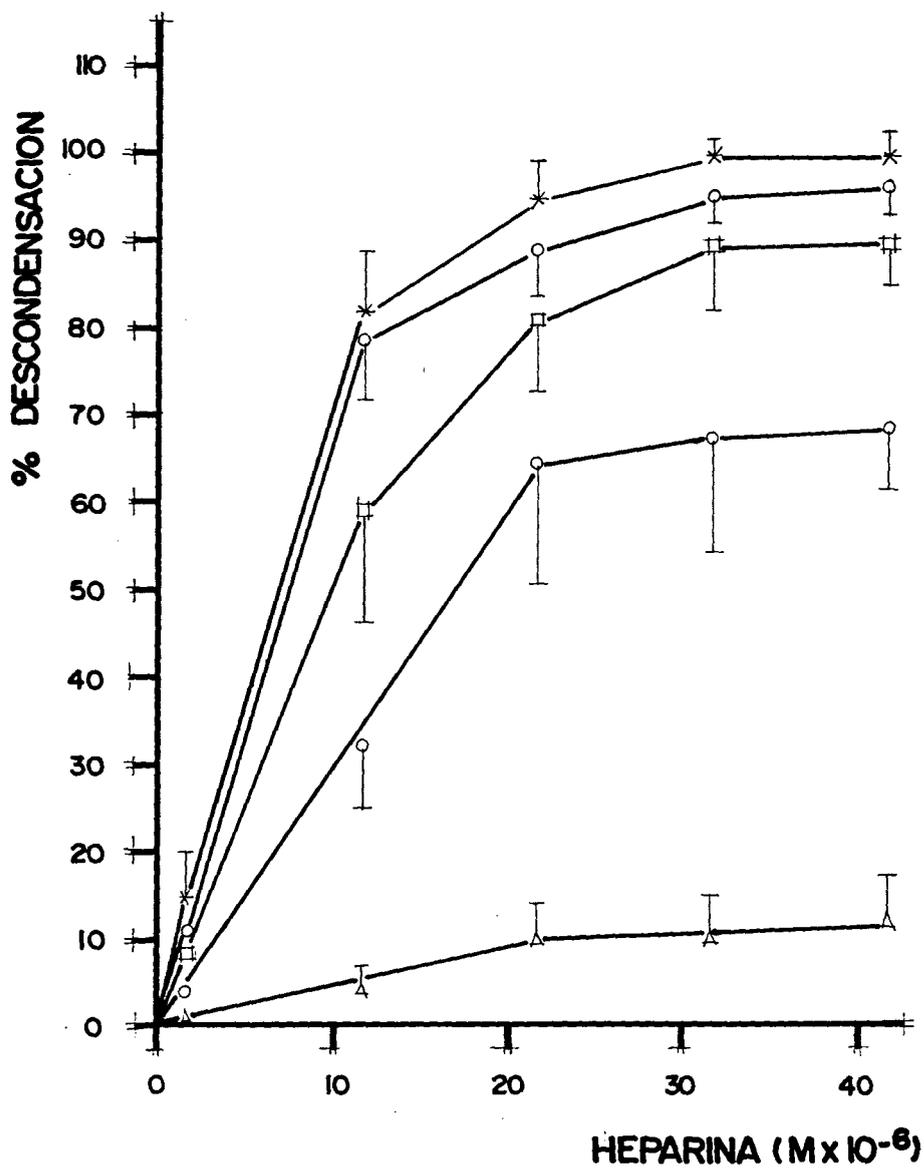


FIG. No. 3.

DISCUSION.

Se conoce poco acerca de los factores que involucran el óvulo en la reducción de los enlaces disulfuro (S-S) de las protaminas y la subsecuente dispersión de la cromatina del espermatozoide después de la fertilización. Varios reactivos - bajo diversas condiciones físico-químicas (33), han sido propuestos como compuestos efectivos en la descondensación del núcleo del espermatozoide como: los reactivos tiol (51), la liberación del Zn (15, 17), o sus fragmentos (17), algunas enzimas (38, 48), etc. Sin embargo, debido a las dificultades de eficiencia de estos compuestos en condiciones biológicas normales de pH y temperatura, el requerimiento de cofactores no fisiológicos como lo son los detergentes, las limitaciones de concentraciones activas de algunos de ellos dentro del óvulo, ninguno de estos agentes pueden ser postulados como participantes en el mecanismo fisiológico normal de la descondensación de la cromatina del espermatozoide.

Se ha postulado que el GSH podría jugar un papel clave en este proceso. Esto es apoyado por las observaciones *in vitro* de que la descondensación del núcleo del espermatozoide requiere la reducción de los enlaces disulfuro nucleares (revisado por Longo) (31), e indirectamente por la presencia de la Glutathión reductasa demostrada recientemente en los óvulos de ratón (47). Sin embargo los reactivos tiol parecen ser inactivos y requieren la presencia de otros reactivos que ge-

neralmente es un detergente como el dodecil sulfato de sodio (SDS) (10, 23, 24, 44).

La heparina y compuestos similares a ella están presentes en el fluido uterino y folicular (19), también como en la zona pelúcida, en el citoplasma del óvulo (16, 43) y que son sintetizadas por las células de la granulosa y la teca. Se ha demostrado que estos compuestos se unen específicamente a la membrana del espermatozoide humano de una manera más específica que a otro tipo de células (2) y que la heparina provoca la descondensación del núcleo del espermatozoide, sin embargo, las concentraciones necesarias para este último efecto, son de 5 a 30 mg/ml y éstas son concentraciones muy altas para tratar de explicar satisfactoriamente la descondensación de la cromatina en base a las propiedades de la heparina. Recientemente se ha determinado la concentración de los glycosaminoglicanos en el líquido folicular de bovino, e indican que aunque el dermatán puede alcanzar concentraciones de 1.0 - 2.0 mg/ml (5), el heparán sulfato sólo alcanza concentraciones de 0.24 a 0.36 mg/ml (5).

Los niveles de GSH en los óvulos de mamíferos han sido recientemente determinadas (12, 37). La concentración de GSH en muestras de óvulos superovulados varía de 1.58 a 1.92 pmol. por célula, con un promedio de 1.80 ± 0.13 pmol. Estos resultados indican que la concentración de GSH en estas células es cercano al límite superior del rango que se ha reportado para las células de mamíferos, que es de 0.5 a 10 mM -

(35). Sin embargo, nuestros resultados, como el resultado de otros investigadores (37, 38), indica que el GSH a estas concentraciones no induce la descondensación nuclear espermática in vitro aún cuando es combinado con algunos otros reactivos tiol (Tabla 1). Sin embargo los siguientes datos apoyan nuestra hipótesis de que el GSH podría ser una condición necesaria pero no suficiente para iniciar la descondensación de la cromatina del espermatozoide humano.

Los resultados presentados aquí, permiten vencer algunas dificultades presentadas para aceptar que el GSH o la heparina como participantes claves en el mecanismo fisiológico de la descondensación nuclear. En efecto, aunque ninguna de estas sustancias son activas cuando se encuentran solas, a las concentraciones encontradas en el medio ambiente en el que se lleva a cabo la descondensación nuclear, cuando son usadas juntas bajo condiciones completamente fisiológicas (21.6 μM de heparina y 5 mM de GSH), pH 7.4 y a una temperatura de 37°C, son capaces de provocar la descondensación nuclear de los espermatozoides humanos cerca de un 90% dentro de los primeros 60 minutos de incubación.

Los resultados de Perreault et. al., (39), han demostrado que la inyección de núcleos de espermatozoides en óvulos de hamster, los núcleos se observan sin modificación dentro del citoplasma del óvulo durante 20 min, después de este lapso de tiempo el núcleo se descondensa dentro de una hora después de su microinyección. Muchos de los núcleos de los es-

permatozoides inyectados desarrollaron un pronucleo morfológicamente normal después de incubaciones entre 2 y 6 horas (51). Nuestros resultados indican (figura 4) que la descondensación producida por el tratamiento combinado con 5 mM de GSH y heparina es precedido por una fase retardada de 20 min, similar a la observada por Perreault (39), y que la máxima descondensación se llevó a cabo también dentro de los próximos 60 minutos, resultados que podrían indicar que la acción combinada de GSH y heparina constituye el mecanismo fisiológico normal de la descondensación de la cromatina nuclear.

Fig. 4 Descondensación del núcleo del espermatozoide humano es dependiente del tiempo de incubación a diferentes concentraciones de heparina 1.6 uM o — o; 11.6 uM ● — ●; 21.6 uM □ — □ ; 31.6 uM △ — △ ; 41.6 uM * — *.

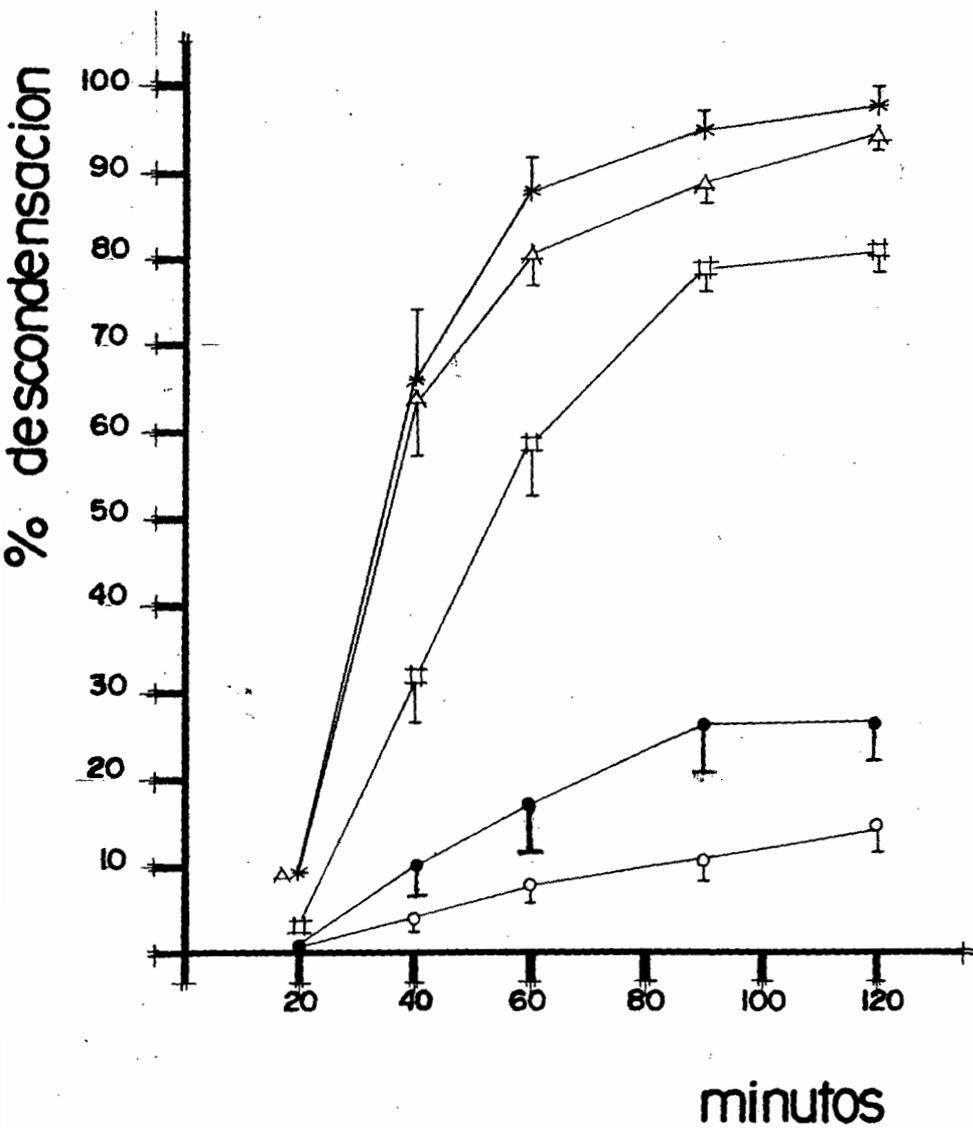


Fig. 4

RESUMEN.

Se ha propuesto que el glutathion reducido o cualquier otro reactivo tiol puede participar en el mecanismo por el cual se lleva a cabo la actividad descondensante. Sin embargo, in vitro estos reactivos son inactivos y requieren la presencia de otros reactivos, usualmente detergentes. La heparina se une específicamente a la membrana del espermatozoide de humano provocando su descondensación y la activación de la transcripción y síntesis del ADN, pero las concentraciones a la cual estos efectos ocurren parecen ser más altos que los esperados en condiciones biológicas. En el presente estudio los reactivos tiol a concentraciones 10 mM ya sea solos o combinados fueron completamente inefectivos para inducir una descondensación nuclear significativa aún bajo tiempos prolongados de incubación (24 hrs). 2mg/ml de heparina, fue solo capaz de inducir un pequeño incremento en la descondensación nuclear. Sin embargo tratamientos simultáneos con GSH y heparina induce la descondensación con concentraciones de GSH tan bajas como 0.1mM. Cuando la concentración de GSH fue mantenida a 5 mM constante, la descondensación fue inducida con concentraciones tan bajas como 1.6uM de heparina y una máxima descondensación (90%) fue obtenida con solo 21.6uM de heparina, que es más de 5 veces menor que la concentración mínima activa de heparina, cuando es usada sola.

CONCLUSIONES.

1. Los compuestos tiol no inducen descondensación alguna cuando son ensayados por sí solos.
2. El glutathion facilita la acción descondensante de la heparina.
3. La descondensación de los núcleos de espermatozoides humanos en presencia de Heparina - Glutathion, se puede realizar a concentraciones fisiológicas de ambos reactivos.
4. La concentración óptima para inducir el 90% de descondensación nuclear es de 5 mM de GSH, disminuyendo a concentraciones más altas.
5. La concentración de heparina utilizada bajo condiciones experimentales se redujo a 70 veces menos.
6. A tiempos cortos no se observó descondensación alguna requiriendo un tiempo inicial de retardo en estos procesos.

BIBLIOGRAFIA.

1. BALAKIER HG, and TARKOWSKI AK. (1980). The role of germinal vesicle karyoplasm in the development of male pronucleus in the mouse. *Exp. Cell. Res.* 128, 79-85.
2. BARROS C, and MUÑOZ G. (1973). Sperm-egg interaction in immature hamster oocytes. *J. Exp. Zool.* 186, 73-78.
3. BEBAUER H, LINDER HR, AMSTERDAN A. (1978). Synthesis of heparin - like glycosaminoglicans in rat ovarian slices. *Biol. Reprod.* 18, 350-358.
4. BELSEY MA, ELIASSON R, GALLEGOS AJ, MOGHISSI KS, PAULSE CA, PRASAD MRN. (1980). Laboratory manual for examination of human semen y semen servical mucus interaction. Press Concern Singapore. World Health Organization, Switzerland, pp. 11-12.
5. BELLINI ME, AX RL. (1984). Chondroitin sulfate: an indicator of atresia in bovine follicles. *Endocrinol.* 114, 428-434.
6. BELLVE AR, and O'BRIEN DA. (1983). The mammalian spermatozoon, structural and temporal assembly. "In mechanisms and control of animal fertilization", (J.F. Hartman ed.) pp. 56-137. Academic Press, New York.
7. BERRIOS M, and BEDFORD JM. (1979). Oocyte maturation: Aberrent post-fusion responses of the rabbit primary Oocytes to penetrating spermatozoa. *J. Cell. Sci.* 39, 1-12.

8. BORENFREUND E, FITT E, BENDICH A. (1961). Insolation and properties of deoxyribonucleic acid from mammalian sperm. *Nature*. 191, 1375-1377.
9. BUSHMEYER SM, BELLIN ME, AX RL. (1985). Specific binding of (³H) heparin to bovine granulosa cell membranes. *Mol. cell. Endocrinol.* 4, 135-144.
10. BUSTOS-OBREGON E, LEIVA S. (1983). Chromatin packing in normal and teratozoospermic human ejaculated spermatozoa. *Andrologia*. 15, 468-478.
11. CALVIN HI, and BEDFORD JM. (1979). Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 13, 665-675.
12. CALVIN HI, GROSSHANS K, AND BLAKE E. (1986). Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: Relevance of sperm nucleus transformations in the fertilized eggs. *Gamete. Res.* 14, 265-275.
13. CASARETT JM. (1953). A one-solution stain for spermatozoa. *Stain Technol.* 28, 125-296.
14. CHERRIE A, MAHI and YANAGIMACHI R. (1975). Induction of nuclear descondensation of mammalian spermatozoa in vitro. *J. Reprod. Fert.* 44, 293-296.
15. DELGADO NM, HUACUJA L, MERCHANT H. REYES R. and ROSADO A. (1980). Species specific decondensation of human spermatozoa nuclei by heparin. *Arch. Androl.* 4, 305-313.

16. DELGADO NM, REYES R, HUACUJA L, MERCHANT H, and ROSADO A. (1982). Heparin binding sites in the human spermatozoa membrane. Arch. Androl. 8, 89-95.
17. DELGADO NM, REYES R, MORA J. and ROSADO A. (1988). - - Size-Uniform heparin fragments as nuclear decondensation and acrosome reaction inducers in human spermatozoa. Life Sci. 42, 2177-2183.
18. EVENSON DP, WITKIN SS, DE HARVEN E, BENDICH A. (1978). Ultrastructure of partially decondensed human spermatozoa chromatin. J. Ultrastruct. Res. 63, 178-187.
19. FOLEY ME, GRIFFIN BD, ZUZEL M, APARICIO SR, BRADBURY K, BIRD CC, CLAYTON JK, McNICHOL GD, JENKINS DM, SCOTT JS, RAJAH SM. (1978). Heparin like activity in uterine fluid. Br. Med. J. 2, 322-324.
20. GALL WE, OHSUMI Y. (1976). Decondensation of sperm nuclei. in vitro. Exp. Cell. Res. 102, 349-358.
21. GEBAUER H, LINDER HR, AMSTERDAN A. (1978). Synthesis of heparin-like glycosaminoglycans in rat ovarian slices. Biol. Reprod. 18, 350-358.
22. GRIFFITH OW, and MEISTER A. (1970). Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine-sulfoxamine. J. Biol. Chem. 254, 7558-7560.
23. HERNANDEZ-MONTES H, IGLESIAS G, MUJICA A. (1973). Selective solubilization of mammalian spermatozoa structures. Exp. Cell. Res. 76, 437-440.
24. HURET JL. (1986). Nuclear chromatin descondensation of human sperm. A. Review. Arch. Androl. 16, 97-109.

25. INCHARIENSAKDI A, PANYIM S. (1981). In vitro decondensation of human sperm chromatin. *Andrology*. 13, 64-73.
26. KEYHANI E, and STOREY BT. (1975). Energy conservation capacity and morphological integrity of mitochondria in hypotonically treated rabbit epididymal spermatozoa. *Binch. Biophys. Acta*. 305, 557-569.
27. KVIST U. (1980). Rapid post-ejaculatory inhibitory effect of seminal plasma on sperm. Nuclear Chromatin decondensation ability in man. *Acta Phisiol. Scand*. 109, 62-72.
28. KVIST U. (1980c). Importance spermatozoal zinc as temporary inhibitor of sperm nuclear chromatin decondensation ability in man. *Acta Phisiol. Scand*. 109, 29-84.
29. KVIST U. (1980d). Sperm nuclear chromatin decondensation ability. An in vitro study on ejaculated human spermatozoa *Acta. Phisiol. Scand. Sppl*. 486, 1-24.
30. KVIST U, ELIASSON R. (1980). Influence of seminal plasma on the chromatin stability of ejaculated human spermatozoa. *Int. J. Androl*. 3, 130-142.
31. LONGO FL. (1981). Regulation of pronuclear development. In "Bio-Regulators of Reproduction" (G. Jagiell and H.J. Vogel, Eds.). Academic Press, New York. 529-557.
32. LUNG G. (1972). Ultrastructure and chromatin disaggregation of human sperm head with thioglycolate treatment. *J. Cell. Biol*. 52, 179-186.

33. MAHI CA, YANAGIMACHI R. (1975). Induction of nuclear decondensation of mammalian spermatozoa in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 44, 293-296.
34. MARUSHIGE Y, MARUCHIGE K. (1975). Enzymatic unpacking of bull sperm chromatin. *Biochem. Biophys. Acta.* 403, 180-191.
35. MEISTER A, and ANDERSON ME. (1983). Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711-760.
36. NIWA K, and CHANG MC. (1975). Fertilization of rat eggs in vitro at various times and after ovulation with special reference to fertilization of ovarian oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.* 43, 435-451.
37. PERREAULT SD, BARBEE RR, SLOTT UL. (1988). Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturin hamster oocytes. *Dev. Biol.* 125, 181-186.
38. PERREAULT SD, WOLFF RD, ZIRKIN BR. (1984). The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Dev. Biol.* 101, 160-167.
39. PERREAULT SD, and ZIRKIN BR. (1987). The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm disulfide bond content. *Biol. Reprod.* 36, 239-244.
40. REYES R, MAGDALENO VM, HERNANDEZ O, ROSADO A, DELGADO NM. (1983). Effect of zinc on decondensation of human spermatozoa nuclei by heparin. *Arch. Androl.* 10, 155-160.

41. RODMAN TC, PRUSLIN FH, ALLFREY VG. (1982). Mechanisms of displacement of sperm basic nuclear proteins in mammalian an in vitro stimulation of postfertilization results. *J. Cell. Biol.* 90, 351-361.
42. SOBHON P, THUNGKASEMUATHANA P, TANPHAICHITR N. (1981). Electron microscopic studies of rat sperm heads treated with urea, dithiothreitol, and microccal nuclease. *Anat. Rec.* 201, 226-235.
43. TADANO Y, and YAMADA K. (1978). The histochemistry of complex carbohydrates in the ovarian follicles of adult mice. *Histochemistry.* 57, 203-215.
44. TANPHAICHITR N, SOBHON P, TALUPPHET N, CHALEMISARACHAI P. (1978). Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp. Cell. Res.* 117, 347-356.
45. THADANI VI. (1979). Injection of sperm heads into immature rat oocytes. *J. Exp. Zool.* 212, 436-453.
46. USUI N, and YANAGIMACHI R. (1976). Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. *J. Ultrastr. Res.* 57, 276-288.
47. WIESEL S, SCHULTZ GA. (1981). Factors which may affect removal of protamine from sperm DNA during fertilization in the rabbit. *Gamete Res.* 4, 25-34.
48. WOLGEMUTH DJ. (1983). Synthetic activities of the mammalian early embryo. Molecular and genetic alterations following fertilization. In Hartmann, J. J., (Ed)

- "Mechanism and control of animal fertilization". New York, Academic Press. 415-452.
49. YANAGIMACHI R. (1981). Mechanisms of fertilization in mammalian. In Mastroianni, L. Jr. Biggers J.D. (Eds.) "Fertilization and embryologic development in vitro". New York. Plenum Press. 81-182.
50. ZETTERQVIST H. (1956). The ultrastructural organization of the mouse jejunum. Thesis. Karolinska Stockholm.
51. ZIRKIN BR, SOUCEK DA, CHANG TSK, and PERREAULT SD, (1985). In vitro and in vivo studies of mammalian sperm nuclear decondensation. Gamete Res. 11, 349-365.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente

Número 948/88

SR. SERGIO GONZALEZ VALENCIA
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -
aprobado el tema de Tesis "EFECTO FACILITADOR DEL GLUTATION
REDUCIDO EN LA DESCONDENSACION NUCLEAR INDUCIDA POR LA HEPA
RINA" para obtener la Licenciatura en Biología,

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido acep
tado como Director de dicha Tesis el M.V.Z. Gabriel Moreno-
Llãmas.



A T E N T A M E N T E
"AÑO ENRIQUE DIAZ DE LEON"
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Agosto 10 de 1988
El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

FACULTAD DE CIENCIAS

El Secretario

Ing. ~~Adolfo Espinoza de los Monteros Cárdenas,~~

c.c.p. El M.V.Z. Gabriel Moreno Llãmas, Director de Tesis, -Pte,
c.c.p. El expediente del alumno.

Imjssd

Guadalajara, Jal., Octubre 3 de 1988

DR. CARLOS ASTENGO OSUNA
Director de la Facultad de Ciencias
Universidad de Guadalajara.

Estimado Director y fino amigo:

Por este conducto le saludo y le informo a usted que la tesis EFECTO FACILITADOR DEL GLUTATION REDUCIDO EN LA DESCONDENSACION NUCLEAR INDUCIDA POR LA HEPARINA, que ha sido realizada por el alumno SERGIO GONZALEZ VA LENCIA, con Código 080136994 y bajo mi dirección, ha sido revisada y corregida en lo que he considerado per tinentente.

Informo a usted lo anterior considerando que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad a su digno cargo.

Sin otro particular por el momento, me despido de usted quedando su afectísimo amigo y seguro servidor.



M.V.Z. GABRIEL MORENO LLAMAS