

REVISIÓN BÁSICA

El núcleo espermático y el proceso de descondensación cromatínica.

Marina Romanato

Laboratorio de Proteoglicanos y Matriz Extracelular, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME - CONICET), E-mail: mromanato@dna.uba.ar.

La función de la gameta masculina en el proceso de fertilización no culmina con la penetración al ooplasma, sino que requiere además la fusión de su material genético con el material genético del oocito. Para lograrlo, el núcleo del espermatozoide, una vez ingresado al oocito, sufre una serie de cambios ultraestructurales que culminan con su transformación en el pronúcleo masculino. Estos cambios nucleares suelen dividirse en dos períodos: un primer período de descondensación cromatínica y un segundo período de formación del pronúcleo propiamente dicho (1). En el hombre, al igual que en otros mamíferos, la descondensación cromatínica en oocitos homólogos es precedida por la desintegración completa del envoltorio nuclear, y constituye el primer cambio visible en el espermatozoide una vez que ha penetrado en el oocito.

Con el objetivo de explicar las fallas de fertilización observadas en procedimientos de reproducción asistida, surgió en la última década, el interés por estudiar, más detalladamente, el núcleo del espermatozoide, el proceso de descondensación nuclear y los factores espermáticos y oocitarios involucrados en dicho proceso. Esto es particularmente cierto con el advenimiento del procedimiento de inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI), pues ya no interesa si el espermatozoide puede interactuar eficazmente con el cúmulus, la zona pelúcida o el oolema y cobran especial importancia todos los procesos que ocurren una vez que el espermatozoide se encuentra dentro del ooplasma.

Organización cromatínica del núcleo espermático

El núcleo del espermatozoide presenta una organización muy particular de la cromatina, diferente de la de las células somáticas (2,3). La cromatina espermática se encuentra altamente condensada, y el volumen nuclear es significativamente menor que el del núcleo de una célula somática (Figura 1) debido

a que durante la espermatogénesis testicular, la mayor parte de las histonas es reemplazada por proteínas transicionales y luego por las protaminas. Estas son proteínas más pequeñas (50-60 aminoácidos), más básicas que las histonas y con un alto contenido de residuos de cisteína y arginina que neutralizan muy eficazmente las cargas del ADN y permiten su mayor compactación. El complejo altamente condensado de protamina - ADN es estabilizado por uniones disulfuro intra e intermoleculares entre los residuos de cisteína de las protaminas, confiriendo al núcleo espermático de una extraordinaria estabilidad mecánica y química. Esta estabilidad se incrementa aún más por acción del zinc (de origen prostático) presente en el plasma seminal. El zinc se une a los grupos sulfhidrilo libres de las protaminas impidiendo que tenga lugar el intercambio entre estos residuos y los puentes disulfuro ya formados (4,5). De esta forma se impediría la descondensación prematura de la cromatina durante el tránsito del espermatozoide por el tracto genital masculino y el femenino, antes de incorporarse definitivamente al ooplasma, y además se protegería al ADN espermático de la acción de agentes mutagénicos.

Se han propuesto dos modelos generales que explican la asociación de las protaminas con el ADN (6), ambos basados en datos físicos y teniendo en cuenta la ausencia de nucleosomas en el núcleo del espermatozoide. El primero de ellos sugiere que las protaminas están presentes con una configuración extendida, se unen al surco mayor y menor de la hélice de ADN y logran el entrecruzamiento de la cromatina a través de la formación de puentes disulfuro con protaminas en hebras de ADN vecinas. El otro modelo propone que las protaminas se encuentran empaquetadas en cilindros alfa - hélice (7), que se alojan en el surco mayor y menor del ADN para facilitar luego una condensación ordenada del mismo. Subsecuentemente, los cilindros se entrecruzarían con cilindros vecinos a través de puentes disulfuro para efectivizar la estabilización. Ciertos estudios sugerirían que en los espermatozoides de algunos ma-

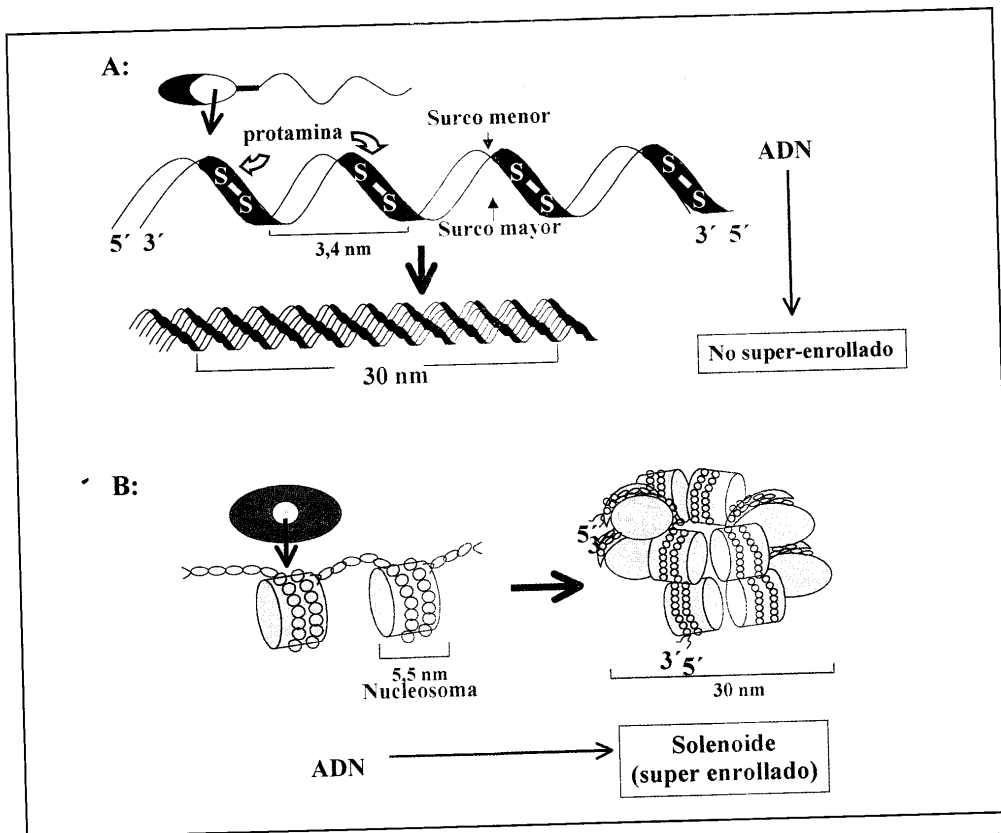


Figura 1: Esquema que compara la organización cromatínica del núcleo del espermatozoide humano (A) con la organización cromatínica del núcleo de una célula somática (B).

míferos, la cromatina forma una estructura de láminas apiladas (8); sin embargo, en el hombre, la organización sería de tipo fibrogranular dispuesta al azar (9).

Se han descrito dos grupos de protaminas, P1 y P2. Las P1 están presentes en los espermatozoides de todas las especies y tienen un alto contenido de cisteína y arginina, mientras que las P2 que están presentes en algunas especies (incluyendo el humano), contienen histidina además de cisteína y arginina y pueden unir Zn^{2+} . Si bien el contenido total de protaminas con respecto a la cantidad de ADN es constante para todas las especies, la relación P1/P2 es variable (10) y está aparentemente vinculada con el tiempo necesario para que pueda llevarse a cabo la descondensación nuclear. Aquellas especies que contienen P2 además de P1 parecerían descondensar el núcleo más rápido, sugiriendo que P1 y P2 di-

fieren en el grado de estabilidad que confieren a la cromatina (11).

La importancia de una adecuada interacción protamina /ADN espermático en el proceso de fertilización ha quedado confirmada por la observación que ratones knockout para P1 o P2 son infértiles (12). En el hombre, se ha documentado la presencia de una relación P1/P2 alterada o incluso la ausencia de P2 en individuos infértiles (13,14). Más aún, una publicación reciente (15) describe la presencia de un polimorfismo de nucleótido único en el gen de P1 en un pequeño grupo de pacientes infértiles. Por otra parte, el eyaculado comúnmente contiene cantidades variables de espermatozoides que no han reemplazado la mayoría de sus histonas o proteínas transicionales por protaminas (16-18). Estos núcleos que contienen cantidades anormales de histonas, se co-

nocen generalmente como núcleos inmaduros (19) y se ha observado que el eyaculado de hombres infértiles contiene una mayor proporción de los mismos que el de hombres fértiles (20,21).

La descondensación del núcleo espermático

El núcleo del espermatozoide, a pesar de su alta resistencia, se descondensa rápidamente luego de su penetración en el oocito (22). La reducción de los puentes disulfuro sería el primer paso de la descondensación del núcleo espermático en el oocito. Se ha demostrado en distintas especies que este fenómeno ocurre gracias a la acción del glutatión (GSH) presente en el ooplasma (23) y que constituiría el paso limitante en el proceso de descondensación nuclear (24). La reducción de los puentes disulfuro es necesaria pero no suficiente para que se produzca la descondensación nuclear. Se ha propuesto la participación de una macromolécula con fuerte carga negativa que pueda competir con el ADN por las protaminas, y actuar como aceptora de las mismas, posibilitando así el reemplazo de las protaminas espermáticas por histonas oocitarias (Figura 2).

Se ha demostrado, en algunos peces, en anfibios y en *Drosophila melanogaster*, que la nucleoplasmina, que es una chaperona molecular que inter-

viene en el ensamblaje de los nucleosomas a partir de ADN y de histonas y que está presente en gran cantidad en el oocito, es responsable de la descondensación cromatínica del espermatozoide (25,26,27). Sin embargo, este hallazgo no ha podido hacerse extensivo a los mamíferos, incluido el hombre, a pesar de que los espermatozoides humanos pueden descondensarse *in vitro* utilizando extractos de oocitos de anfibios (28). Aunque se ha encontrado nucleoplasmina en el oocito de ratón, la misma no sería necesaria para el proceso de descondensación espermática ya que los espermatozoides procedentes de ratones knockout se descondensan normalmente (29).

La descondensación de la cromatina del espermatozoide humano *in vitro* puede inducirse utilizando heparina y GSH (30,31). No existe duda de la participación del GSH como tioreductor en este proceso, pero el papel de la heparina es aún motivo de controversia. Algunos autores sostienen que la heparina se une a la membrana de los espermatozoides (32) a través de una interacción de tipo ligando receptor (32,33,34,35) que resultaría en la desestabilización de la membrana plasmática, y permitiría de esta manera la entrada de otros compuestos al espermatozoide (como por ejemplo el GSH) (32,36). Otros autores proponen, en cambio, un efecto directo de la heparina sobre la cromatina del espermatozoide, ya que se ha demostrado que la heparina posee una fuerte afinidad por las protaminas y es capaz de combinarse con éstas formando un complejo insoluble (37). Sin embargo, ninguna de las evidencias existentes es directa y contundente y poco se sabe en realidad del papel de la heparina en el proceso de descondensación nuclear. En los últimos años, Delgado y col. (38,39) han desarrollado un modelo para estudiar el mecanismo de la descondensación del núcleo espermático *in vitro* utilizando una estructura cromatínica altamente organizada, el nucleón, aislada a partir de espermatozoides de distintas especies. Utilizando nucleones de toro, estos autores, demostraron la importancia de la heparina en el proceso de descondensación nuclear (40), apoyando la hipótesis de una acción directa de la heparina sobre la cromatina.

Algunos autores han propuesto que, también *in vivo*, la heparina podría ser responsable de la descondensación cromatínica (34,41), pero esto parece poco probable ya que no se ha encontrado heparina en el complejo cumulus - oocito y que la única célula capaz de sintetizar heparina *in vivo* es el mastocito.

Por otra parte, existen en la literatura numerosas evidencias de la presencia de otros glicosami-

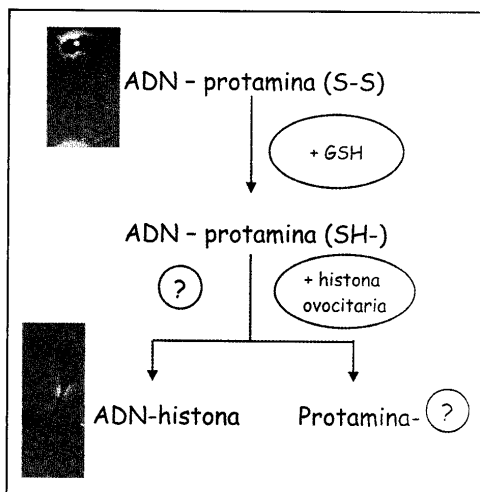


Figura 2: Esquema en el que se señalan las dos etapas del proceso de descondensación del espermatozoide humano *in vivo*. Los puentes disulfuro intra e intermoleculares son reducidos por acción del glutatión (GSH). El signo de interrogación representa a la molécula que actuaría como aceptor de protaminas. GSH= glutatión.

noglicanos (GAGs) en el complejo cumulus - oocito en distintas especies (42-45). Entre ellos, el heparánulfato (HS) es un análogo estructural de la heparina para el cual se ha descrito que posee en muchos sistemas biológicos acciones equivalentes a la misma (32,46-48). Las evidencias experimentales acumuladas en nuestro laboratorio en los últimos años, nos han llevado a plantear la hipótesis de que el HS efectivamente podría actuar como aceptor de protaminas durante la descondensación cromatínica del espermatozoide humano *in vivo* (31,49).

El heparánulfato como aceptor de protaminas

En nuestro laboratorio, estudiamos desde hace varios años, la descondensación nuclear del espermatozoide humano *in vitro*, con el fin de dilucidar el papel de la heparina en este proceso. Para ello, utilizamos muestras de semen de donantes normospermicos de acuerdo con los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (50). Mediante un ensayo de descondensación nuclear originariamente descrito por Reyes y col. (30) y luego modificado en nuestro laboratorio (31), se evaluó la capacidad descondensante de distintas heparinas y otros GAGs sobre espermatozoides humanos capacitados y sobre núcleos aislados a partir de dichos espermatozoides. El comportamiento de los núcleos aislados, situación que se asemeja más a lo que ocurre *in vivo* debido a que el núcleo se encuentra desnudo dentro del ooplasma antes de descondensarse, fue, en todos los casos, semejante al de los espermatozoides enteros.

Existen numerosas evidencias de que los cambios estructurales en la molécula de heparina inducen modificaciones de su actividad biológica (46, 51). Por lo tanto, se evaluó la actividad descondensante *in vitro*, de heparinas químicamente modificadas mediante desulfatación parcial: O-desulfatada (O-des), N-desulfatada (N-des), N-desulfatada N-acetilada (N-des N-ac) y O/N-desulfatada N-acetilada (O/N-des N-ac). La O- o N-desulfatación y N-acetilación alteran no sólo la carga neta de la unidad disacáridica sino también la localización de las cargas positivas y negativas en la misma.

La actividad descondensante de la heparina se vio fuertemente afectada por la sulfatación de la molécula (Figura 3a), y los resultados obtenidos sugirieron que se trata no sólo de un efecto de carga neta sino que también es importante la posición de las cargas en la molécula (31,49). Es probable que esto se deba a que la localización de las cargas en las unidades disacáridicas de la molécula determina

las interacciones electrostáticas entre los grupos cargados por lo que si éstas se modifican, se inducen cambios conformacionales en la molécula que podrán verse reflejados en su actividad biológica. Es de interés el hecho que N-des fue menos activa que O-des; este resultado está en desacuerdo con la idea general que la N-sulfatación es importante para la actividad biológica de la heparina (51,52).

Dado que se ha demostrado que la actividad biológica de los GAGs es influenciada por el tamaño de la molécula (53) posiblemente debido a que ciertos fragmentos específicos de ésta puedan ser incorporados en la célula y eventualmente alcanzar el núcleo, se evaluó en particular el efecto del tamaño de la molécula de heparina sobre su capacidad descondensante. Se encontró que la actividad descondensante de la heparina era independiente de su peso molecular, por lo menos dentro del rango de pesos moleculares ensayado (3000-18800 Da) (Figura 3b) (31,49).

Habiendo demostrado que la actividad descondensante de la heparina *in vitro* está relacionada con características estructurales de la molécula, evaluamos la actividad descondensante de otros GAGs presentes en el complejo cumulus-oocito con el fin de encontrar algún equivalente a la heparina *in vivo*. Recordemos que al no encontrarse en el complejo cumulus oocito, la heparina no puede ser el agente descondensante *in vivo*; en cambio, otros GAGs como el ácido hialurónico (AH), el condroitínulfato (CS), el heparánulfato, el dermatánulfato (DS) y el queratánulfato sí se han encontrado en el tracto genital femenino, particularmente en el fluido folicular, en varias especies (54) incluyendo la humana (55).

Entre los diferentes GAGs evaluados en este estudio (CS, DS, HS y AH), sólo el HS, análogo estructural de la heparina, mostró actividad descondensante *in vitro*, mientras que el ácido hialurónico, el condroitínulfato y el dermatánulfato fueron inactivos (31,49). Más aún, la actividad descondensante de la heparina y del heparánulfato fueron similares, a pesar del hecho que el heparánulfato se encuentra levemente menos sulfatado que la heparina, y posee menor carga negativa neta (Figura 3c).

Finalmente y con el propósito de confirmar que la heparina/HS son capaces de remover las protaminas de la cromatina del espermatozoide, se extrajeron proteínas básicas de núcleos espermáticos previamente incubados en presencia de los diferentes GAGs y se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida de las mismas (56) (Figura 4). Las bandas correspondientes a P₁ y P₂ (41) se detectaron en las calles que contenían proteínas extraídas de nú-

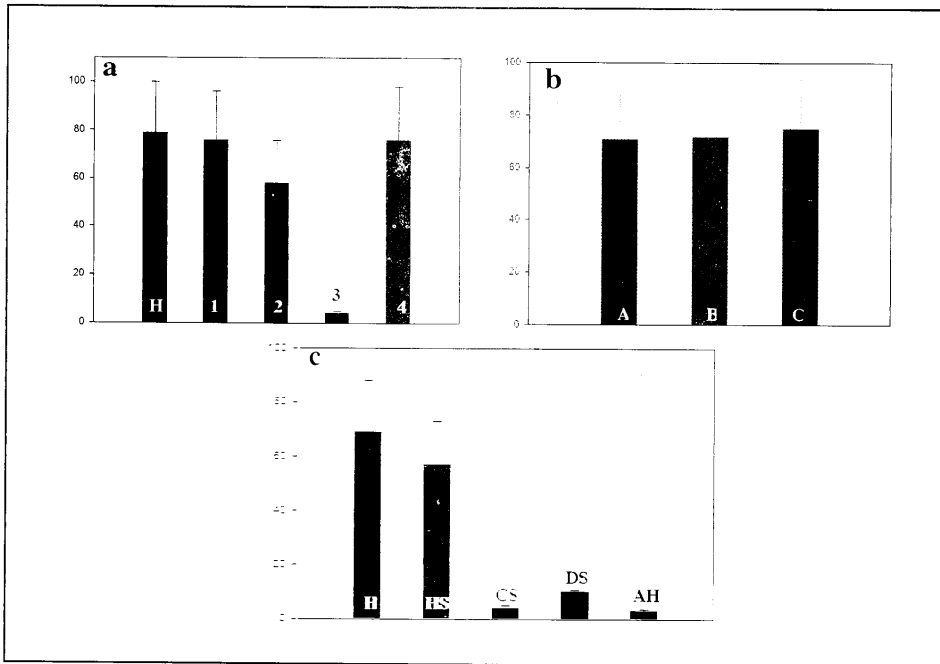


Figura 3: **a)** Descondensación de núcleos aislados de espermatozoides humanos en presencia de glutatión (GSH) y heparina (H) o H químicamente modificada. 1: O-des. 2: N-des. 3: O,N-des. 4: H-modificado. Los resultados se expresan como media \pm SEM. **b)** Descondensación de núcleos aislados de espermatozoides humanos en presencia de GSH y heparina de distinto peso molecular. A: PM 13500 Da, B: PM 18800 Da, C: PM 3000 Da. Los resultados se expresan como media \pm SEM. **c)** Descondensación de núcleos aislados de espermatozoides humanos en presencia de GSH y diferentes glicosaminoglicanos: H: heparina; HS: heparán sulfato; CS: condroitín sulfato; DS: dermatán sulfato; AH: ácido hialurónico. Los resultados se expresan como media \pm SEM.

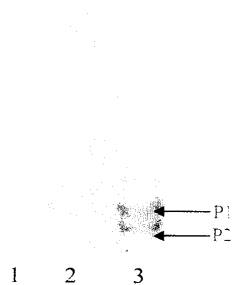


Figura 4: Electroforesis en geles de poliacrilamida de proteínas nucleares extraídas de núcleos de espermatozoides humanos previamente incubados en presencia de glutatión (GSH) y heparina (H) o heparán sulfato (HS). Calle 1: espermatozoides incubados con H; calle 2: espermatozoides incubados con HS; calle 3: espermatozoides incubados solo con GSH (control negativo). Las flechas señalan las bandas correspondientes a las protaminas P1 y P2.

de los previamente incubados con GSH sólo (calle 3-control), GSH+CS, GSH+DS o GSH+AH. Una leve reacción se detectó en la calle 2 sembrada con proteínas extraídas de núcleos previamente incubados con GSH+HS, no detectándose bandas en la calle 1 sembrada con extractos de proteínas obtenidos de núcleos previamente incubados con GSH+H (49).

El conjunto de estos resultados nos llevó a proponer que el HS, presente en el complejo cumulus-ocito y además análogo estructural de la heparina (46,55,57), podría estar funcionando como aceptor de protaminas en el proceso de descondensación del núcleo espermático humano *in vivo*. No hay evidencias, hasta ahora, que indiquen que los GAGs están presentes en el citoplasma del ovocito; este es un punto clave para nuestros estudios presentes y futuros. Mientras tanto, el papel del heparán sulfato en la descondensación nuclear *in vivo* es una hipótesis factible.

Bibliografía

1. **Tesarik, J. y Kopecny, V.** Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Res.* 1989; 24 (2): 135-149
2. **Balhorn, R.** A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell. Biol.* 1982; 93 (2): 298-305
3. **Ward, W.S y Coffey, D.** DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Bol. Reprod.* 1991; 44: 569-574
4. **Yanagimachi, R.** Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction 2nd Edn.* 1994: 189-317. Eds. E Knobil y JD Neill. Raven Press Ltd, New York.
5. **Kvist, U.** Importance of spermatozoal zinc as temporary inhibitor of sperm nuclear chromatin decondensation ability in man. *Acta Physiol Scand.* 1980; 109: 79-84
6. **Bellvé, A. R. y O'Brien, D. A.** Mechanisms of Mammalian Fertilization. (J. F. Hartman. ed.) 1983: pág. 55. Academic Press, New York.
7. **Warrant, R. W y Kim, S. H.** Alpha-Helix-double helix interaction shown in the structure of a protamine transfer RNA complex and a nucleoprotamine model. *Nature (Lond)* 1978; 271: 130-135
8. **Bendet, I. J. y Bearden, J. Jr.** Birefringence of spermatozoa. II. Form birefringence of bull sperm. *J. Cell. Biol.* 1972; 55 (2): 501-510
9. **Koehler, J. K.** Human sperm head ultrastructure: a freeze-etching study. *J. Ultrastruct. Res.* 1972; 39 (5): 520-539.
10. **Corzett, M.; Mazrimas, J. y Balhorn, R.** Protamine 1: Protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol. Reprod. Dev.* 2002; 61: 519-527
11. **Perreault, S. D.; Naish, S.J. y Zirkin, B.R.** The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content. *Biol. Reprod.* 1987; 36: 239-244
12. **Cho, C.; Willis, W.D.; Goulding, E.H. y col.** Haploinsufficiency of protamine 1 or 2 causes infertility in mice. *Nat. Genet.* 2001; 28 (1): 82-86
13. **Belokopytova, I.A.; Kostyleva, E.I.; Tomilin, A.N. y col.** Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin. *Mol. Reprod. Dev.* 1993; 34: 53-57
14. **Yebra, L.; Ballesta, J. L.; Vanrell, J. A. y col.** Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J. Biol. Chem.* 1993; 268 (14): 10553-10557
15. **Iguchi, N.; Yang, S.; Lamb, D.J. y col.** An SNP in protamine 1: a possible genetic cause of male infertility? *J. Med. Genet.* 2006; 46: 382-384
16. **Tanphaichitr, N.; Sobhon, P.; Taluppeth, N. y col.** Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp. Cell. Res.* 1978; 117 (2): 347-356.
17. **Chevallier, Ph.; Mauro, N.; Feneux, D. y col.** Anomalous protein complement of sperm nuclei in some infertile men. *The Lancet.* 1987. Octubre. 3.
18. **Gatewood, J. M.; Cook, G. R.; Balhorn, R. y col.** Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science.* 1987; 236 (4804): 962-964.
19. **Kramer, J. A. y Krawetz, S. A.** RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome. *Mol. Hum. Reprod.* 1997; 3 (6): 473-478.
20. **Foresta, C.; Zorzi, M.; Rossato, M. y Varotto, A.** Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int. J. Androl.* 1992; 15 (4): 330-337.
21. **Auger, J.; Schoevaert, D.; Negulesco, I. y Dadoune, J. P.** The nuclear status of human sperm cells by TEM image cytometry: nuclear shape and chromatin texture in semen samples from fertile and infertile men. *J. Androl.* 1993; 14 (6): 456-463.
22. **Jager, S.** Sperm nuclear stability and male infertility. *Arch. Androl.* 1990; 25 (3): 253-259
23. **Liu, D. Y. y Baker, H. W.** Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertil. Steril.* 1992; 58 (6): 1178-1184.
24. **Perreault, S. D.** Regulation of sperm nuclear reactivation during fertilization. En Bavister BD, Cumming SJ, Roldan ERS (eds). *Fertilization in Mammals.* Norwell: Sero Symposium. 1990: 285-296
25. **Ohsumi, K. y Katagiri, C.** Characterization of the ooplasmic factor inducing decondensation of and protamine removal from toad sperm nuclei: involvement of nucleoplamin. *Dev. Biol.* 1991; 148: 295-305.
26. **Philpott, A.; Leno, G. H. y Laskey, R. A.** Sperm decondensation in *Xenopus* egg cytoplasm is mediated by nucleoplamin. *Cell.* 1991; 65 (4): 569-578.
27. **Kawasaki, K.; Philpott, A.; Avillion, A. A. y col.** Chromatin decondensation in *Drosophila* embryo extracts. *J. Biol. Chem.* 1994; 269 (13): 10169-10176.
28. **Brown, D. B.; Hayes, E. J.; Uchida, T. y col.** Some cases of human male infertility are explained by abnormal in vitro human sperm activation. *Fertil. Steril.* 1995; 64: 612-622.
29. **Burns, K. H.; Viveiros, M. M.; Ren, Y. y col.** Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science.* 2003; 300: 633-636.
30. **Reyes, R.; Rosado, A.; Hernandez, O. y col.** Heparin and glutathione: physiological decondensing agents of human sperm nuclei. *Gamete Res.* 1989; 23 (1): 39-47.
31. **Romanato, M.; Cameo, M. S.; Bertolesi, G. y col.** Heparan sulphate: a putative decondensing agent for human spermatozoa in vivo. *Hum. Reprod.* 2003; 18 (9): 1868-1873.
32. **Delgado, N. M.; Reyes, R.; Huacuja, L. y col.** Heparin binding sites in the human spermatozoa membrane. *Arch. Androl.* 1982; 8 (2): 87-95.
33. **Handrow, R. R.; Boehm, S. K.; Lenz, R. W. y col.** Specific binding of the glycosaminoglycan 3H-heparin to bull, monkey, and rabbit spermatozoa in vitro. *J. Androl.* 1984; 5 (2): 51-63.
34. **Lalich, R. A.; Vedantham, S.; McCormick, N. y col.** Relationship between heparin binding characteristics and ability of human spermatozoa to penetrate hamster ova. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 86 (1): 297-302.

35. **Lassalle, B. y Testart, J.** Relationship between fertilizing ability of frozen human spermatozoa and capacity for heparin binding and nuclear decondensation. *J. Reprod. Fertil.* 1992; 95 (2): 313-324.
36. **Reyes, R.; Carranco, A.; Hernandez, O. y col.** Glycosaminoglycan sulfate as acrosomal reaction-inducing factor of follicular fluid. *Arch. Androl.* 1984; 12 (2-3): 203-209.
37. **Chargaff, E y Olson, K. B.** Studies on the chemistry of blood coagulation. VI. Studies on the action of heparin and other coagulants. The influence of protamine on the anticoagulant effect in vivo. *J. Biol. Chem.* 1938; 122: 153-167.
38. **Delgado, N. M.; Sanchez-Vazquez, M. L.; Reyes, R. y col.** A model for studying the mechanism of sperm nucleus swelling in vitro. *Arch. Androl.* 1999; 43 (1): 85-95.
39. **Reyes, R.; Flores-Alonso, J. C.; Rodriguez-Hernandez, H. M. y col.** Nucleons II: cryopreservation and metabolic activity. *Arch. Androl.* 2000; 47 (1): 23-29.
40. **Delgado, N. M.; Flores-Alonso, J. C.; Rodriguez-Hernandez, H. M. y col.** Heparin and chondroine II: correlation between decondensation of bull sperm cells and its nucleons. *Arch. Androl.* 2001; 47 (1): 47-58.
41. **Montag, M.; Tok, V.; Liow, S. L. y col.** In vitro decondensation of mammalian sperm and subsequent formation of pronuclei-like structures for micromanipulation. *Mol. Reprod. Dev.* 1992; 33(3): 338-340.
42. **Gebauer, H.; Lindner, H. R. y Amsterdam, A.** Synthesis of heparin-like glycosaminoglycans in rat ovarian slices. *Biol. Reprod.* 1978; 18 (3): 350-358.
43. **Salustri, A.; Yanagishita, M. y Hascall, V. C.** Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *J. Biol. Chem.* 1989; 264 (23): 13840-13847.
44. **Ball, G. D.; Bellin, M. E.; Ax, R. L. y col.** Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocyte complexes: morphology and chemistry. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1982; 28 (1): 113-122.
45. **Bellin, M. E. y Ax, R. L.** Chondroitin sulfate: an indicator of atresia in bovine follicles. *Endocrinology.* 1984; 114 (2): 428-434.
46. **Jackson, R. L.; Busch, S. J. y Cardin, A. D.** Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol. Rev.* 1991; 71 (2): 481-539.
47. **Rosemberg, R. D.; Shworak, N. W.; Liu, J. y col.** Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 2062-2070
48. **Yanagishita, M. y Hascall, V. C.** Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 1992; 267 (14): 9451-9454.
49. **Romanato, M.; Regueira, E.; Cameo, M. S. y col.** Further evidence on the role of heparan sulfate as protamine acceptor during the decondensation of human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 2005; 20 (10): 2784-2789.
50. OMS (1999). WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
51. **Bertolesi, G. E.; Farias, E. F.; Alonso, D. F. y col.** Insight into the profibrinolytic activity of heparin: effects on the activation of plasminogen mediated by urokinase. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 1997; 8 (7): 403-410.
52. **Lindahl, U. y Kjellen, L.** Heparin or heparan sulfate-what is the difference? *Thromb. Haemost.* 1991; 66 (1): 44-48.
53. **Fedarko, N. S. y Conrad, H. E.** A unique heparan sulfate in the nuclei of hepatocytes: structural changes with the growth state of the cells. *J. Cell. Biol.* 1986; 102 (2): 587-599.
54. **Yanagishita, M.; Rodbard, D. y Hascall, V. C.** Isolation and characterization of proteoglycans from porcine ovarian follicular fluid. *J. Biol. Chem.* 1979; 254(3): 911-920.
55. **Bellin, M. E.; Ax, R. L.; Laufer, N. y col.** Glycosaminoglycans in follicular fluid from women undergoing in vitro fertilization and their relationship to cumulus expansion, fertilization, and development. *Fertil. Steril.* 1986; 45 (2): 244-248.
56. **Panyim, S. y Chalkley, R.** High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Biochem. Biophys.* 1969; 130 (1): 337-346.
57. **Eriksen, G. V.; Malmstrom, A. y Ulbjerg, N.** Human follicular fluid proteoglycans in relation to in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 1997; 68 (5): 791-798.

