

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA

PARTICIPACION DE LOS GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS  
EN LA FERTILIZACION

T E S I S

Que para obtener el título de:  
Maestro en Ciencias presenta la  
Química Farmacobióloga  
Rosalina Ma. de Lourdes Reyes Luna.

MEXICO, D.F., 1982

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INTRODUCCION

Los espermatozoides, gametos masculinos son el estadio final de la espermatogénesis, proceso durante el cual las espermatogonias, pasando por diversos estadios de diferenciación reducen a la mitad su contenido genético transformándose de diploides ( $2n$ ) en haploides ( $n$ ), adquiriendo 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 nuclear característica del espermatozoide una condensación drástica de la estructura nuclear. Aunque se sabe poco de las fuerzas que intervienen en esta reestructuración, es sabido que las modificaciones que acompañan a la condensación del núcleo de

la espermátide, van aparejadas con modificaciones bioquímicas, que incluyen:

- 1o. Eliminación del ARN nuclear durante el principio del alargamiento del núcleo (25, 26).
- 2o. Sustitución de las histonas ricas en lisina características de las células somáticas por otro tipo de proteínas más básicas, ricas en arginina (1, 14, 24, 30).
- 3o. En los mamíferos eutéricos se ha descrito también la incorporación simultánea de cisteína (20) que finalmente llega a constituir el 13% de los residuos de aminoácidos de las proteínas básicas de la cromatina (5,8).

Es posible que la condensación de la cromatina proporcione una gran estabilidad al núcleo del espermatozoide y que esto a su vez pudiera constituir un mecanismo de protección contra la acción de mutágenos, a los cuales esta célula se halla expuesta durante el período que dura su maduración y transporte no sólo en el tracto genital masculino, sino después de la eyaculación en el tracto genital femenino (25).

Actualmente se conoce que el núcleo del espermatozoide de los mamíferos eutéricos presenta una estructura semejante a queratina y está determinada por la formación de enlaces disulfuro, propiciados por la alta concentración de cisteína de la proteína histónica misma (4, 15). Los enlaces disulfuro parecen estar distribuidos de manera homogénea dentro del material nuclear (6, 7, 22), formando una estructura rí

gida que ayuda a mantener al ADN altamente empaquetado. Esta perfecta estructuración del material nuclear se demuestra porque en ausencia de compuestos que rompan enlaces disulfuro, la forma del núcleo del espermatozoide se conserva intacta aún en ausencia de la membrana nuclear (28).

Otro factor que influye, además de la formación de enlaces disulfuro en la condensación y estructuración nuclear del espermatozoide se debe a que el grupo de proteínas nucleares ricas en aminoácidos básicos neutralizan y enmascaran los grupos fosfatos cargados del ADN (14). Esta neutralización traería como consecuencia la deshidratación del complejo y por lo tanto, la posibilidad de empaquetar la misma cantidad de material genético en un volumen menor y estructuralmente más adecuado a las necesidades del espermatozoide.

El curso de la condensación de la cromatina durante la espermiogénesis no se inicia simultáneamente en todo el carioplasma, sino que parece seguir una secuencia característica. Se inicia en el polo acrosomal, que después seguirá siendo la región más rígida y progresa hacia la región flagelar. También ocurre del centro a la periferia del núcleo (13, 18). Es importante señalar que este complicado proceso tiene que ser revertido cuando el espermatozoide ha penetrado al óvulo, iniciándose la dispersión del material nuclear en la región basal de la cabeza del espermatozoide y progresa hacia la región acrosomal, mientras que al mismo tiempo se lleva

a cabo de la periferia al centro (2). Podría suponerse que así como hay un patrón de cambios estructurales durante el proceso de condensación de la cromatina hubiera también un curso preprogramado para producir la descondensación adecuada del núcleo masculino después de la fertilización como un requisito para la transcripción de la información genética del espermatozoide (23).

Aunque la descondensación nuclear ha sido inducida in vitro por una gran variedad de tratamientos (3, 12, 16, 32) muy poco se conoce acerca de los mecanismos involucrados en el hinchamiento nuclear del espermatozoide y sobre la iniciación de la síntesis de ADN in vivo.

Los mucopolisacáridos ácidos semejantes a la heparina (9, 27) han sido involucrados recientemente en la transición del estado heterocromático de la cromatina nuclear al eucromático, aumentando así la accesibilidad del templado del ADN nuclear (17, 19).

Por otro lado, la adición de polímeros ácidos del tipo de la heparina o del ácido polixantílico a las cabezas de espermatozoides de conejo previamente expuestas a la acción de agentes reductores de enlaces disulfuro, liberan las restricciones del templado del ADN espermático (33).

Estos hallazgos, junto con el hecho bien conocido de que es tos compuestos semejantes a la heparina existen de forma na tural en los fluidos uterinos y foliculares en la zona pelú

cida del óvulo y en las secreciones de los gránulos corticales (27), nos ha llevado a sugerir que estos polianiones podrían servir in vivo como un mecanismo disparador para iniciar la descondensación de los núcleos de los espermatozoides humanos inmediatamente después de la fertilización.

Los estudios presentados a continuación fueron diseñados con esta hipótesis como base y comprenden:

- 1o. La demostración de que la heparina por sí sola es capaz de descondensar los núcleos de los espermatozoides humanos, sin que aparentemente intervenga una actividad proteolítica intrínseca.
- 2o. Se establece la fijación específica de la heparina a la membrana plasmática del espermatozoide humano como un requisito para su posible internalización, asegurando así la descondensación del núcleo del espermatozoide humano (11).

En apoyo a la hipótesis presentada en los trabajos anteriores, recientemente hemos logrado la descondensación de los núcleos del espermatozoide humano por la exposición de estas células a los glicosaminoglicanos sulfatados semejantes a la heparina, extraídos de óvulos del erizo de mar.

## DISCUSION

De todos los procesos que ocurren en la fertilización, el que nos interesa estudiar es el de la descondensación del núcleo del espermatozoide, en el cual se lleva a cabo la transformación del núcleo a pronúcleo masculino y comprende el rompimiento de la membrana nuclear del espermatozoide, rehidratación de la cromatina espermática altamente empaquetada y la síntesis de una nueva membrana pronuclear que envuelve la cromatina descondensada.

Los mecanismos que ocurren en la fertilización y principalmente en la descondensación sólo han podido ser conocidos por microscopía electrónica en oocitos fertilizados in vitro y en óvulos fertilizados que son recuperados en intervenciones quirúrgicas.

Se han realizado otros estudios utilizando varios métodos químicos para inducir la descondensación del núcleo de los espermatozoides; de todos los reactivos usados podemos encontrar reactivos que rompen enlaces disulfuro como el ditiotreitól y el mercaptoetanol empleados en combinación con dodecil sulfato de sodio; otro grupo es el de los sulfuros inorgánicos como el sulfuro de amonio y el sulfuro de potasio que pueden ser activos por la concentración del ion o por el pH alto de sus soluciones, también se ha encontrado que las bases, a concentraciones altas y pH superior-



res de 10.5, causan la hidrólisis de la proteína nuclear (21).

Por otro lado Gall y Ohsumi (12), además de ditiotreitól han empleado proteasas, particularmente la tripsina, para inducir la descondensación de los núcleos de los espermatozoides.

De todos los tratamientos empleados in vitro para causar la descondensación, ninguno es fisiológico.

Recientemente se ha demostrado que la heparina activa la DNA polimerasa (9), causa la descondensación de los núcleos de los espermatozoides humanos (10) y además, se ha encontrado fisiológicamente en varios tejidos y fluidos corporales. Esto nos hace pensar que el efecto de la heparina sobre los espermatozoides humanos pudiera ser el mecanismo fisiológico por el cual se lleva a cabo la descondensación y la formación del pronúcleo masculino después de la fertilización.

Para conocer el efecto de la heparina sobre los espermatozoides eyaculados de diferentes mamíferos, se realizó el siguiente experimento: se incubaron espermatozoides eyaculados de toro, conejo, carnero y humanos en presencia de 5000 USP de heparina a 37°C por 6 horas (Fig. 4, ref 10). De los resultados obtenidos podemos observar que la descondensación de los espermatozoides humanos puede ser inducida

por la exposición de estas células intactas a la heparina sin requerir algún otro tratamiento y aparentemente sin la participación de actividad proteolítica intrínseca, mientras que los espermatozoides de conejo, carnero y toro no son susceptibles a este tratamiento.

Observando que la heparina descondensa el núcleo de los espermatozoides humanos, nos interesó saber el mecanismo por el cual penetra al núcleo, para ésto, la primera barrera que tiene que sortear es la membrana plasmática de la célula. Por ello, lo primero que se estudió fue la posible fijación de la heparina a la membrana plasmática.

Se incubaron espermatozoides humanos en presencia de heparina tritiada a 37°C por diferentes tiempos (Fig. 1, ref. 11). De los resultados obtenidos podemos observar que la fijación de la heparina a los espermatozoides es dependiente del tiempo y lineal hasta los seis minutos, presentándose después una disminución en la velocidad de la fijación de la heparina a medida que se incrementa el tiempo, indicando con ello que la mayor parte de la heparina se fija en los primeros minutos de la incubación. Para confirmar esto, en algunos experimentos los espermatozoides fueron incubados en presencia de 5000 USP de heparina durante lapsos de tiempo muy cortos y después lavados por una, dos y tres ocasiones por medio de centrifugación y resuspensión en el medio sin heparina; la incubación fue continuada hasta alcan

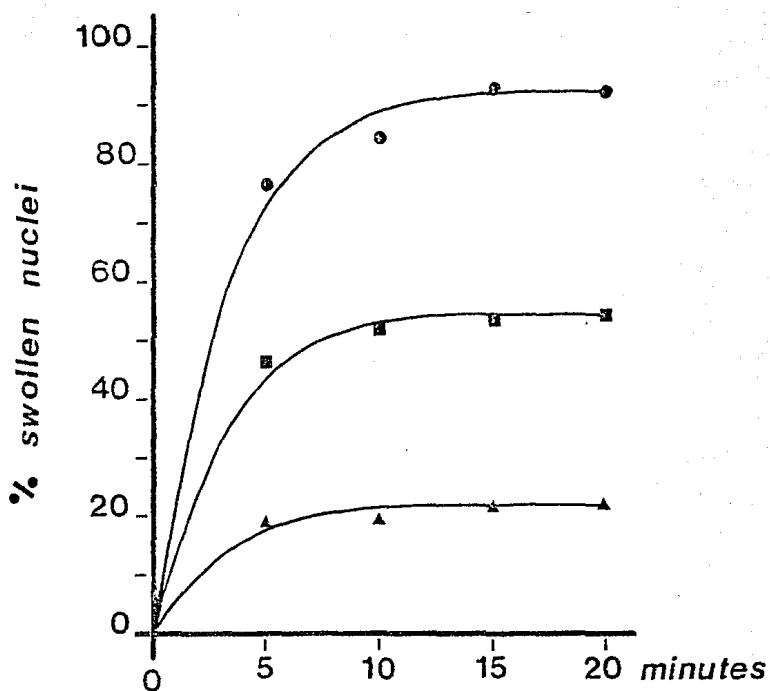


FIGURA I. Inducción de la descondensación del espermatozoide humano incubado en presencia de 5000 USP de Heparina durante lapsos breves de tiempo. ●—● un lavado; ■—■ dos lavados; ▲—▲ tres lavados.

zar el tiempo pre-establecido de 6 horas (Fig. I). Los resultados nos indican que la heparina que se fija en los primeros minutos de la incubación, no se desprende aún después de varios lavados, ejerciendo así su efecto descondensante.

La fijación de heparina a los espermatozoides humanos se realizó a diferentes temperaturas (Fig. II), para lo cual se incubaron los espermatozoides con heparina tritlada por 15 minutos a 4, 20, 37, 50 y 65°C. Con los resultados obtenidos se demostró que a medida que se incrementa la temperatura se incrementa la fijación de la heparina. Una de las causas de este comportamiento podría ser la siguiente: al aumentar la temperatura se induce además de la fijación, la penetración de la heparina al núcleo del espermatozoide aumentando así su incorporación a la célula, hecho que se pudo comprobar al realizar paralelamente un experimento de descondensación en donde se observó que a medida que se incrementa la temperatura de incubación, la descondensación se efectúa en períodos más cortos de tiempo. Otra explicación al efecto de la temperatura puede ser el hecho de que la heparina libere la fosfolipasa  $A_1$  de la membrana plasmática, lo que ha sido demostrado por Waite y Sisson (31) en células de hígado de rata, quienes además sugieren que la fijación de la heparina a la membrana podría ser el sitio de unión de la fosfolipasa  $A_1$ . Esta enzima, que es termo-

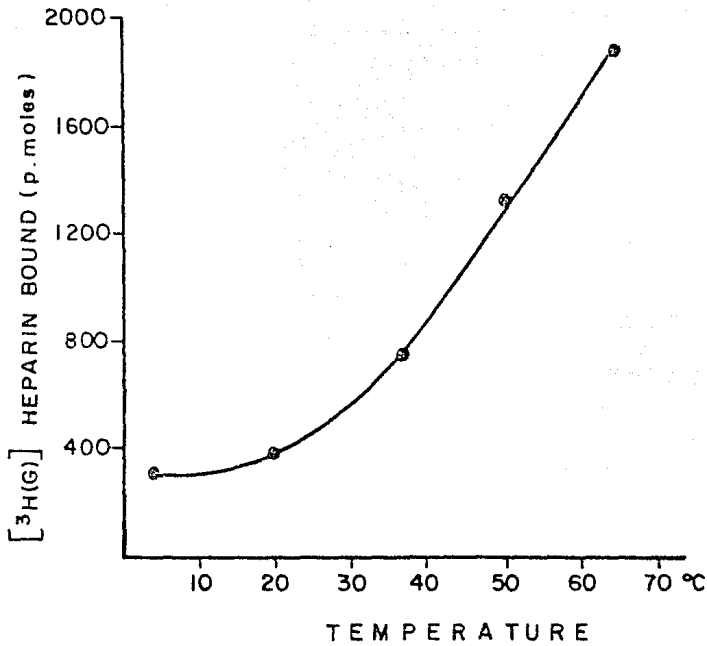


FIGURA II. Efecto de la temperatura en la fijación de Heparina ( $\text{H}^3$ ) a la membrana plasmática del espermatozoide humano.

estable, una vez liberada actuaría sobre los fosfolípidos de la membrana facilitando así la entrada de la heparina al núcleo del espermatozoide.

El análisis de los datos obtenidos por medio del Scatchard Plot de la interacción de la heparina tritiada con los espermatozoides humanos a 37°C en función de la concentración creciente de la heparina adicionada (Fig. 2, ref. 11), fue estudiada realizando una cinética de saturación en donde se obtuvo  $9.5 \times 10^6$  sitios de fijación por espermatozoide, una KD de  $3.6 \times 10^{-6}M$  indicando con este valor que la interacción heparina-célula es específica y también se observó una sola pendiente en la gráfica indicando con ello la existencia de un solo tipo de receptor en la membrana plasmática del espermatozoide.

El estudio del efecto del pH sobre la fijación de la heparina se llevó a cabo incubando espermatozoides humanos con heparina tritiada a 37°C por 15 minutos con amortiguadores de diferente pH (5-10) (Fig. 3, ref. 11). En las gráficas podemos observar que las curvas obtenidas de la fijación de la heparina a la célula con los amortiguadores a los diferentes pH siguieron el mismo comportamiento y que la fijación de la heparina a la célula fue mayor en medios altamente protonados (pH ácido). Como se sabe, la heparina es un heteropolisacárido formado por unidades repetitivas de ácido glucurónico, glucosamina N-sulfato y ácido idurónico

unidas por enlaces glicosídicos. Los grupos sulfato, carboxilo y amino son las fuentes potenciales de grupos ionizados, el número de grupos disociados está dado por el pH del medio; así, a pH ácido los grupos básicos de la heparina se asocian con protones para crear sitios con carga positiva y a pH básico los grupos ácidos se disocian para crear sitios con carga negativa. Se puede pensar que el posible efecto causado por el diferente pH de las soluciones puede ser debido al cambio de ionización de los grupos en la heparina y también al cambio de ionización en la célula de los grupos involucrados en la fijación de la heparina.

El efecto de la fuerza iónica sobre la fijación de la heparina fue estudiada incubando espermatozoides en presencia de heparina tritiada a 37°C por 15 minutos, utilizando varias soluciones con diferentes fuerzas iónicas (Fig. 4, ref. 11).

En el caso de las cadenas de la heparina las cargas negativas la hacen totalmente hidrofílica, los grupos aniónicos se encuentran a intervalos frecuentes a lo largo de la cadena, existiendo una repulsión entre las partes de la cadena. Las repulsiones a lo largo de la cadena la forzan en una solución diluída a estar completamente extendida. En soluciones concentradas las cadenas de heparina presentan enrollamientos. La presencia de grupos aniónicos a lo largo del polielectrolito le proporcionan una capa de carga

negativa de mayor o menor densidad a lo largo de varios puntos en la cadena, más que cargas individuales en cada punto. Algunos iones inorgánicos son atrapados en la atmósfera del polielectrolito, éstos constituyen los coiones que pueden ser sulfatos, fosfatos, cloruros, etc.

Relacionando los resultados obtenidos de fuerza iónica con las propiedades de los electrolitos podemos señalar que como una consecuencia de la concentración de las cargas eléctricas a lo largo de la cadena de heparina, hay una fuerte interacción eléctrica entre las cargas y los iones del medio ambiente.

En las gráficas obtenidas observamos que el punto máximo de fijación de la heparina a la membrana plasmática para el cloruro de zinc fue obtenido a 0.3 de fuerza iónica, para el cloruro de calcio fue de 0.5 de fuerza iónica y para el cloruro de sodio fue de 0.5 también. De estos datos podemos suponer que de alguna manera interviene, además de la fuerza iónica, la electronegatividad de los iones empleados, observando que existe una relación inversa de electronegatividad contra concentración; así, el  $Zn^{++}$ , que es el más electronegativo (1.66), cuando se empleó como electrolito se observó que el máximo de fijación se presentó cuando tenía una concentración de 0.1 M, siendo ésta la más baja en comparación con los otros electrolitos empleados. En el caso del  $Na^+$ , que es el ion menos electronegativo



(1.06), en el punto máximo de fijación presentó la concentración más alta (0.5 M). Por otro lado, se ha demostrado que las sales neutras tienen efectos pronunciados en la solubilidad de las proteínas globulares. En el caso de la heparina podemos pensar que a bajas concentraciones de sales se incrementa su solubilidad, y a medida que la fuerza iónica aumenta, la solubilidad de la heparina empieza a disminuir y a una fuerza iónica suficientemente alta, la heparina puede ser completamente precipitada de la solución. Esto último se pudo observar en el caso del cloruro de zinc, ya que a medida que se incrementaba la fuerza iónica se precipitaba la heparina, debido a que las sales neutras pueden remover el agua de hidratación de las moléculas de heparina reduciendo así la solubilidad de la misma.

Para estudiar la especificidad de la fijación de la heparina a la membrana plasmática se realizaron incubaciones a 37°C por 15 minutos en presencia de glicosaminoglicanos semejantes a la heparina como son el condroitin sulfato A, condroitin sulfato B, condroitin sulfato C, ácido hialurónico y dextrán sulfato (tabla 1). Aún cuando se usaron concentraciones veinte veces más altas que la heparina, ninguno de los compuestos probados fueron capaces de interferir con la fijación de la heparina a la célula. Sin embargo, el dextrán sulfato fue el único agente competitivo al sitio de fijación de la heparina, inhibiendo un 73% a concentra-

TABLE 1

BINDING OF  $^3\text{H}$  (G) HEPARIN SODIUM SALT TO INTACT HUMAN  
SPERMATOZOA UNDER SEVERAL EXPERIMENTAL CONDITIONS

SYSTEM	ADDITIONS	$10^{-6}\text{M}$	N	$(^3\text{H (G)})$ HEPARIN BOUND (p-moles/ $5 \times 10^7$ cells)
WHOLE SPERMATOZOA PLUS HEPARIN	NONE		5 5	745 $\pm$ 112
	CHONDROITIN (MIXTURE)	41.6 832	5 5	721 $\pm$ 62 819 $\pm$ 93
	CHONDROITIN (A)	41.6 832	5 5	713 $\pm$ 72 810 $\pm$ 47
	CHONDROITIN (B)	41.6 832	5 5	719 $\pm$ 80 708 $\pm$ 92
	CHONDROITIN (C)	41.6 832	5 5	741 $\pm$ 101 823 $\pm$ 89
	HYALURONIC ACID	0.7	5	830 $\pm$ 115
	DEXTRAN SULPHATE	41.6 124.8	5 5	201 $\pm$ 28* 68 $\pm$ 11*

\* Unpaired "t" test indicates a significant difference ( $p < 0.0001$ ) when compared with the control.

ciones equimoleculares y un 91% a una concentración tres veces mayor que la heparina. Al mismo tiempo se incubaron espermatozoides humanos por seis horas a 37°C con todos los compuestos antes mencionados y además de éstos con N-acetil glucosamina, ácido glucurónico y sulfato de sodio para observar si alguno de estos compuestos inducía la descondensación de los núcleos de los espermatozoides. El único compuesto de todos los probados que presentó la actividad descondensante fue el dextrán sulfato.

La heparina contiene dos grupos sulfato por residuo glicosídico. El dextrán sulfato, que compitió por el sitio de fijación de la heparina y además presentó actividad descondensante, contiene tres grupos sulfato por residuo glicosídico, mientras que el condroitin sulfato A, condroitin sulfato B y el condroitin sulfato C, que no inhibieron la fijación de la heparina, contienen un solo grupo sulfato por residuo. Al parecer, la habilidad descondensante de los glicosaminoglicanos está relacionada con el grado en que se encuentran sulfatadas sus moléculas, haciendo notar que, de los dos compuestos que descondensan el núcleo del espermatozoide, solo la heparina es de naturaleza fisiológica.

Para observar si la heparina se encontraba unida a la membrana plasmática se realizó una autorradiografía de las membranas aisladas de espermatozoides previamente tratados con heparina; para ello, se incubaron espermatozoides hu-

manos con heparina tritiada por 15 minutos a 37°C, después se les realizó un tratamiento hipotónico por una hora empleando un amortiguador de fosfatos 10 mM. Las membranas aisladas se lavaron hasta no encontrar radioactividad en el sobrenadante y después se procedió a realizar la autorradiografía. En ésta pudimos observar la presencia de altas concentraciones de heparina radioactiva en las membranas aún después de haber sido lavadas varias veces (Fig. 6, ref. 11).

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede demostrar que la heparina se fija a la superficie de la célula espermática presentando una cinética de saturación y siendo dependiente de tiempo y temperatura. El efecto del pH y fuerza iónica en la fijación indican que de alguna manera intervienen interacciones iónicas en el proceso. De los glicosaminoglicanos empleados para descondensar y competir por el sitio de fijación de la heparina, solo el dextrán sulfato fue el único que inhibió la fijación y presentó actividad descondensante, indicando con ello que por un lado el grado de sulfatación de la molécula y la naturaleza de la cadena glicosídica, son muy importantes en la estructura de la molécula para que se lleve a cabo la fijación de la heparina.

Podemos interpretar los datos encontrados de las siguientes maneras: la fijación del polisacárido a la membrana

de la célula espermática puede ser un prerequisite para su penetración, de modo que la fijación de la heparina a la membrana y la descondensación nuclear pueden ser procesos concertados y dependientes uno del otro. En estos procesos la heparina se puede fijar primero ejerciendo un efecto destabilizante sobre la membrana plasmática y después, cuando su penetración ha sido asegurada por el desarreglo de la membrana plasmática, ejerce su acción sobre el núcleo. Las observaciones microscópicas de la Fig. 5 b, (ref. 11) apoyan esta interpretación, ya que demuestran que solamente aquellos espermatozoides cuyos núcleos muestran descondensación son los que fijan heparina en su superficie.

Toda esta serie de procesos en el espermatozoide humano que aquí se han estudiado podrían ayudar a entender parte de los eventos moleculares que participan en las modificaciones de la membrana plasmática que se llevan a cabo durante el proceso de capacitación.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Alfert M (1956): Chemical differentiation of nuclear proteins during spermatogenesis in the salmon. *J Biophys Biochem Cytol* 2: 109-114.
2. Bedford JM (1972): An electron microscopic study of sperm penetration into the rabbit egg after natural mating. *Am J Anat* 133: 213-354..

3. Bedford JM, Calvin HI (1974): The occurrence and possible functional significance of -S-S- cross links in sperm heads with particular reference to eutherian mammals. *J Exp Zool* 188: 137-156.
4. Brill-Petersen E, Westenbrinik HGK (1963): A structural basic protein as a counterpart of deoxyribonucleic acid in mammalian spermatozoa. *Biochem Biophys Acta* 76: 152-154.
5. Calvin HI (1975): Keratinoid proteins in the heads and tails of mammalian spermatozoa. In the *Biology of the male gamete*, Duckett JG, Racey PA (eds) New York, Academic Press, pp 257-273.
6. Calvin HI, Bedford JM (1971): Formation of disulfide bond in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 13: 65-75.
7. Calvin HI, Bedford JM (1974): Stimulation of actinomycin D-binding to eutherian sperm chromatin by reduction of disulphide bonds. *J Reprod Fertil* 36: 225-229.
8. Coelingh JP, Rozijn TH, Monfoort CH (1969): Isolation and partial characterization of a basic protein from bovine sperm heads. *Biochim Biophys Acta* 188: 353-356.
9. Cook RT, Aikawa M (1973): The effects of heparin on endogenous DNA polymerase activity of rat liver nuclei and chromatin fractions. *Exp Cell Res* 78: 257-270.
10. Delgado HM, Huacuja L, Merchant H, Reyes R, Rosado A (1980): Species specific decondensation of human spermatozoa nuclei by heparin. *Arch Androl* 4: 305-313.
11. Delgado HM, Reyes R, Huacuja L, Merchant H and Rosado A (1982): Heparin binding Sites in the Human Spermatozoa. *Arch Androl* 8: 87-95.
12. Gall WE, Ohsumi Y (1976): Decondensation of sperm nuclei in vitro. *Exp. Cell Res* 102: 349-358.
13. Gledhill BL (1970): Nucleic acids of the testis. In the testis, Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL (Eds). New York: Academic Press, Vol II, pp 307-362.

14. Gledhill BL, Gledhill MP, Rigler R Jr, Ringertz NR (1966): Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull. *Exptl Cell Res* 41: 652-665.
15. Hendricks DM, Mayer DT (1965): Isolation and characterization of a basic Keratin-like protein from mammalian spermatozoa. *Exptl Cell Res* 40: 402-412.
16. Hernández-Montes H, Iglesias G, Mujica A (1973): Selective solubilization of mammalian spermatozoa structures. *Exptl Cell Res* 76: 437-440.
17. Heston WDW, Zirkin BR, Coffey DS (1975): Release of chromatin template restriction in rabbit spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 64: 162-168.
18. Kaye JS, McMaster-Key R (1966): The fine structure and chemical composition of nuclei during spermiogenesis in the house cricket. *J Cell Biol* 31: 159-179.
19. Kinoshita S (1976): Properties of sea urchin chromatin as revealed by means of thermal denaturation. *Exp Cell Res* 102: 153-161.
20. Loir M (1970): Modification du contenu en arginine et en cystine des nucleoprotamines des spermatides allongees du Belier (*ovis aries*). *Hebd Séanc Acad Sci Paris* 271: 1634-1637.
21. Mahi Ch A, Yanagimachi R (1975): Induction of nuclear decondensation of mammalian spermatozoa in vitro. *J Reprod Fert* 44: 292-296.
22. Marushige Y, Marushige K (1974): Properties of chromatin isolated from bull spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 340: 498-508.
23. Marushige Y, Marushige K (1975): Enzymatic unpacking of bull sperm chromatin. *Biochim Biophys Acta* 403: 180-191.
24. Monesi V (1965): Synthetic activities during spermiogenesis in the mouse. RNA and protein. *Exptl Cell Res* 39: 197-224.
25. Monesi V (1971): Chromosome activities during meiosis and spermiogenesis. *J Reprod Fertil Suppl* 13: 1-14.

26. Moore GPM (1971): DNA- dependent RNA synthesis in fixed cells during spermatogenesis in mouse. *Exptl Cell Res* 68: 462-465.
27. Saiga H, Kinoshita S (1976): Changes of chromatin structure induced by acid mucopolysaccharides. *Exp Cell Res* 102: 143-152.
28. Sosa A, Calzada L, Rosado A (1974): Capacidad metabólica de núcleos aislados de espermatozoides humanos. *Gaceta Med Mex* 108: 385-391.
29. Tadano Y, Yamada K (1978): The histochemistry of complex carbohydrates in the ovarian follicles of adult mice. *Histochem* 57: 203-215.
30. Vaughn J (1966): The relationship of the sphere chromatophile to the fate of displaced histones following histone transition in rat spermatogenesis. *J Cell Biol* 31: 257-278.
31. Waite M, Sisson P (1973): Solubilization by heparin of the phospholipase A, from the plasma membranes of rat liver. *J Biol Chem* 248: 7201-7206.
32. Witkin SS, Korngold GC, Bendich A (1975): Ribonuclease sensitive DNA-synthesizing complex in human sperm heads and seminal fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3295-3299.
33. Zirkin BR, Boison A, Heston WDW, Coffey DS (1976): Release of DNA template restrictions in rabbit spermatozoa and rat liver nuclei. *J Exp Zool* 197: 283-288.



# Species Specific Decondensation of Human Spermatozoa Nuclei by Heparin

N. M. DELGADO, L. HUACUJA, H. MERCHANT,\* R. REYES, and A. ROSADO

Decondensation of human spermatozoa nuclei has been induced by exposure of intact spermatozoa to heparin, while the spermatozoa of rabbit, ram, and bull remained highly condensed under similar experimental conditions. This process occurred in the complete absence of any disulfide bond cleaving reactant. Swelling of human spermatozoa nuclei commenced about 30 min after the addition of heparin and depended on heparin concentration reaching 83% of swelled nuclei after 6 hr. of incubation with 5000 USP of heparin per ml. Addition of 10 mg/ml of trypsin soybean inhibitor did not interfere with the swelling action of heparin. Electron microscope observations of human spermatozoa nuclei treated with heparin revealed that the chromatin is organized into "hublike" nuclear bodies joined by a network of cross-linked and branched chromatin fibers ranging in thickness from 25 to 1.5 nm.

**Key Words:** Decondensation; Spermatozoa; Heparin.

## INTRODUCTION

Condensation and stabilization of mammalian sperm chromatin—a process which gives to the mammalian sperm nuclei its characteristic properties [4, 7]—occurs during spermatogenesis and is usually completed during the initial steps of maturation of eutherian spermatozoa in the epididymis [6]. Chromatin condensation appears to be due to the presence in sperm cells of specific DNA properties [8] and to the formation of large numbers of disulfide bonds within the chromatin [5, 9]. This complicated process needs to be reversed after fertilization as a requirement for the transcription of the sperm genetic information [21].

Although nuclear decondensation has been induced *in vitro* by a wide variety of treatments [13, 15, 30], little is known of the mechanisms involved in sperm nuclear swelling and DNA synthesis *in vivo*. Acid mucopolysaccharides [11, 26] have been involved in the transition from the heterochromatic to the euchromatic state of somatic nuclear chromatin and they simultaneously increase the template availability of nuclear DNA [16, 18]. The addition of the acidic polymers heparin or polyxanthilic acid to rabbit sperm heads, previously exposed to disulfide reducing agents, released sperm DNA template restriction [33].

In the present study we show that decondensation of human spermatozoa nuclei can be

---

Received December 1979; January 8, 1980.

From the Sección de Enzimología, Subjefatura de Investigación Científica, Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social, Apartado postal 73-032, México 73, D.F.

\* Departamento de Biología del Desarrollo, Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México Apartado Postal 70-228 México 20, D.F.

Address reprint requests to: N. M. Delgado, Division de Bioquímica, Sección de Enzimología IMSS, Instituto Mexicano del Seguro Social, Apartado Postal 73-032, Mexico 73, D.F., Mexico.

induced by exposure of intact spermatozoa to heparin without requiring any other treatment and apparently without participation of intrinsic proteolytic activity, and that spermatozoa of rabbit, ram, or bull are not susceptible to this treatment.

### MATERIAL AND METHODS

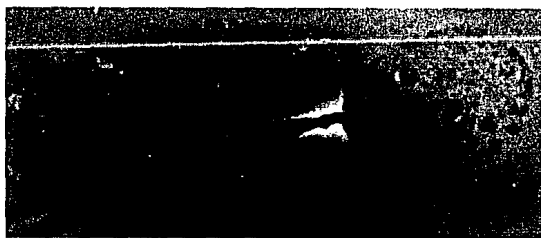
Human semen obtained from healthy, young donors was allowed to liquify at room temperature for 30 min. Only ejaculates with normal spermatobioscopy and with a minimum of debris and of cells other than spermatozoa were selected. Bull, ram, and rabbit ejaculates were obtained by standard procedures. The semen was centrifuged at 3000 rpm for 30 min and the spermatozoa pellets were washed twice with the salt medium proposed by Peterson and Freund [23]. The final sperm pellets were resuspended to a final concentration of  $10^8$  cells/ml.

To separate aliquots of  $10^8$  cells 500, 1000, 2500, or 5000 USP of porcine intestinal heparin (Sigma Chemical, Co.) were added. The suspensions were incubated with mixing at 37°C and aliquots were extracted at preestablished times. In some experiments the spermatozoa were incubated in the presence of heparin only during very brief times, 5, 10, 20, and 30 min and then washed one, two, or three times by centrifugation and resuspension with the medium with no heparin. The incubation was then continued until the preestablished time (6 hr) was reached.

To test the possible participation of proteolytic activity in the observed nuclear decondensation some experiments were performed in the presence of up to 10 mg/ml of trypsin soybean inhibitor (Sigma). Under these conditions no proteolytic activity could be detected by the method of Schwert and Takenaka [27].



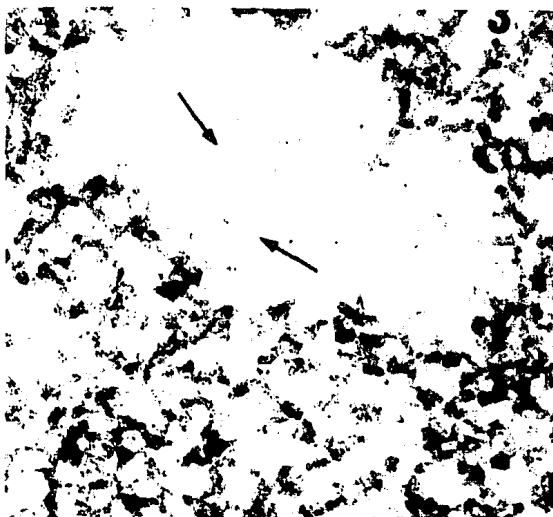
FIGURE 1. Phase contrast micrograph of human spermatozoa treated with heparin. It can be observed several degrees of swelling (*arrows*) and the highly condensed aspect of the normal human nuclei (*dotted arrow*)  $\times 560$ .



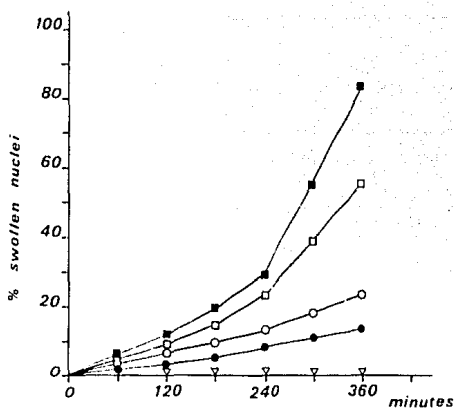
**FIGURE 2.** Aspect of the swelling of human spermatozoa nuclei induced by heparin at phase contrast microscopy.  $\times 830$ .

At the selected times aliquots of the treated spermatozoa were fixed during 60 min at room temperature by adding 9 volumes of 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.3, containing 1% paraformaldehyde plus 2.5% glutaraldehyde. They were then washed by centrifugation and resuspension with several changes of 0.1 M cacodylate buffer pH 7.3 [17].

Smears of fixed spermatozoa were observed by phase contrast microscopy using a Carl Zeiss microscope equipped with a green interference filter. Evaluation of the number of swelled nuclei



**FIGURE 3.** Electron micrograph of a vacuole-like structure in a human sperm head. Chromatin fibers are visible (*arrows*).  $\times 24000$ .



**FIGURE 4.** Time dependence of the reaction between heparin and decondensation of spermatozoa nuclei.  $\nabla$ — $\nabla$  rabbit, ram, and bull spermatozoa; ● —● 500 USP of heparin; ○ —○ 1000 USP of heparin; □ —□ 2500 USP of heparin; ■ —■ 5000 USP of heparin.

was done by counting 10 random high magnification fields. Spermatozoa were scored as "swollen when any portion of the nucleus was obviously decondensed (Figs. 1 and 2).

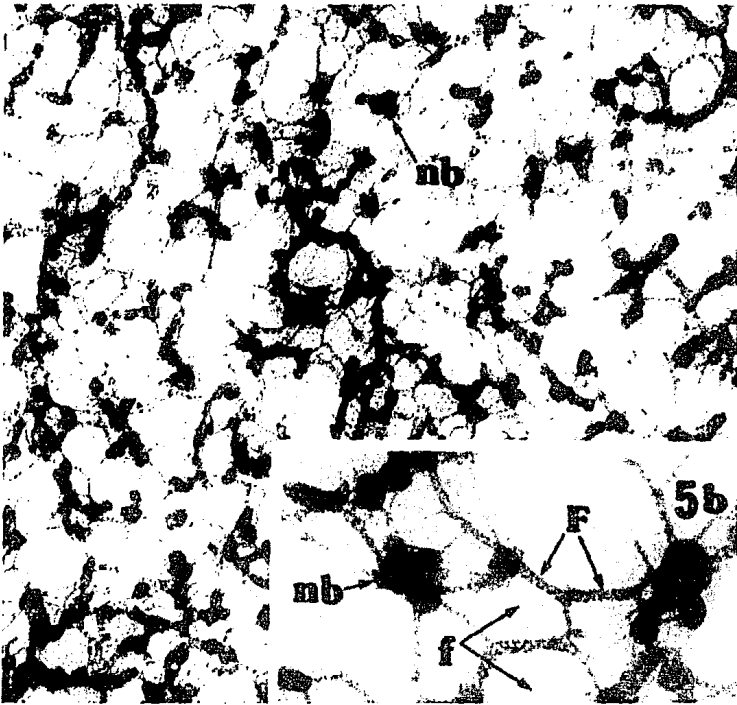
Electron microscopy was performed using a Zeiss EM-9 microscope. The fixed spermatozoa were postfixed and dehydrated by the method of Zetterqvist [32] and embedded in epon 812 [19]. Thin sections (gray silver) were cut on a LKB-III ultramicrotome, and stained with alcoholic uranyl acetate followed by lead citrate [25]. Negative staining was done with 2% phosphotungstic acid in distilled water, pH 7.

## RESULTS

The nuclei of washed ejaculated spermatozoa of the four species tested, human, rabbit, ram, and bull, appear highly condensed under the phase contrast microscope when incubated in the buffer medium without heparin for up to 72 hr. In the presence of heparin, the spermatozoa of all the species tested, except those of human (Fig. 2), remained with the same highly condensed nuclear appearance. Swelling of human spermatozoa nuclei commenced about 30 min after the addition of heparin and was dependent on the incubation time and on the concentration of heparin in the way depicted in Fig. 4. Even 500 units of heparin/ml induced an appreciable number of swelled nuclei after 6 hr incubation. This activity increased with heparin concentration reaching 83% of swelled nuclei after 6 hr incubation in the presence of 5000 units/ml. Time dependency showed a two-slope behavior, an initial, relatively slow rate of decondensation that was followed in the last 120 min by a drastic increase in the rate and number of swelled nuclei (Fig. 4). No modification in any of the parameters tested was observed when trypsin

soybean inhibitor (10 mg/ml) was added to the heparin incubation medium, or when the washed human were preincubated 15 min with the inhibitor before adding heparin to the medium.

At the electron microscope, thin sections taken from human spermatozoon treated with heparin under optimal experimental conditions revealed that the chromatin is organized into "hublike" nuclear bodies that measured 30–42 nm in diameter joined by a network of chromatin fibers ranging in thickness from 1.5 to 25 nm (Figs. 5a and 5b). Unlike somatic chromatin, these fibers showed a high degree of crosslinking and appear



**FIGURE 5.** a. Thin section of human spermatozoon nuclei treated with heparin. The chromatin is organized into "hub-like" nuclear bodies (*nb*) that measured 42–30 nm diameter joined by a network of chromatin fibers.  $\times 24,000$ . b. Insert. High-resolution electron microscopy of the decondensed human spermatozoon nuclei by heparin. Chromatin fibers ranging in thickness from 25 (*F*) to 1.5 nm (*f*).  $\times 76,000$ .

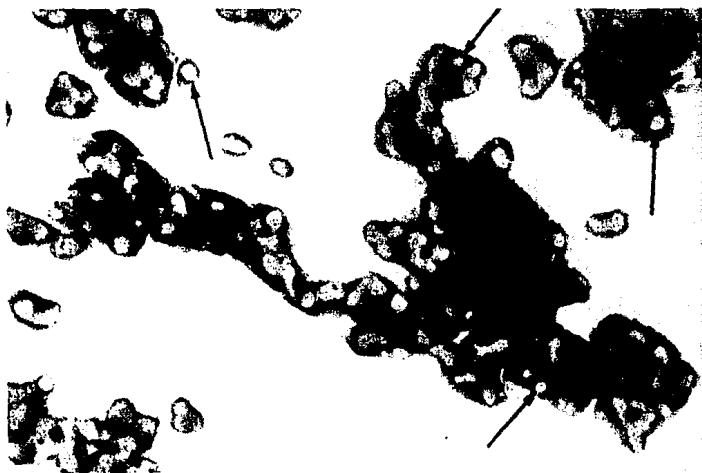


FIGURE 6. Negative staining with 2% phosphotungstic acid. The nuclear bodies (*arrows*), present either isolated or forming large clusters. The chromatin fibers however, were not preserved.  $\times 66500$ .

to have branched chains and loops (Figs. 5a and 5b). These fibrillar structures, but curiously not the nuclear bodies, were also frequently present within vacuolelike structures (Fig. 3).

After negative staining of similar material the remarkable homogeneity of the 30–42 nm nuclear bodies, present either isolated or forming large clusters, could be observed. The fibers however, were not preserved (Fig. 6). Even after complete swelling of the nuclei the basal plate remained with the sperm head and that many chromatin fibers appear to be anchored to this structure (Fig. 7).

## DISCUSSION

Little is known about the *in vivo* factors that induce sperm chromatin decondensation and male pronucleus formation. However, *in vitro* studies suggest that disulfide bond cleavage is one of the minimum requirement for this process [5, 10, 20]. The participation of non covalent interaction in sperm chromatin have been stressed but always as a process secondary to disulfide bond cleavage [12, 13]. The importance of the participation of non covalent interaction on the mechanisms of condensation and decondensation of human spermatozoa nuclei, suggested by Hernández et al. [15], is clearly supported by the finding that heparin by itself, without the participation of detergents or disulfide cleaving agents, is able of inducing complete decondensation of human spermatozoa chromatin (Fig. 5a).

A thiol-induced proteolytic activity has been implicated in the decondensation of the sperm nucleus. This proteolytic activity inferred to be intrinsic to the sperm nucleus [34] has been shown to be of acrosomal origin [31]. Decreasing the importance that those proteases could have any relevance to nuclear decondensation. The present results also show that sperm chromatin decondensation, at least in human, is not depending on the presence of proteolytic activity.

The results of this work may also stress the fact that nuclear decondensation can be induced by several biological factors, disulfide reducing agents, proteolytic activity, polyanions, etc., thus insuring the occurrence of an essential phenomenon in reproduction. They may also indicate that some species specificity regulates the occurrence of nuclear decondensation, at least in humans (Fig. 4).

Some indirect evidence suggests that heparinlike compounds may play an important role on the *in vivo* mechanism of nuclear swelling involved on the male pronucleus formation. Follicular fluid, accumulated in the antrum during maturation of ovarian follicles, contain important amounts of glycosaminoglycans such as hyaluronic acid and chondroitin sulfuric acid [22]. Rat ovarian slices incubated *in vitro* have been shown to synthesize heparinlike glycosaminoglycans at a near linear rate for 12 hr [14]. The same

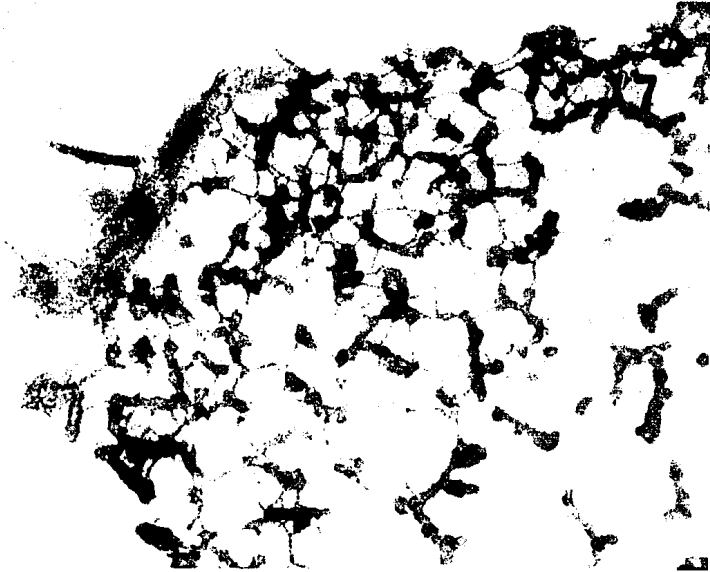


FIGURE 7. Thin section of a swelled human sperm head by heparin. It is possible to observe the basal plate where many chromatin fibers appears to be anchored.  $\times 24000$ .

results were observed *in vivo* after intraperitoneal administration of  $^{35}\text{S}\text{O}_4$  to sexually mature rats [14]. Kinetic studies indicated that these heparinlike substances, synthesized mainly by the granulosa and theca cells of antral follicles are subsequently released into the antrum in a way suggesting a process of active secretion. Although this accumulation of glycosaminoglycans in follicles has been related to the mechanism of ovulation, it is possible to suggest that these compounds may also play a part in the initiation of spermatozoa nuclear decondensation. This possibility may be supported by the following facts: nuclear swelling can be induced after only a short time of direct exposure of the spermatozoa to the sulfated compound (Fig. 4); this effect initiated by follicular fluid may be accentuated or at least supported by the mucopolysaccharides that came in contact with the sperm head during its penetration through the zona pellucida [24]. Bedford reported on the early stages of male pronucleus formation [2, 3] that nuclear decondensation frequently began before the sperm head had been completely incorporated into the Vitellus. In the case of amphibians [1], it has been suggested that germinal vesicle and the release by the control granules of negatively charged sulphated polysaccharides participates in the formation of the male pronucleus.

Although the nucleosome model of chromatin structure in somatic cells, and the way in which histones interact with the DNA to produce this structure seems to be firmly established [28], very little evidence exists on the DNA-protamine interaction that must regulate the chromatin structure on germinal cells.

Therefore it seems premature to discuss the structure of human sperm chromatin based only on electron microscope appearance. It is perhaps convenient to stress the presence of nucleosomes similar to those observed in somatic cells, although with the tendency to form conglomerates. This tendency is observed particularly after negative staining (Fig. 6). The absence of clear "string of pearls" images, substituted by an open network of chromatin fibers of different cross section, exhibit multiple crossing and/or branching (Figs. 5a and 5b). The existence of vacuolelike structures in which no nucleosomes but only chromatin fibers are visible (Fig. 3) are also interesting and could be related, perhaps, to the limiting macromolecular synthesizing activity of mature spermatozoa [29, 30].

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Dr. Javier Valencia and Gerardo Bustamante of the Centro Nacional para la Enseñanza, Investigación y Extensión de la Zootecnia, U.N.A.M., for samples of bull and ram semen.

#### REFERENCES

1. Barry JM, Merriam RW (1972): Swelling of hen erythrocyte nuclei in cytoplasm from xenopus eggs. *Exp Cell Res* 71: 90-96
2. Bedford JM (1970): Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol Reprod Suppl* 2: 128-158
3. Bedford JM (1972): An electron microscopic study of sperm penetration into the rabbit egg after natural mating. *Am J Anat* 133: 213-254
4. Bedford JM, Bent MJ, Calvin HI (1973): Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 33: 19-29
5. Bedford JM, Calvin HI (1974): The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J Exp Zool* 188: 137-156
6. Bedford JM, Calvin HI, Cooper GW (1973): The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 18: 199-213
7. Borenfreund E, Fitt E, Bendich A (1961): Isolation and properties of deoxyribonucleic acid



- from mammalian sperm. *Nature London* 191: 1375-1377
8. Calvin HI (1976): Comparative analysis of the nuclear basic proteins in rat, human, guinea pig, mouse and rabbit spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 434: 377-389
  9. Calvin HI, Bedford JM (1971): Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *J Reprod Fertil Suppl* 13: 65-75.
  10. Calvin HI, Bedford JM (1974): Stimulation of actinomycin D-binding to eutherian sperm chromatin by reduction of disulphide bonds. *J Reprod Fertil* 36: 225-229
  11. Cook RT, Aikawa M (1973): The effects of heparin on endogenous DNA polymerase activity of rat liver nuclei and chromatin fractions. *Exp Cell Res* 78: 257-270
  12. Evenson DP, Witkin SS, De Harven E, Bendich A (1978): Ultrastructure of partially decondensed human spermatozoa chromatin. *J Ultrastruct Res* 63: 178-187
  13. Gall WE, Ohsumi Y (1976): Decondensation of sperm nuclei in vitro. *Exp Cell Res* 102: 349-358
  14. Bebauer H, Lindner HR, Amsterdam A (1978): Synthesis of heparin-like glycosaminoglycans in rat ovarian slices. *Biol Reprod* 18: 350-358
  15. Hernandez-Montes H, Iglesias G, Mujica A (1973): Selective solubilization of mammalian spermatozoa structures. *Exp Cell Res* 76: 437-440
  16. Heston WDW, Zirkin BR, Coffey DS (1975): Release of chromatin template restriction in rabbit spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 64: 162-168
  17. Karnovsky MJ (1965): A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27: 137A-138A
  18. Kinoshita S (1976): Properties of sea urchin chromatin as revealed by means of thermal denaturation. *Exp Cell Res* 102: 153-161
  19. Luft JH (1961): Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 409-414
  20. Mahi CA, Yamagimachi R (1975): Induction of nuclear decondensation of mammalian spermatozoa in vitro. *J Reprod Fertil* 44: 293-296
  21. Marushige Y, Marushige K (1975): Enzymatic unpacking of bull sperm chromatin. *Biochim Biophys Acta* 403: 180-191
  22. McGaughey RW (1975): A comparison of the fluids from small and large ovarian follicles of the pig. *Biol Reprod* 13: 147-153
  23. Petersen RN, Freund M (1970): ATP synthesis and oxidative metabolism in human spermatozoa. *Biol Reprod* 3: 47-54
  24. Proppin D, Tauber PF, Zaneveld LJD (1978): Fertilization and implantation. In *Human Fertilization*, Ludwig H, Tauber PF (Eds). Massachusetts: PSG Publishing Company, pp 152-164
  25. Reynolds ES (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-212
  26. Saig H, Kinoshita S (1976): Changes of chromatin structure induced by acid mucopolysaccharides. *Exp Cell Res* 102: 143-152
  27. Schwert WG, Takenaka Y (1955): A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochim Biophys Acta* 16: 570-575
  28. Tsanev R (1978): The substructure of nucleosomes. In *The cell nucleus*, Busch H (Ed). New York: Academic Press, Vol IV, pp 107-134.
  29. Witkin SS, Bendich A (1977): DNA Synthesizing activity in normal human sperm. *Exp Cell Res* 106: 47-54
  30. Witkin SS, Korngold GC, Bendich A (1975): Ribonuclease-sensitive DNA-synthesizing complex in human sperm heads and seminal fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3295-3299
  31. Young RJ (1979): Rabbit sperm chromatin is decondensed by a thiol-induced proteolytic activity not endogenous to its nucleus. *Biol Reprod* 20: 1001-1004
  32. Zetterqvist H (1956): The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Thesis, Karolinska Institutet, Stockholm
  33. Zirkin BR, Boison A, Heston WDW, Coffey DS (1976): Release of DNA template restrictions in rabbit spermatozoa and rat liver nuclei. *J Exp Zool* 197: 283-288
  34. Zirkin BR, Chang TSK (1977): Involvement of endogenous proteolytic activity in thiol-induced release of DNA template restrictions in rabbit sperm nuclei. *Biol Reprod* 17: 131-137

# Heparin Binding Sites in the Human Spermatozoa Membrane

N. M. DELGADO,<sup>1</sup> R. REYES,<sup>1</sup> L. HUACUJA,<sup>1</sup> H. MERCHANT,<sup>2</sup> AND A. ROSADO<sup>3</sup>

The existence in the human spermatozoa membrane of receptorlike functional group for heparin was studied. Incubation of whole spermatozoa with tritiated heparin induced the specific binding of  $745 \pm 112$  pmol of heparin per  $5 \times 10^7$  sperm cells with an intrinsic association constant  $K_D = 3.6 \times 10^{-6}$  M. The specificity of binding was shown by the lack of competence in the binding process of some other glycosaminoglycans used at concentrations  $20 \times$  higher than heparin. However, dextran sulfate was a very efficient competitive agent. Autoradiography experiments showed that labeling was almost completely restricted to sperm cells in the process of nuclear decondensation. This technique showed the presence of a high amount of radioactive heparin in the isolated sperm membranes even after several washings. Heparin may participate both in the final part of the capacitation process (acrosome reaction) and in the decondensation of sperm nuclei.

**Key Words:** Receptors; Glycosaminoglycans; Autoradiography; Ionic strength; Decondensation; Peroxidation; Fertilization.

## INTRODUCTION

Heparin and various other sulfated glycosaminoglycans are widely distributed in vertebrate and invertebrate tissues [3, 10] and it has recently been suggested that they are involved in a number of important cells functions [10, 14], including activation of DNA transcription and synthesis [4, 13]. In the case of human sperm cells heparin is capable of decondensing the highly structured nuclei of these cells [5], initiating DNA synthesis [8].

Plasma membrane of rat liver and human endothelial cells bind heparin in receptorlike specific sites [7, 12]. Treatment of liver cells with heparin releases phospholipase  $A_1$ , suggesting that the binding of heparin to the membrane might occur at the site of phospholipase  $A_1$  attachment [17]. These findings and the presence of these naturally occurring polyanions in the uterine and follicular fluids as well as in the zona pellucida and in the secretion of the corticle granules of the ovum [6, 16] suggest that these

---

Received July 7, 1981; revised August 18, 1981.

From the Sección Enzimología, Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social, Apartado postal 73-231, México 73, D.F.,<sup>1</sup> Departamento de Biología del Desarrollo, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70-228, México, 20, D.F.,<sup>2</sup> and Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México, D.F., Mexico.<sup>3</sup>

Address reprint requests to: N.M. Delgado, Sección de Enzimología, Unidad de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social. Apartado postal 73-231. México 73, D.F. Mexico.

polyanions serve as a physiological trigger to initiate the post-fertilization decondensation of human spermatozoa nuclei [5].

It is important to evaluate if the human spermatozoa plasma membrane has a specific receptor for heparin in order to support the previously stated hypothesis.

## MATERIAL AND METHODS

Spermatozoa were obtained from human ejaculates as previously described [5]. Special care was taken to prevent membrane damage before the incubation procedure. Observation of an aliquot of the washed sperm cells showed good motility and more than 80% of viable cells [2]. The washed sperm cells were resuspended to a final concentration of  $5 \times 10^7$  cells/ml in the incubation medium containing  $(4.16-41.6) \times 10^{-6}$  M of [ $^3\text{H}$  (G)] heparin sodium salt (0.2 mCi/mg New England Nuclear) in 113 mM KCl, 12.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.5 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$  and 20 mM tris all adjusted to pH 7.4.

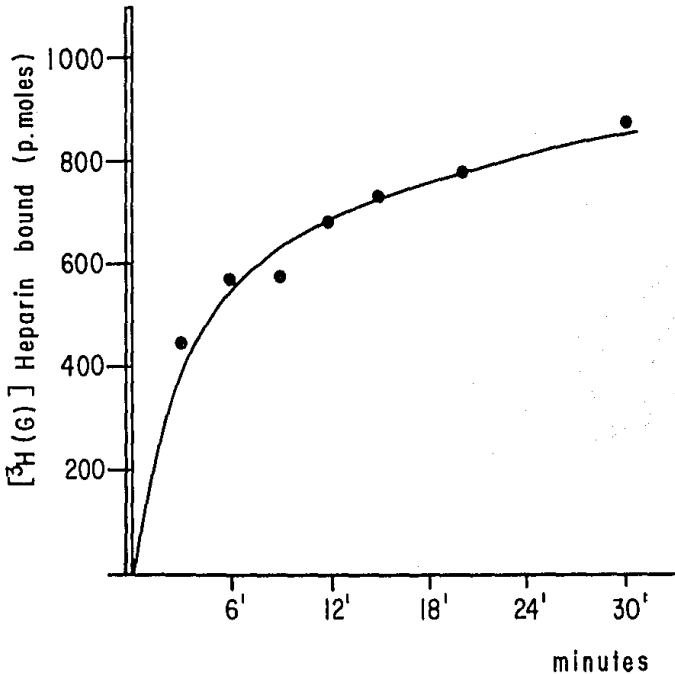
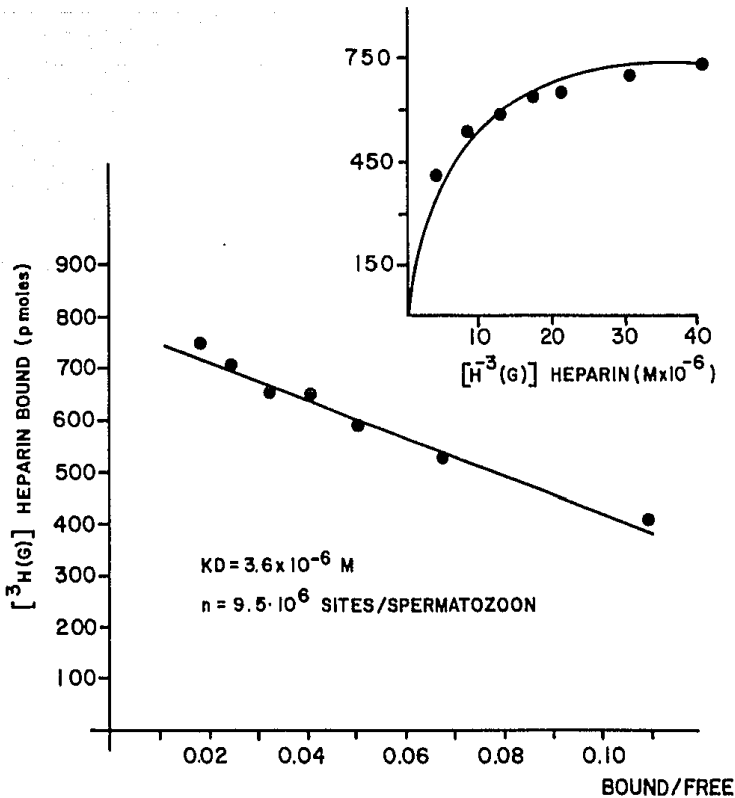


FIGURE 1. Time course of  $^3\text{H}$ -polysaccharide binding to cells. The reaction mixture contained  $5 \times 10^7$  cells/ml, 113 mM KCl, 12.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.5 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM tris buffer pH 7.4, and  $41.6 \times 10^{-6}$  M of heparin sodium salt (New England Nuclear). Incubations were carried out at  $37^\circ\text{C}$ . At indicated times aliquots were withdrawn from the mixture and the amount of cell bound ( $^3\text{H}$ ) polysaccharide was quantitated.



**FIGURE 2.** The interaction of (<sup>3</sup>H) heparin with the human spermatozoa as a function of the total concentration of glycosaminoglycan sulfate added. The amount of heparin bound is indicated in the ordinates. A Scatchard plot is indicated in the main figure. The concentration of free heparin was obtained by subtracting the amount of heparin bound from the total concentration of heparin added to the reaction mixture. Duplicate assays were performed by incubating (<sup>3</sup>H) heparin as indicated with  $5 \times 10^7$  human spermatozoa in a total volume of 1.0 ml.  $K_D$  was obtained from the slope of the Scatchard plot, calculated by the method of least squares, by evaluating the molar concentration of (<sup>3</sup>H) Heparin from the total amount of ligand bound in 1.0 ml of reaction mixture.  $N$ , the number of binding sites per sperm cell, was obtained from the  $Y$ -intercept and the number of spermatozoa added to the incubation mixture.

Duplicate reaction mixtures were incubated under several different experimental conditions and then the binding process was terminated by chilling the tubes in melting ice and fixing the cells by the addition of 3 volumes of 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.3, containing 1% paraformaldehyde plus 2.5% glutaraldehyde. The treated, fixed, spermatozoa were washed by centrifu-

gation and resuspended with several changes of 0.1 M cacodylate buffer pH 7.3 until no radioactivity was observed in the supernatant. The final pellet of washed spermatozoa was quantitatively transferred to a vial with 10 ml of Bray's solution [1] and counted in a Packard Tri Carb liquid scintillation spectrometer.

Obtention of membranes and membrane-free cells from prelabeled sperm cells, was performed as described previously [9, 11]. The obtained membrane fraction was dialyzed against deionized water for 24 hr (two changes) at 4°C. The final fractions obtained (membranes and membrane-

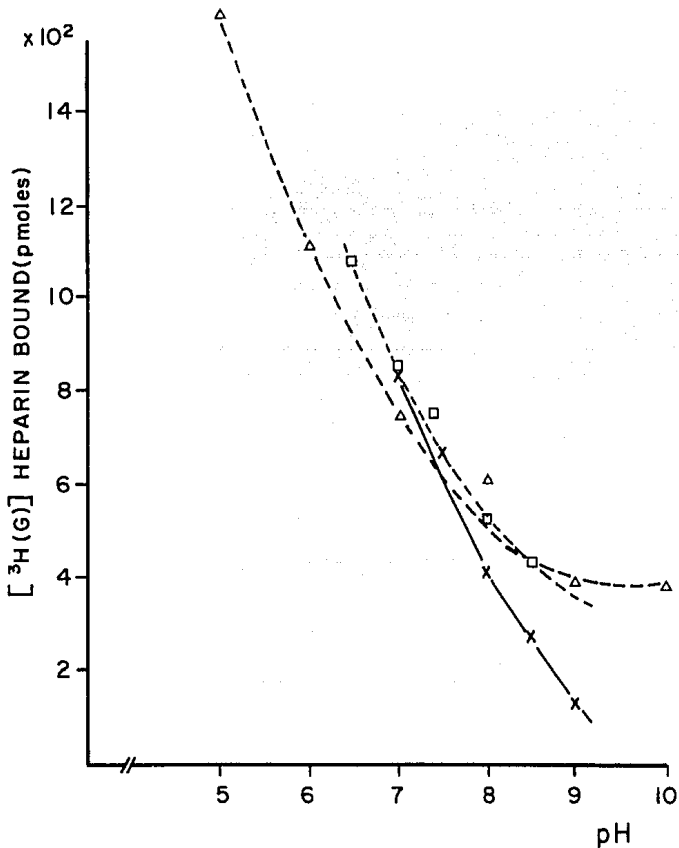


FIGURE 3. The pH profile on the binding of ( $^3\text{H}(\text{G})$ ) heparin to the plasma membrane of the sperm cells.  $\Delta$ — $\Delta$ , tris-citrate;  $\square$ — $\square$ , tris-phosphates;  $x$ — $x$ , tris-HCl.

- Release of chromatin template restriction in rabbit spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 64:162-168
9. Huacuja L, Delgado NM, Merchant H, Pancardo RM, Rosado A (1977): Cyclic AMP induced incorporation of  $^{32}\text{P}$  into human spermatozoa membrane components. *Biol Reprod* 17:89-96
  10. Jaques LB (1979): Heparin: an old drug with a new paradigm. *Science* 206:528-533
  11. Keyhani E, Storey BT (1973): Energy conservation capacity and morphological integrity of mitochondria in hypotonically treated rabbit epididymal spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 305:557-559
  12. Kjellén L, Oldberg A, Rubin K, Hook M (1977): Binding of heparin and heparan sulphate to rat liver cells. *Biophys Res Commun* 74:126-133
  13. Kraemer RJ, Coffey DS (1970): The interaction of natural and synthetic polyanions with mammalian nuclei. II. Nuclear swelling. *Biochim Biophys Acta* 224:568-578
  14. Roblin R, Albert So, Gelb Na, Black pH (1975): Cell surface changes correlated with density-dependent growth inhibition. Glycosaminoglycan metabolism in 3T3, SV3T3, and Con A selected revertant cells. *Biochemistry* 14:347-357
  15. Scatchard G (1949): The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51:660-672
  16. Tadano Y, Yamada K (1978): The histochemistry of complex carbohydrates in the ovarian follicles of adult mice. *Histochemistry* 57:203-215
  17. Waite M, Sisson P (1973): Solubilization by heparin of the phospholipase  $A_1$  from the plasma membranes of rat liver. *J Biol Chem* 248:7201-7206

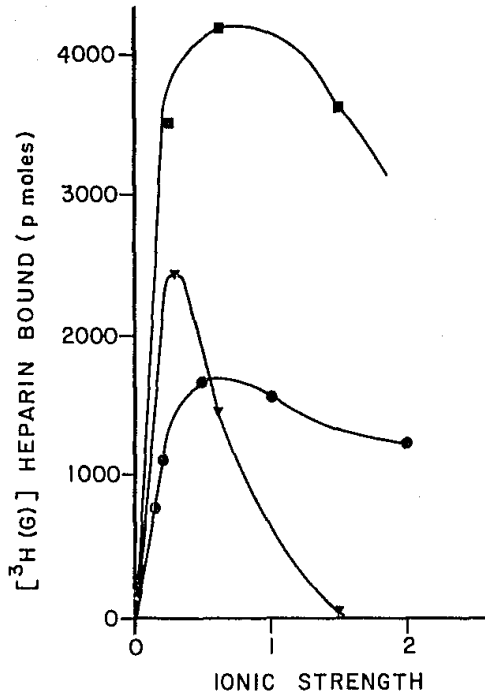


FIGURE 4. The effect of ionic strength on the binding of ( $^3\text{H}$ ) heparin to the plasma membrane of the sperm cells was studied by adding different salts at various ionic strengths.  $\bullet$ — $\bullet$ , NaCl;  $\blacktriangledown$ — $\blacktriangledown$ , ZnCl<sub>2</sub>;  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ , CaCl<sub>2</sub>.

free spermatozoa) were quantitatively transferred to a vial with 10 ml of Bray's solution [1] for radioactivity determination or processed for electron microscopy.

Electron microscopy was performed as previously described [5]. For autoradiography 1  $\mu\text{m}$  sections were cut serially after thin sectioning. Then they were mounted on glass slides precoated with 0.5% gelatine, dipped in NTB-2 Kodak liquid emulsion, and developed with D-15 after 2–3 weeks exposure. The observations were made with phase contrast optics after briefly staining the sections with Azur II-Toluidine blue 1:1. All organic reagents were obtained from Sigma Chemical, Co. The inorganic highest Quality Merck reagents and solvents were used.

## RESULTS

The amount of cell associated ( $^3\text{H}$ ) polysaccharide increased with incubation time, being almost linear for up to 6 min and then leveling off (Fig. 1). Heparin binding was a linear function of the amount of added spermatozoa; analysis of the data by means of a Scatchard plot [15] (Fig. 2) showed a specific binding activity of  $745 \pm 112$  pmol of heparin per 50 million spermatozoa and an intrinsic association constant,  $K_D$ , of 3.6

$\times 10^{-6}$  M for cell-polysaccharide complex. This constant is 10 times higher than that found by Kjellén et al. [12] using rat liver cells. The high affinity of glycosaminoglycans for the sperm cells was further demonstrated by the fact that even after repeated washing little heparin was removed.

For each pH studied washing and resuspension procedures were done in the same buffer used to determine the pH effect (Fig. 3). Binding depended strictly on pH, being maximum in the acid range. Although optimum binding occurred below pH 7, the present studies were done at pH 7.4 in order to preserve the physiological conditions. Even when used at concentrations 20 times higher than heparin, none of the sulfated mucopolysaccharides tested was capable of interfering with heparin binding to human sperm cells. However, dextran sulfate was a definitive competitive agent and at equimolecular concentration each molecule of dextran sulfate interfered with the binding of two molecules of heparin.

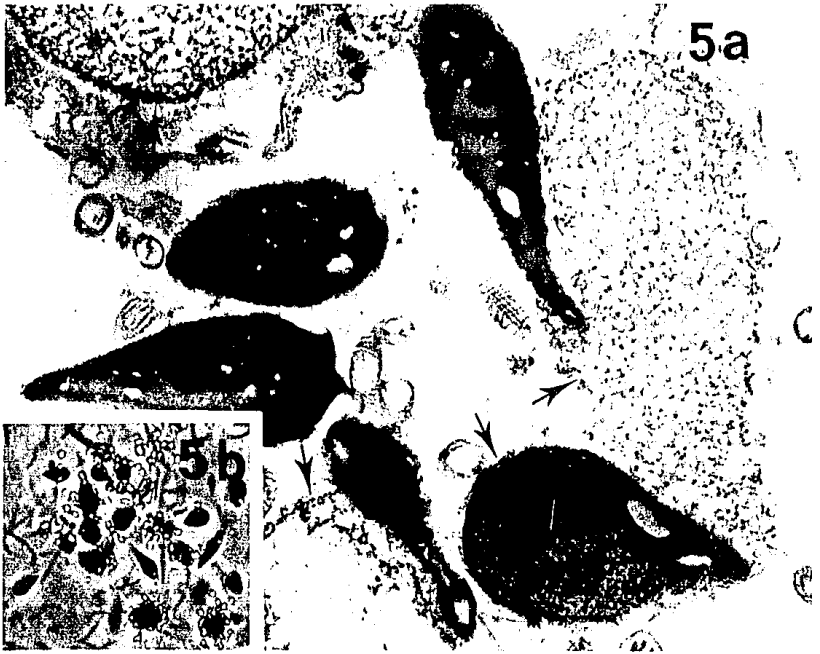
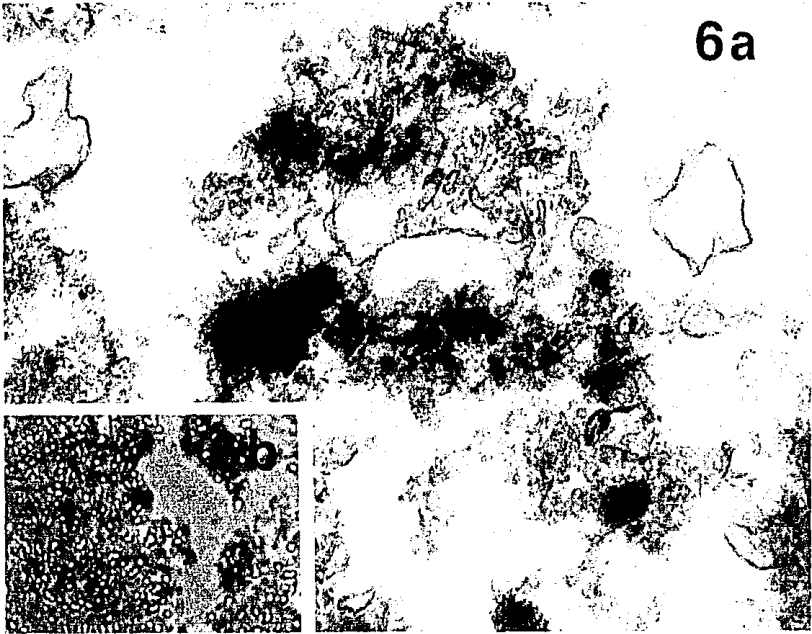


FIGURE 5. a. Electron micrograph of a sperm suspension treated with  $^3\text{H}$ -Heparin. It shows several sperm heads without cell or acrosomal membranes. Some of them are undergoing chromatin decondensation (arrows).  $21,000\times$ . b. Autoradiography of a semithin section taken serially from the same block of Fig. 5a. Only the decondensed heads seem to be heavily labeled.  $1000\times$ .





**FIGURE 6.** a. An electron micrograph showing the aspect of the membrane fraction obtained from the sperms showed in Fig. 5a. 21,000 $\times$ . b. Light microscopy autoradiography of the same pellet shown in Fig. 6a. 1000 $\times$ .

The effect of ionic strength on the binding of [ $^3\text{H}$  (G)] heparin was studied by adding different salts at various ionic strengths to deionized water (Fig. 4). An optimal value for ionic strength was obtained in the range of 0.3–0.6 ionic strength, depending on the ionic species used, showing at the optimum binding values 2–5 times higher than those found during the usual experimental conditions.

Although the hypotonic treatment used during the sperm fractionation procedure removed not only the plasma membrane but also the acrosomal material [9] (Fig. 5a), a fact that must be taken into consideration in the interpretation of the results, the results of the light and electron microscopy observations showed clearly the binding of heparin to the cell surface (Fig. 5b). This fact is further supported by the fractionation autoradiography, experiments that showed the presence of a high amount of the radioactive heparin in the isolated membranes even after several washings (Fig. 6b). It was also observed that the decondensing heads showed the denser labeling (Fig. 5b).

## DISCUSSION

Heparin binds to the sperm cells surface. The binding process seems to be analogous to the interaction between, e.g., hormones and cell surface receptors in showing saturation kinetics (Fig. 2), time (Fig. 1), and temperature dependent. Furthermore, the binding of heparin to cells has a certain degree of specificity. An inhibitory effect of structurally related glycosaminoglycans was observed. However, the effect of pH and ionic strength changes on binding, indicates that important, although apparently specific, ionic interactions are involved in the process (Figs. 3, 4).

Heparin contains two sulfate groups per glycosyl residue, while chondroitin 4-sulfate, chondroitin 6-sulfate, and dermatan sulfate, which were unable to inhibit heparin binding or to produce sperm nuclear decondensation, contain an average of only one sulfate per glycosyl residue. The decondensing ability of glycosaminoglycans seems to be correlated with the degree to which they are sulfated. Moreover, the only heparin competing compound was dextran sulfate, which contains three sulfate groups per glycosyl residue. This compound has been also found, in preliminary observations, to behave as an effective decondensing agent. The presence in the tertiary structure of regions containing high density of sulfated groups plays an important role in the action of these sulfated polysugars.

Although heparin exerts its physiological effects on the human sperm cells by inducing the decondensation of their nuclei [5], the first obstacle for heparin is the cell boundary, the plasmatic membrane. Therefore the binding of the polysaccharide to cells may be a prerequisite for polysaccharide internalization. Binding to membrane and nuclear decondensation might be interrelated, although the processes might be independent, with heparin first binding and then exerting a destabilization effect on the cell membrane. After penetration has been insured by disarrangement of the cell membrane, it exerts its action on the nuclei. Microscopic observations show that the only sperm whose nuclei show decondensation are those that bind heparin in their surface (Fig. 5b).

It is possible that these series of events in human spermatozoa constitute part of the molecular events that participate in the membrane modifications occurring during capacitation.

## REFERENCES

1. Bray GA (1960): A simple efficient liquid scintillation for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal Biochem* 1:279-285
2. Campbell RC, Doth HM, Glover TD (1956): Nigrosin-cosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *J Agric Sci* 48:1-8
3. Cassaro CMF, Dietrich CP (1977): Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. *J Biol Chem* 252:2254-2261
4. Cook RT, Aikawa M (1973): The effects of heparin on endogenous DNA polymerase activity of rat liver nuclei and chromatin fractions. *Exp Cell Res* 78:257-270
5. Delgado NM, Huacuja L, Merchant H, Reyes R, Rosado A (1980): Species specific decondensation of human spermatozoa nuclei by heparin. *Arch Androl* 4:305-313
6. Foley ME, Griffin BD, Zuzel M, Aparicio SR, Bradbury K, Bird CC, Clayton JK, Jenkins DM, Scott JS, Rajah SM, McNichol GP (1978): Heparin-like activity in uterine fluid. *Brit Med J* 2:322-324
7. Glimelius B, Busch C, Hook M (1978): Binding of heparin to the surface of cultured human endothelial cells. *Thromb Res* 12:773-782
8. Heston WDW, Zirkin BR, Coffey DS (1975):