



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA

CBS

“ESTUDIO SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA
CROMATINA DEL ESPERMATOZOIDE DE
LOS MAMIFEROS”



COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA
REPRODUCCION ANIMAL

P R E S E N T A:

GISELA FUENTES MASCORRO

Asesor Interno:

DR. ADOLFO ROSADO GARCIA

Asesor Externo:

DR. OMAR HERNANDEZ PEREZ

A S E S O R E S

INTERNO

DR. ADOLFO ROSADO GARCIA
COORDINADOR DE LA MAESTRIA EN BIOLOGIA
DE LA REPRODUCCION ANIMAL
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

EXTERNO

DR. OMAR HERNANDEZ PEREZ
JEFE DEL LABORATORIO DE BIOQUIMICA MOLECULAR
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN BIOQUIMICA
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
IMSS

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO
DE BIOQUIMICA MOLECULAR UNIDAD DE INVESTIGACION
MEDICA EN BIOQUIMICA HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI IMSS**

**CON EL APOYO DE UNA BECA OTORGADA POR EL IMSS
DESDE FEBRERO DE 1993 HASTA LA FECHA.**

JURADO

PRESIDENTE.

DR. OMAR HERNANDEZ PEREZ

SECRETARIO

DR. NESTOR M. DELGADO PONCE

PRIMER VOCAL

DR. ADOLFO ROSADO GARCIA

SEGUNDO VOCAL

M en C HECTOR F. SERRANO

AGRADECIMIENTOS

ESTE TRABAJO LO DEDICO ESPECIALMENTE A MI HERMANA.

LIC. EN EDUCACION BASICA MARIA DE LOURDES FUENTES MASCORRO.QEPD

La más querida de todas mis hermanas. Siempre estaras conmigo en todo lo que haga, por que uno no esta donde el cuerpo sino donde más se le extraña y aquí se te extraña siempre.

Has sido para mi ejemplo de entrega, dedicación, carácter, lucha, en tí he conocido el amor por la Profesión que uno elige, la más pura entrega por los ideales, la más encarnizada lucha por vivir, para mi tu ganaste la batalla final.

Siempre que estoy ha punto de vencerme, tú estas ahí para levantarme. Lamento profundamente no haber terminado esto antes, pero esto es lo que me gusta y como siempre dijiste me aguanto. El apoyo que siempre me brindaste y la fé que pusiste en mi, me mantendran el resto del camino, hasta que volvamos ha encontrarnos.

Este trabajo como te lo prometí esta dedicado a tí. Con el consuelo de que ahora estas mucho mejor que antes.

A MI FAMILIA QUIENES SIEMPRE ME HAN MOSTRADO CON EL EJEMPLO EL CAMINO CORRECTO,SIN USTEDES ESTO SIMPLEMENTE NO HUBIERA OCURRIDO.

A MI ABUELA MATERNA SRA. JUANA LOPEZ CENTENO.QEPD

Por haber luchado siempre porque mi futuro fuera mejor que tu existencia, lo lograste y siempre te lo agradeceré.

A MI MADRE

PROFESORA. MARIA ENGRACIA MASCORRO LOPEZ.

Madre, siempre he tenido en tí la muestra de la tenacidad y la entrega, un regazo cálido y seguro para protegerme de las tormentas, simplemente te debo la vida y lo que soy, no existen palabras para agradecer, pero si hechos.

A MI PADRE. SR. ESSAU FUENTES TOLEDO. QEPD.

Al final de tú camino me mostraste que nunca debe existir el rencor, gracias.

CD MANUEL ROGELIO FUENTES MASCORRO.

Rojo siempre he tenido en tí la muestra de la puntualidad y la dedicación al trabajo, espero que el desperdicio de talento algún día valga la pena. Que la vida te colme de buenas cosas.

MVZ ISMAEL FUENTES MASCORRO.

El apoyo que me brindaste en este pasaje de mi vida, ha permitido que se concluya, es muy agradable saber que siempre hay alguien que podra recogerte hasta altas horas de la madrugada. La vida te compensa con grandes cosas.

MVZ YOLANDA GUTIERREZ.

Tener una cuñada que se dedique a lo mismo que una, permite que la familia comprenda que no soy la única loca sobre la tierra, gracias por el apoyo brindado, que tu vida al lado de mi Hermano Ismael , siempre este llena de para bienes.

A LA FAMILIA ROMAN HURTADO.

TIA CARMELA. Desde pequeña has sido como mi segunda madre, gracias por tu cariño.

TIO AGUSTIN. Por mostrarme que la paciencia es buena consejera.

ADRIANA ROMAN HURTADO. Por mostrarme hasta donde se llega siendo tenaz, gracias.

JAVIER ROMAN HURTADO Y FAMILIA, Esperando que su futuro se grato.

SR. RAUL ROMAN HURTADO Y FAMILIA. Por que los mejores años esten por llegar.

A MIS SOBRINOS.

ITZEL, GABRIELA Y RICARDO. Por que el futuro sea grande.

A LAS PERSONAS QUE AL BRINDARME SUS CONOCIMIENTOS HAN PERMITIDO QUE MI FORMACION COMO INVESTIGADOR SEA CADA VEZ MAS UNA REALIDAD.

DR. ADOLFO ROSADO GARCIA.

Maestro es aquél que en cada jornada de trabajo, lanza el corazón y enseña con tal pasión como no lo ha hecho nunca.

Gracias por permitirme caminar junto a usted en este pasaje de mi vida, la guía que siempre he encontrado en usted me ha permitido, conocer los tropiezos de este camino y disolverlos, aunque aún me falta un largo camino por recorrer espero me siga permitiendo hacerlo juntos.

DR. OMAR HERNANDEZ PEREZ.

Se que la jornada no fué facil, por tal motivo mi agradecimiento a su paciencia, apoyo y guía que siempre recibí, es mayor, gracias.

QFB LUZ MARIA BALLESTEROS NEGRETE.

Lamento no haber sido una buena alumna y no haber aprendido todo lo que usted, tan generosamente intento transmitirme. Muchas gracias.

DR. JAVIER VALENCIA.

El apoyo que siempre recibí de usted, me permitio finalizar este proyecto.

DR.NESTOR M DELGADO PONCE.

Agradezco profundamente la disposición y amabilidad que me brindo, para la revisión de este modesto trabajo.

M en C HECTOR SERRANO.

Es difícil encontrar a un investigador que muestre tanta disposición para ayudar a los alumnos, gracias.

DRA. REBECA GARCIA MACEDO.

La ayuda y el impulso que usted me brindo en los momentos difíciles, siempre sera para mi un motivo de agradecimiento.

DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES.

Es muy agradable tener cerca a una persona con la que se puede desahogar uno con confianza. Gracias por su apoyo.

DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO.

Pocos investigadores he conocido, tan displicentes con su equipo y reactivos, ¡ojala muchos tomaran su ejemplo, que beneficia sobre todo a aquellos que intentamos formarnos como futuro de este país. Gracias

DR. GUILLERMO RAMIREZ AVILA.

No tienes una idea de como valoro tu ayuda y consejos, gracias.

DR. JUAN JOSE HICKS GOMEZ.

Agradezco profundamente el apoyo que desinteresadamente me brido, solo lamento que el pasado y las actitudes de otras personas, tengan más peso.

ALBERTO GUZMAN GRENFELD. Hacen falta en este país más personas con entrega a la investigación como Tú, gracias por interesarte en mi trabajo.

RAFAEL MEDINA. Gracias por ese apoyo, que siempre hace falta.

ALFONSO VELAZQUEZ. Los consejos de quién ya anduvo el camino, seran asimilados. gracias.

MARGARITA Maggi siempre es grato charlar contigo, eres un remanso de paz.

CECILIA VILAR. Esa sonrisa que siempre muestras hace placenteras las jornadas.

GENOVEVA Geno, agradezco mucho el contar con tu amistad.

A MIS AMIGOS.

Por orden alfabético, para no herir susceptibilidades, consiente de que cada uno ocupa un lugar especial.

GERONIMO CRUZ Por tan bonito dibujo.

DULCE MARIA GARCIA C. Por mostrarme el valor de un amiga.

MARCO MEDINA Tus palabras de aliento son muy gratificantes.

EFRAIN ISLAS OJEDA. Eres un excelente ejemplo de que querer es poder.

CLARA LOZA ESCUTIA. Contar con tu amistad, me ha permitido caminar en momentos difíciles, gracias.

ROSA MARIA MUÑOZ FLORES. Rosita, conserva tu optimismo.

CLARA ORTEGA CAMARILLO. Siempre seras un ejemplo de tenacidad, gracias por las consultas psicológicas.

MARTIN PALOMAR. Tu buen humor, mejora casi cualquier situación.

DALILA PASCOE LIRA. Dalín, tener alguien que crea en uno es importante para la condición humana, gracias.

AGUSTIN ROJAS MONTIEL. Contar con un amigo como usted, le permite a uno tener un apoyo seguro.

MARCELA VERGARA ONOFRE. Por que algún día nos estemos riendo de esto, con la fraternidad que nos une.

A TODOS LOS PROFESORES QUE DEJARON PROFUNDA HUELLA, PORQUE DE CADA UNO HE PODIDO TOMAR LO MEJOR. GRACIAS

PROFRA. DIANA ELSA MARTINEZ PUENTE Por enseñarme a perder.

PROFRA. GUADALUPE PANTOJA Por esta cicatriz, que me permite enseñar Física.

DRA. PARDO Por mostrarme las maravillas de la Veterinaria

DR. ALEJANDRO HARLOW Por su grata amistad.

M en C LADISLAO ARIAS Por ese apoyo que siempre he recibido.

DR. ESCUDERO. Por mostrarme las maravillas del mundo de la Reproducción.QEPD

DR. RAUL RICALDE. Por mostrarme la puerta de entrada a el mundo de la investigación y brindarme su amistad, la huella que usted ha dejado en mi es perenne.

DRA. ANA ELENA LEMUS. Ejemplo de profesionalismo y entrega. La formación que usted me brindo ha sido una de las más solidas que he recibido, muchas gracias por su apoyo e interés.

M en C RODRIGUEZ. Contar con profesores tan didácticos como usted es invaluable.

DR. TOMAS MORATO. El interés que usted pone, es ejemplar, gracias por todo el apoyo que siempre he recibido de usted.

DRA. MARIA LUISA VILLAREAL. La genética sin usted hubiera sido como siempre una pesadilla, el interés que usted pone en cada alumno es grandioso. gracias.

DRA. GABRIELA MORALI. Siempre he considerado que usted sabe como dos personas, y no creo estar equivocada, muchísimas gracias por brindarme siempre un remanso de paz.

INDICE

INTRODUCCION	1
-ESTRUCTURA DE LA CROMATINA	1
- NUCLEOSOMA LIMITE	4
- REGION ESLABON	7
- GRUPOS DE PROTEINAS DE ALTA MOVILIDAD	8
NIVELES DE EMPAQUETAMIENTO DE LA CROMATINA DE LAS CELULAS SOMATICAS	9
-NUCLEOSOMA	9
-FIBRA DE 10nm	11
-FIBRA DE 30 nm	11
-ASA	13
-ESCARPELA, ROLLO, CROMATIDA	13
ESPERMATOGENESIS	14
PROTAMINAS	15
-TIPO II Protaminas estables	16
-PROTAMINA P1	17
-PROTAMINA P2 En Mamíferos	18
NIVELES DE EMPAQUETAMIENTO DEL DNA DEL ESPERMATOZOIDE	20
-DOBLE HELICE	20
-COMPLEJO DNA-PROTAMINAS	20
-FIBRA DE 10nm	22
-EQUIVALENTE AL SOLENOIDE	22
MODELO DE DONA PARA EL ASA DEL DNA DEL ESPERMATOZOIDE	23
- CRITERIOS	23
- PRIMER PASO	24
- SEGUNDO PASO	25
REASOCIACION	28
HIPOTESIS	30
OBJETIVOS	30

MATERIAL Y METODOS	31
-EQUIPO	31
-EXTRACCION DE NUCLEOS	32
-EXTRACCION DNA DE HIGADO	34
-EXTRACCION DNA DE ESPERMATOZOIDE	37
-EXTRACCION DE CROMATINA	41
-REASOCIACION	43
- ELECTROFORESIS	46
- GRADIENTE ISOCINETICO	46
RESULTADOS	48
ANALISIS DE RESULTADOS	60
DISCUSION	62
CONCLUSIONES	67
BIBLIOGRAFIA	68

TABLAS Y FIGURAS

- Tabla 1 Características y modificaciones de las proteínas histonas y HMG	6
- Tabla 2 Comparación espermatozoide leucocito	21
- Tabla 3 Medias y Desviación estándar DNA	53
- Tabla 4 Medias y Desviación estándar Cromatina	53
- Tabla 5 Obtención de núcleos	35
- Tabla 6 Obtención DNA hígado	38
- Tabla 7 Obtencion DNA espermatozoide	40
- Tabla 8 Obtencion de cromatina hígado	42
- Tabla 9a Reasociación de nucleosomas	45
- Tabla 9 b Procesos de caracterización	45
- Fig. 1 Modelo de enrollamiento del DNA somático	10
- Fig. 2 Modelo equivalente al solenoide	26
- Fig. 3 Comparación enrollamiento somático y espermático del DNA	29
- Fig. 4 Espectro DNA Hígado de Rata	48
- Fig. 5 Espectro DNA Hígado de Bovino	49
- Fig. 6 Espectro DNA Espermático	50
- Fig. 7 Espectro Cromatina de Rata	51
- Fig. 8 Espectro Cromatina Hígado Bovino	52
- Fig.9 Electroforésis digestión núcleos de Hígado	54
- Fig 10 Electroforésis productos de reasociación	55

- Fig.11 Electroforésis productos de reasociación	56
- Fig.12 Electroforésis productos de reasociación	57
- Fig. 13 Tinción de proteínas productos de reasociación.	58
Gráfica 1 Gradiente isocinético	59
Gráfica 2 Gradiente isocinético	59

INTRODUCCION.

Fleming en 1879, utilizando uno de los primeros microscopios capaces de permitir el estudio del núcleo de las células eucarióticas, observó que al teñir las células con distintos colorantes se podían observar dentro del núcleo objetos bandeados intensamente teñidos, por lo cual llamó a esta sustancia de gran afinidad por los colorantes "cromatina", palabra derivada del griego chroma, color.

Posteriores investigaciones han demostrado que este componente del núcleo celular descrito por Fleming, constituye realmente un complejo de DNA, RNA y proteínas. La cromatina sufre cambios dramáticos en su apariencia microscópica durante los diversos estadios del ciclo celular. Durante la fase M del ciclo celular, la cromatina adquiere un aspecto morfológico condensado, bien definido e individualizado, constituyendo los cromosomas, cuyo número es una característica de cada especie. Durante la interfase, cuando el DNA que constituye parte de la cromatina es transcrito y replicado, la cromatina se halla ampliamente dispersa y los cromosomas no pueden ser distinguidos en forma individual. Basados en sus distintas afinidades tintoriales, los citólogos han descrito la presencia de dos tipos de cromatina durante la interfase del ciclo celular: una variedad menos densamente empacada llamada eucromatina y una variedad más densamente empacada denominada heterocromatina. Estos dos tipos de cromatina difieren también en su destino funcional, ya que la eucromatina es capaz de expresarse genéticamente mientras que la heterocromatina carece de esta propiedad (Voet y Voet, 1995).

Utilizando como tejido base el timo de ternera, la cromatina fué preparada en estado semipuro y caracterizada químicamente por Zubay y Doty en 1959. Estos investigadores encontraron que el componente esencial de la cromatina es un complejo desoxirribo-núcleoproteico que contiene casi igual cantidad de DNA y de proteínas. También propusieron que las proteínas constituyentes de este complejo pertenecen a un grupo especial de pequeñas proteínas básicas que se acomodan, formando una cadena, en el surco mayor de la doble hélice de DNA.

Unos años después, Frambrough y Bonner (1966), estudiando la composición química de las histonas obtenidas de diferentes especies animales y vegetales,

encuentran que la fracción de histonas del guisante y del tejido de mamíferos son muy similares, sugiriendo que los diferentes tipos de histonas se originaron tempranamente en la evolución y que su estructura y composición han sido mantenidas sin grandes modificaciones, lo cual indica que estas proteínas son fundamentales para la función celular.

Algunos de los primeros indicios acerca de la estructura de la cromatina se obtuvieron en la década de los 70's, a partir del análisis de los patrones de difracción de rayos x, los cuales sugirieron que la cromatina está organizada de acuerdo con un motivo repetitivo con una frecuencia observada cada 10 nm (Richards y Pardon, 1970). La digestión de la cromatina con DNasa I (Hewish y Burgoyne, 1973), mostró que la hidrólisis parcial del DNA presente en la cromatina producía fragmentos cuyos tamaños parecen ser múltiplos de un tamaño base. Posteriormente, algunos investigadores (Rill y van Holde, 1973; Sahasrabudhe y van Holde, 1974), aislaron de la cromatina digerida con nucleasa de estafilococo, una pequeña partícula nucleoproteica que parecía responder a las subunidades descritas con anterioridad. El análisis de estas partículas demostró que contenían un compacto doblés de DNA de tamaño corto. Por estos mismos tiempos aparecieron estudios de microscopía electrónica que mostraban la existencia en la cromatina de una estructura particular repetitiva formada por subunidades corpusculares unidas entre ellas por un delgado hilo de DNA, que le daba a la cromatina la apariencia de un "collar de cuentas" (Olins y Olins 1973; Woodcock 1973).

Olins y Olins (1974), a través de la microfotografía electrónica proveen evidencia convincente de que la cromatina en interfase es, al menos cuando la preparación se realiza a baja fuerza iónica, una estructura compuesta como de "cuentas en una cuerda". Las cuentas tienen dimensiones de aproximadamente 100 angstroms de diámetro, y se encuentran separadas unas de otras por espacios cortos. Estos autores dieron a estas cuentas el nombre de "cuerpos nu". En forma independiente Kornberg (1974) y van Holde y col (1974), sugieren que la subunidad o "cuerpo nu", consiste de una pequeña cadena de DNA que esta asociada con un complejo octamérico de histonas, que contiene dos copias de cada una de las cuatro histonas. Un poco después Oudet y col (1975) denominaron estas subunidades con el nombre más atractivo de "nucleosomas".

Los datos de Burgoyne y col (1974) y de Noll (1974), indicaron que los pequeños fragmentos de DNA obtenidos de cromatina parcialmente digerida con nucleasa fueron múltiplos de una unidad base igual a 200 pares de bases. Por otro lado los llamados "monómeros 11s" de nucleoproteínas, aislados de cromatina digerida con nucleasa, a los que les falta la histona H-1 (Sahasrabudde y van Holde 1974; Oosterhof y col, 1975), están constituidos por fragmentos de DNA de alrededor de 110 a 120 pares de bases de largo. van Holde y col (1974), propone que un pequeño segmento de DNA (de 140 a 150 pares de bases), envuelve a un "núcleo" central de un complejo octamérico de histonas, formando una subunidad compacta que alterna con regiones más accesibles de DNA (Axel 1975; Sollner-Webb y Fesenfeld 1975; van Holde y col, 1975; Shaw y col., 1976).

La hidrólisis parcial, realizada con nucleasa estafilococcica, de la cromatina de eritrocitos de aves y de núcleos de hepatocitos, induce la formación de una amplia distribución de partículas, fragmentos de DNA, que parecen ser derivados oligoméricos de una unidad monomérica de DNA que tiene un tamaño promedio igual a 200 pares de bases. Kleichline y col (1976), encuentran que después de la digestión de cromatina con endonucleasa se obtienen fragmentos de DNA que parecen ser múltiplos de un fragmento de 200 ± 20 pares de bases. Noll (1977) estudiando los resultados producidos por la digestión de la cromatina con DNAsa I, sugiere que en el centro del nucleosoma quedan expuestas aproximadamente 80 pares de bases, sensibles a la digestión de la nucleasa y concluye que el estudio de estos puntos pueden proveer información de como se ensamblan los nucleosomas.

El carácter de los monómeros de DNA cambia rapidamente cuando se prolonga el tiempo de digestión, produciendo fragmentos de 160 a 170, 140 a 150 y 120 a 130 pares de bases; simultáneamente el tamaño de los fragmentos de los oligómeros decrece por alrededor de 40 a 60 pares de bases. Regulando el tiempo de digestión se pueden aislar partículas de nucleoproteína que contengan predominantemente 160 a 180 pares de bases ó 130 a 150 pares de bases. Ambas separaciones contienen cantidades aproximadamente equimolares de histonas H2A, H2B, H3 y H4, pero las últimas partículas carecen de H-1 (o H-5 en eritrocitos de aves), (Bakayev y col, 1975; Varshavsky y col, 1975; Olins y col, 1976; Simpson y Whitlock Jr., 1976).

Estos resultados indican que hay dos regiones en el nucleosoma, una sección de alrededor de 40 - 60 pares de bases de DNA, que es muy sensible a la acción de las nucleasas y está asociada con la histona rica en lisina, "región eslabón" y un fragmento que permanece intacto tras la digestión parcial de la cromatina, y que forma parte de lo que se denomina "nucleosoma límite o partícula central nucleosómica". Esta estructura contiene una cadena de DNA de 140 - 150 pares de bases y ocho histonas, dos de cada tipo H2A, H2B, H3 y H4. (octámero de histonas) (van Holde y col, 1975; Shaw y col, 1976; Olins y col, 1976; Alberts y col, 1994).

NUCLEOSOMA LIMITE.

Las propiedades químicas de las histonas son bastante similares en todos los organismos. Las histonas son proteínas pequeñas, con carga positiva, que contienen numerosos residuos de arginina y de lisina. Las cargas positivas dispersas por el esqueleto proteico de las histonas se unen rápidamente a las cargas negativas del esqueleto fosfodiéster del DNA, lo cual permite una importante interacción iónica. Las histonas H3 y H4 son relativamente más ricas en arginina, ya que tienen más residuos de arginina que de lisina, en cambio las histonas H2A y H2B tienen un mayor número de residuos de lisina que de arginina (Simon y Felsenfeld, 1979) (tabla 1). La estructura primaria de cada histona es casi igual en todos los organismos, lo que implica la correspondiente analogía de estructura terciaria y de función (Rawn, 1989). El alto grado de conservación, llamado identidad, no es igual en toda la estructura de las histonas, sino que hay regiones cuya secuencia de amino ácidos ha sido más consistentemente conservada. Por ejemplo, la región básica N-terminal de la histona H4, entre los residuos 1 - 20 y de la histona H3 entre los residuos 1 - 30 (De-Lang y col, 1969a,b; Ogawa y col, 1969; Isenberg, 1979; Weischet y col, 1979; Ohe e Iwai, 1981; Waterborg y Matthews, 1984; Csordas, 1990). En contraste la H1 es la histona menos conservada durante la evolución.

La clase de histonas ricas en lisina, incluye 3 familias H1, H5 localizada exclusivamente en eritrocitos nucleados (Butler y Neelin, 1961), y H1° que predomina en células que son mitotícamente inactivas (Panyim y Chalkley, 1969), lo que sugiere que H1° y H5 pueden tener funciones similares. En organismos superiores existen 6 subtipos de H1, que son H1a, H1b, H1c, H1d, H1e (Seyedin y Kistler, 1980; Lennox y

Cohen, 1983; Lennox, 1984 y H1t que esta específicamente presente en el testículo (Seyedin y Kistler, 1980). Para Lennox, 1984 estos subtipos difieren en su habilidad para promover la formación de la espiral de 10 nm de la fibra de cromatina.

Estudios hechos por D'anna Jr e Isenberg, (1973; 1974); Kornberg y col, (1974) y Roark y col., (1974), mostraron que ciertos pares de histonas forman fácilmente complejos diméricos (H2a, H2b) y tetraméricos (H3, H4)². Esta característica de interacción provee las bases para establecer el mecanismo de formación de las subunidades que constituyen la estructura de la cromatina. Burton y col, (1975) encontraron que las histonas f-3 (H-3) y F2a1 (H-4), se disocian de la cromatina de timo de ternera reversible y cooperativamente como un complejo equimolar y que en ausencia de DNA forman dímeros, tetrámeros y oligómeros. Hyde y Walker (1975) encuentran que F2a2 (H-2a) y F2b (H-2b), cuando se colocan en soluciones adecuadas se asocian para formar un dímero con un peso molecular de 28400. Estos mismos investigadores precisaron que la presencia de F1 (H-1) libre, no tiene efecto en la interacción de las otras 4 histonas.

Camerini-Otero y col, (1976), demostraron que el grupo de histonas rico en arginina, H3 + H4, tienen un papel central en la organización del DNA en la cromatina. Del mismo modo, Bosely y col, (1976) concluyen que el par de histonas H3 + H4 es esencial para la formación de la estructura de la cromatina, aunque para completar el desarrollo estructural también es necesaria la presencia de H2A + H2B. Oudet y col, (1977), encuentran que H3 y H4 interaccionan eficientemente con alrededor de 130 pares de bases del DNA, sugiriendo que ellas solas pueden organizar casi todo el nucleosoma. Simon y col, (1978), encuentran que un octámero conteniendo sólo H3 y H4 puede formar una estructura con propiedades topológicas e hidrodinámicas similares a las de un nucleosoma.

Karawajew y Heymann en 1980, comprueban que las histonas H3 y H4 forman tetrámeros en solución. También comprueban que estos tetrámeros interactúan con alrededor de 3/4 partes del DNA que forma el nucleosoma, uniéndose a él particularmente en la sección media y terminal de los 145 pares de bases. H2A y H2B participan como dímeros (H2A-H2B), unidos a vueltas opuestas de DNA. De esta manera es posible proponer que la interacción de la parte globular del centro de histonas con distintos sitios de los 145 pares de bases, constituyen las principales

CARACTERISTICAS Y MODIFICACIONES DE LAS PROTEINAS HISTONAS Y HMG

Sustrato	Peso Mol. (KDa)	Lis/Arg	Modificación de las proteínas Nucleares a				Glicosilación
			Acetilación ^b	Fosforilación ⁿ	Polil(ADP-ribose)ilación	Metilación	
Histona H1	21.0	63/3	0	++	++	0	0
Histona H2A	14.0	14/12	+	+	+	0	0
Histona H2B	13.8	20/8	+	0	+	0	0
Histona H3	15.3	13/18	++	+	0	++(Lis)	0
Histona H4	11.3	11/14	++	+	0	++(Lis)	0
HMG 1-2	31.7	50/10	+	0	++	+(Arg)	+
HMG 14-17	11.2	21/5	+	++/+	+	?	+
Control							
Movimiento			Rápido	Rápido	Rápido	Lento	
Requiere síntesis RNA/proteínas			No	No	No	?	
Regulación Hormonal			++	++	++	±	

^a Para células normales intactas o tejidos

^b Solo N^ε-Lisina

Tabla 1. Csordas, 1990

interacciones responsables del mantenimiento del nucleosoma límite. Esta organización está posteriormente reforzada por las interacciones de las regiones N-terminales de las histonas H3 y H4 dentro del núcleo. Finalmente, Karawajew y Heymann (1980), proponen como un modelo de la estructura histónica del nucleosoma la participación de un octámero de histonas, formado por un tetrámero (H3-H4)₂ y dos dímeros (H2A-H2B), que están unidos por una fuerte interacción entre H2B y H4.

En el nucleosoma, los puntos de contacto existentes entre el DNA y el núcleo de histonas son aproximadamente cada 10 pares de bases (Arents y col, 1991). Las histonas H3 y H4 hacen contacto con el DNA dentro de 30 pares de bases de cualquier lado del centro del nucleosoma (Pruss y Wolffe 1993). En suma, la periodicidad helicoidal del DNA varía en todas las partes del nucleosoma con los 3 giros centrales de la hélice teniendo una periodicidad de 10.7 pares de bases y el exterior de los giros de 10 pares de bases (Hayes y col, 1990; 1991).

La interacción DNA-proteínas está involucrada en muchos de los procesos fundamentales que ocurren dentro de la célula, incluyendo empaquetamiento, replicación, recombinación, restricción y transcripción (Freemont, 1991). Se sabe, por ejemplo, que la delección del extremo N-terminal de la histona H-4 altera la estructura de la cromatina y alarga desproporcionadamente la fase G2 del ciclo celular. Asimismo, la delección del núcleo hidrofóbico de H4 bloquea la segregación cromosomal y es una mutación letal (Kayne y col, 1988).

REGION ESLABON.

El DNA eslabón, de 20 a 100 pares de bases (Bolander, 1994), se asocia parcial o totalmente con las histonas ricas en lisina H1 o H5 en la región de enlace de los nucleosomas, desempeñando un papel de "eslabón-de unión nucleosomal" (Greil y col, 1976; Shaw y col, 1976; Noll y Kornberg, 1977; Strätling, 1979). Esta región de alrededor de 200 angstroms de longitud es fácilmente accesible al ataque de las nucleasas (Woodcock y col, 1976).

Se sabe que las histonas unidoras, como H1, interactúan establemente con el DNA nucleosomal solo después de que el centro del nucleosoma ha sido formado

(Hayes y col, 1991). Jeong y Stein (1994), proponen además que es posible que las histonas de tipo H1 estén asociada a las estructuras del poro nuclear.

La histona H1 se une a la partícula central del nucleosoma para sellar los puntos de entrada y salida del DNA, el dominio central de H1 aparentemente interactúa con la partícula central del nucleosoma, mientras que el extremo cargado positivamente interactúa con el DNA eslabón y es importante en la condensación de la cromatina antes de la mitosis (Roth y Allis 1992).

GRUPO DE PROTEINAS DE ALTA MOVILIDAD.

No podemos dejar de mencionar, aunque sea someramente, otro grupo de proteínas que son importantes en la estructura de la cromatina, Estas proteínas fueron extraídas inicialmente con NaCl 0.35 M y se sabe que son fácilmente solubles en ácido tricloroacético. El sobrenadante obtenido después de tratar las soluciones de cromatina con este ácido contiene algunas proteínas que poseen una gran movilidad en geles de poliacrilamida, por lo que fueron llamadas proteínas de alta movilidad (HMG). El grupo de proteínas 14 y 17 son tan similares unas con otras que podrían ser consideradas como un solo grupo (HMG 14-17); HMG 1 y 2 podrían ser tratadas de la misma manera (HMG1-2). Las proteínas HMG14-17 tienen una distribución desigual de cargas: el extremo amino terminal es muy básico, mientras que el extremo carboxilo terminal es muy negativo. Existen dos sitios de unión para HMG 14-17 en cada nucleosoma, se cree que las proteínas aseguran el DNA en los puntos donde este entra y sale del centro del nucleosoma (Bolander, 1994); el extremo básico amino se une al DNA y el extremo carboxilo negativo se une a las histonas (Martian y col, 1980). Por tal razón, las proteínas HMG 14-17 estabilizan el nucleosoma, tanto en estado condensado como descondensado (Ausio, 1992). Estas proteínas son también parcialmente responsables de inducir espaciamiento regular en los nucleosomas. A diferencia de las histonas, las proteínas HMG están glicosiladas (Bolander, 1994), y ha sido propuesto que estas proteínas podrían interactuar con la matriz nuclear a través de sus residuos de azúcar (Tremethick y Drew 1993. Reeves y Chang 1983).

Las proteínas HMG 1-2 son tan largas como las proteínas HMG 14-17, pero tienen una estructura muy diferente. Las proteínas HMG 1-2, están formadas por un dominio hidrofóbico central en donde se pueden encontrar un par de segmentos de

unión al DNA con una estructura muy característica, por lo que han sido llamadas cajas HMG para el DNA. Cada una de estas estructuras está compuesta de 3 α -hélices (Bianchy y col, 1992); dos perpendiculares y antiparalelas a la tercera así que forman una "L". La forma en que las cajas HMG se unen al DNA es aún desconocida. El extremo carboxilo, los últimos 30 residuos, es extremadamente ácido pues contiene numerosos residuos de ácido glutámico o ácido aspártico (Lee y col, 1987). La función fisiológica de este extremo rico en grupos carboxilo es desconocida, pero in vitro es capaz de desdoblar (Yoshida, 1987), o reiniciar la constitución de la hélice del DNA (Paull y col, 1993).

NIVELES DE EMPAQUETAMIENTO DE LA CROMATINA DE LAS CELULAS SOMATICAS.

NUCLEOSOMA.

Esta formado por alrededor de 200 pares de bases de DNA (166 a 241 pares de bases dependiendo de la fuente) (Thomas, 1984) asociados con un núcleo octamérico de proteínas que comprende un tetrámero central de las histonas ricas en arginina H3 y H4 y dos dímeros laterales de las histonas ligeramente ricas en lisina H2A y H2B. En este andamio proteico el DNA está organizado dando casi dos vueltas (aproximadamente 166 pares de bases), alrededor del octámero de histonas. Los dos puntos de entrada y salida de la espiral que el DNA forma sobre el centro de histonas están sellados por la unión de una molécula de la histona rica en lisina H1, la cual bloquea estos puntos de entrada y salida del DNA. El DNA restante 34 pares de bases (considerando la estructura típica de "collar de cuentas" con una subunidad de 200 pares de bases) comprende el DNA llamado de unión que conecta un nucleosoma con el siguiente. El largo de la región de unión puede variar desde 0 hasta 80 pares de bases en la cromatina obtenida de diferentes sistemas celulares. (fig. 1).

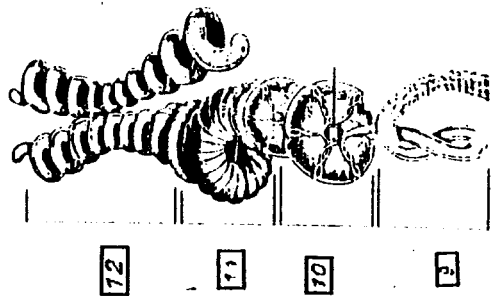
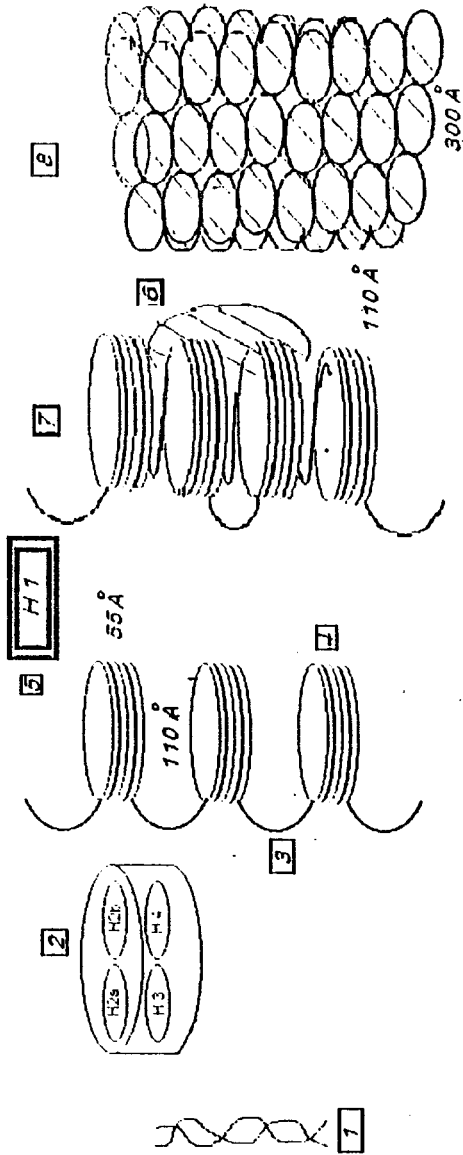


Fig. 1 Modelo de enrollamiento del DNA somático.

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| 1.- Doble hélice. | 7.- Collar de perlas |
| 2.- Octámero de Histonas | 8.- Solenoide |
| 3.- Región espaciadora | 9.- Un asa (50 x 10 ⁶ bp) |
| 4.- Nucleosoma límite | 10.- Escarpela (6 asas) |
| 5.- Histona H1 | 11.- Rollo (30 escarpelas) |
| 6.- Proteínas de alta movilidad | 12.-2 Cromátidas (2x 10 rollos) |

FIBRA DE 10 nm.

Esta fibra está constituida por un arreglo lineal de nucleosomas, que bien podría llamarse "filamento nucleosomal" (Thomas, 1984). En la cromatina que contiene H1, el DNA de unión y el nucleosoma siguiente dan una vuelta hacia la izquierda, dando a la fibra extendida una apariencia de zig-zag. Por el contrario en los tipos de cromatina que carecen de H1, los puntos de entrada y salida del DNA son más al azar, creando una conformación extendida irregular de "cuentas en una cuerda" (Thoma y col, 1979).

FIBRA DE 30 nm.

Las micrografías electrónicas de los cromosomas en metafase y las secciones delgadas de núcleos en interfase, procesadas a partir de tejidos obtenidos en ausencia de agentes quelantes (Ris y Kornberg, 1979), así como la fibra extendida de cromosomas en metafase, sugieren que el siguiente nivel de empaquetamiento del filamento nucleosomal, está constituida por la "fibra de 30 nm", también llamada solenoide (Finch y Klug, 1976; Sperling y Klug, 1977; Czichos y col, 1989).

Esta fibra de 30 nm, tiene alrededor de 6 nucleosomas por vuelta y representa una concentración de aproximadamente 50 dobleces de la doble hélice de DNA (Csordas, 1990). Se ha demostrado ampliamente que las histonas que participan en la unión inter-nucleosomal, como H1 y H5, son indispensables en el establecimiento y estabilización de esta estructura solenoide (Renz y col, 1977; Strätling y col, 1978; Thoma y col, 1979; Allan y col, 1981). Se sabe que su presencia es más determinante que la incubación en soluciones de fuerza iónica baja, y que la acción en la compactación de la fibra puede deberse a la interacción entre dominios globulares (Zlatanova y van Holde, 1996).

Existe gran controversia acerca de la existencia *in vivo* de este nivel de estructuración, debido a que aunque, de acuerdo con Finch y Klug, 1976, la

estructura de solenoide puede ser inducida fácilmente *in vitro* con un ancho de alrededor de 300 angstroms, Thoma y col, 1979 concluyen que solo en concentraciones de NaCl superiores a 100 mM se forma la fibra de 30 nm. Leuba y col, 1994, encuentran que la adquisición de este orden de empaquetamiento por la cromatina es inducido por concentraciones de NaCl iguales o superiores a 80 mM. Por otro lado Horowitz y col (1994), al estudiar la arquitectura tridimensional de la cromatina por medio del procedimiento de tomografía electrónica, concluyen que incluso en los núcleos con fibras de cromatina claramente definidas hay regiones donde las fibras interdigitan la una con la otra perdiendo individualidad y haciendo difícil interpretar la presencia de determinadas estructuras tridimensionales.

Las observaciones realizadas para precisar las propiedades de este tipo controversial de estructuración de la cromatina, demuestran que la fibra contiene de seis a ocho nucleosomas, que se presenta cuando la solución se realiza en medios con una fuerza iónica que va de 70 a 100 mM y que requiere concentraciones milimolares de Mg^{2+} . Se ha señalado que el diámetro de la fibra varía desde 25 hasta alrededor de 45 nm, dependiendo de la fuente de cromatina, el método para el aislamiento, la preparación de la muestra y el método utilizado para precisar su estructura (Zlatanova y van Holde, 1996). van Holde y Zlatanova (1995), han sugerido que el alto orden de estructuración que la cromatina adquiere en medios con altas concentraciones de sal, puede ser llamado "fibra condensada o compactada".

La localización de la exposición o internalización de los extremos N-terminales de las histonas centrales y del extremo C-terminal de H1 son de interés, ya que estas regiones contienen sitios de modificaciones enzimáticas, que podrían modular la estabilidad de la estructura (Thomas, 1984). Woodcock y col (1984), plantean que la región de unión de estas "fibras condensadas o compactadas" no está internalizada dentro de la estructura de alto orden puesto que debe permanecer expuesta para poder ser modificada bioquímicamente cuando sea necesario, lo cual hace a esta estructura más compatible con el modelo de "cinta torcida". Leuba y col en 1994, proponen que el DNA unidor debe también estar localizado en el exterior de la fibra de cromatina condensada, formando junto con los nucleosomas las paredes del solenoide.

Por otro lado Zlatanova y van Holde (1996) concluyen que las caras planas del nucleosoma son casi paralelas al eje de la fibra.

Woodcock, 1994 concluye que la dificultad de poder demostrar la presencia de la fibra de 30 nm en la cromatina de varias estirpes celulares, sugiere que la exposición de los genes a los mecanismos reguladores de la transcripción, no se realiza adecuadamente en la estructura canónica de 30 nm de la cromatina condensada. Esta fibra provee aproximadamente 100 dobles de compactación del DNA.

ASA.

Este nivel de enrollamiento no está totalmente entendido, parece que ciertas regiones del DNA se asocian con un soporte proteico intra-nuclear, descrito hace algunos años con el nombre de "matriz nuclear". Las regiones de la estructura cromatínica que se asocian con la matriz, están separadas por largas secuencias o asas constituídas aproximadamente por 20,000 a 100,000 pares de bases. Se ha propuesto que el DNA que participa en la formación de estas asas, podría contener un juego completo de genes funcionalmente relacionados.

ESCARPELA, ROLLO, CROMATIDA.

Existe evidencia de que en los niveles de organización de los cromosomas somáticos eucariontes, cada aumento en el grado de compactación del DNA es multiplicativo. El principio es sencillo: la compactación del DNA en los cromosomas eucariontes se realiza al envolverse un asa sobre otra asa, sobre otra asa, etc. (Leningher y col, 1982). Debe tenerse en cuenta, que este tipo de empaquetamiento requiere gran cantidad de espacio. Ya desde la formación de los octámeros de histonas que forman los nucleosomas, estas estructuras semiesféricas ocupan un volumen importante. Este requerimiento de espacio aumenta con cada nivel de super-

estructuración, porque el enrollamiento y superenrollamiento requieren el ir dejando espacios vacíos considerables en el interior de los giros (Pienta y Coffey, 1984).

En el caso de las células somáticas el gran volumen ocupado por la estructuración del DNA en la cromatina no es de gran importancia, porque el volumen nuclear de las células somáticas es suficiente para contener la cantidad adecuada de DNA, estructurado funcionalmente de esta manera.

En el presente trabajo nos interesa particularmente el extrapolar estos conocimientos al caso del empaquetamiento nuclear de la cromatina en la cabeza de la gameta masculina de los animales superiores, sobre todo en los mamíferos. Debe ser evidente que el volumen del núcleo del espermatozoide es tan reducido que deben surgir dudas inmediatas sobre la posibilidad de que la cromatina del espermatozoide se halle estructurada siguiendo los mismos principios que regulan su conformación en las células somáticas. En efecto, los cálculos indican que si la organización del DNA de la célula espermática se hiciera de la misma manera que en las células somáticas, es decir en estructuras del tipo núcleosomal, se requeriría un volumen mínimo más de dos veces superior (213%) del que se dispone en la cabeza del espermatozoide (Pogany y col., 1981). Es pues fácil concluir que el DNA del espermatozoide debe estar organizado y empaquetado de una manera totalmente diferente, como ha sido fehacientemente demostrado en los últimos años (Balhorn, 1982; Hernández-Pérez y Rosado, 1988; Ballesteros y col., 1988; Ward y col., 1989; 1990; Ward y Coffey, 1991; Poccia y Green, 1992; Cowan y Myles, 1993; Auger y Dadoune, 1993; Allen y col., 1993; Hud y col., 1993; Jennings y Powel, 1995).

ESPERMATOGENESIS.

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación de múltiples pasos cuyo mayor cambio involucra modificaciones sustanciales en la actividad génica y el rearrreglo de la estructura de la cromatina por el cual una espermatogonia del tallo celular, entra en meiosis, produciendo finalmente una espermátide haploide. La espermátide temprana parece tener la mayor parte de las características de cualquier otra célula somática, con la excepción de ser haploide, incluyendo un núcleo en el cual el DNA está asociado con histonas formando nucleosomas y que conserva su actividad

transcripcional. Durante el proceso llamado espermiogénesis, la espermátide temprana redonda, experimenta una metamorfosis complicada, dando origen a una célula morfológicamente muy diferente, el espermatozoide. Cada especie tiene una forma específica de espermatozoide (Pocia, 1986).

Entre muchos otros cambios, la espermiogénesis implica el desarrollo de un núcleo altamente condensado y el cese general de las actividades de replicación, transcripción y reparación del DNA. Esta condensación e inactividad bioquímica del DNA parecen ser acompañadas en muchas especies por la remoción del complemento de histonas del DNA, y su reemplazo por otras proteínas básicas, las protaminas (Cohn y Moldave, 1991). No en todas las especies de animales se realiza este reemplazamiento de las histonas del núcleo espermático, algunas especies retienen las histonas, los peces con espinas, como por ejemplo la carpa (Christensen y col, 1984) y los invertebrados como el erizo de mar (Puigdomenech y col, 1987) y los Holotúridos (Schulter, 1988).

Las especies que reemplazan completamente las histonas por protaminas en el núcleo de la gameta masculina incluyen a los pájaros (Mezquita, 1985; Oliva y Dixon, 1989); las truchas y otros peces salmónidos (Dixon y Smith, 1968; Marushige y Dixon, 1971; Dixon, 1972; Winkfein y col, 1985). En algunos mamíferos, como los humanos, la mayor parte de la organización núcleoosomal (85%) de las histonas, es reemplazada por un complejo de nucleoprotaminas, pero 15% permanece acomplejada con histonas (Gatewood y col, 1987). Algunos mamíferos como la rata, el ratón y el borrego inicialmente reemplazan la organización núcleoosomal por un juego de proteínas intermediarias (proteínas de transición), antes de que sea formado el complejo final de nucleoprotaminas (Loir y Lanneau, 1978; Balhorn y col, 1984; Heidaran y col, 1989).

PROTAMINAS.

Fueron descubiertas por Meischer, quién las encontró acopladas a las bases nitrogenadas de la "nucleína" del espermatozoide de salmón Rhine (salmo salar). Estudios subsecuentes de Kossel (1928) y Felix (1960), establecieron la naturaleza polipeptídica de las protaminas. Cohn y Moldave (1991), definieron a las protaminas como proteínas pequeñas que tienen en su composición de amino ácidos proporciones

muy elevadas de cisteína y arginina, las cuales pueden llegar a representar entre el 45 a 80 mol% y un contenido de serina más treonina de 10 a 25 mol%

Bloch, en 1969, las clasificó en:

TIPO I	Verdaderas protaminas. Pequeñas ricas en arginina.
TIPO II	Protaminas estables o protaminas queratinosas. Ricas en arginina, pero que también contienen cisteína.
TIPO III	Proteínas espermáticas intermedias. Contienen histidina y/o lisina, además de arginina
TIPO IV	Parecidas a histonas somáticas.
TIPO V	Proteínas no básicas detectadas en el núcleo de espermatozoides maduros de forma ameboidea.

Subirana, (1982), habla de otra clase de proteínas básicas a la que llama "histonas de espermatozoide", y las divide en 4 subclases:

- a).- Familia de histonas muy ricas en lisina H1, no se detectan cambios.
- b).- Con ligeros cambios en la familia de histonas H1.
- c).- Proteínas básicas específicas de espermatozoide.
- d).- Con cambios considerables de histonas H1 y H2b.

De acuerdo con la clasificación de Bloch (1969), en los mamíferos se presentan las protaminas de tipo II.

TIPO II Protaminas estables.

La característica esencial de las protaminas estables, también llamadas "queratinosas", (Bloch, 1969) es la presencia de 6 a 9 residuos de cisteína por mol, lo cual permite la formación de puentes inter e intra disulfuro en la molécula de protamina. Tales puentes covalentes imparten un grado adicional de estabilidad por la formación

de enlaces cruzados y por tanto confieren a la cromatina del núcleo del espermatozoide sus características de estabilidad.

Coelingh y col (1972), encuentran que la protamina de bovino, con un peso molecular de 6,200, está constituida por 47 amino-ácidos, con alanina como amino terminal y glutamina como carboxilo terminal. Contienen 24 residuos de arginina y 6 residuos intermedios de cisteína, 19 residuos de arginina que se encuentran en la parte central de la molécula. Estos autores proponen que la región media sea el primer sitio de unión con el DNA, mientras las regiones amino y carboxilo terminal podrían ser responsables de la interacción con las moléculas de las proteínas vecinas.

H₂N-Ala-Arg-Tyr-Arg-(Cys)₂-Leu-Thr-His-Ser-Gly-Ser-Arg-Cys-(Arg)₇-Cys-(Arg)₆-Phe-Gly-(Arg)₆-Val -Cys-Tyr-Thr-Val-Ile-Arg-Cys-Thr-Ar-Gln-COOH

Protamina de bovino (Coelingh, 1972)

En muchas especies de mamíferos, el núcleo de los espermatozoides contiene un sólo tipo de protamina P1, con una fuerte homología entre especies. Un segundo tipo de protamina P2, está presente en el núcleo de algunos mamíferos incluyendo el humano (McKay y col, 1986), el ratón (Bellvé y col, 1988) y el caballo (Bealiche y col, 1987).

PROTAMINA P1

También aislada en aves, muchas de estas moléculas tienen una secuencia tetrapeptídica en el extremo amino terminal Ala-Arg-Tyr-Arg (ARYR), a excepción del conejo (Ammer y Henschen, 1988), en el cual la alanina esta sustituida por valina en el primer residuo, sin embargo, este cambio no tiene mayor efecto en la estructura de la protamina. La secuencia ARYV es seguida por un motivo conservado Ser-Arg-Ser-Arg (SRSR), seguido por un grupo de cinco a siete argininas, en suma en esta región la posición 8, tiene serina o treonina, ambos son hidroxí-aminoácidos, polares y susceptibles de ser fosforilados.

La presencia de varias cisteínas en las protaminas de los mamíferos, fue propuesta como un mecanismo esencial para la estabilización del complejo de núcleoprotaminas, a través de la formación de enlaces disulfuro en el núcleo del espermatozoide (Loir y Lanneau, 1978; Balhorn, 1989). Sin embargo, la cisteína podría no estar involucrada en el proceso de condensación nuclear y sólo tomar parte en la estabilización final de la núcleoprotamina ya condensada.

PROTAMINA P2 EN MAMIFEROS.

Las protaminas P2 fueron primero secuenciadas en el espermatozoide humano (McKay y col, 1986) y en el del ratón (Bellvé y col, 1988). Característicamente este tipo de protaminas son sintetizadas como un precursor (Elsevier, 1982; Domenjoud y col, 1988; Yelick y col, 1987; Johnson y col, 1988; Hecht, 1989), y deben ser procesadas post-transcripcionalmente, dando origen al producto final.

Pirhonen y col, 1994, encuentran que la diferente localización de los residuos de fosfoserina en protamina P2 de humano y caballo indican, que éstas se unen al DNA o interaccionan con otras moléculas de protaminas. Gatewood y col (1990) y Bianchy y col (1992), demuestran que la protamina humana P2 puede ser una proteína semejante a las descritas como "dedos de zinc", conteniendo motivos descritos para factores reguladores de los sitios de transcripción; la protamina P2 podría así reemplazar los factores de transcripción y unirse selectivamente a sus sitios de unión, facilitando el cierre de la transcripción hacia el final de la espermatogénesis y quizá la estabilización de la cromatina de espermatozoide por zinc.

En el espermatozoide de ratón y del humano, la P2 comprende del 50 al 60% del total de las protaminas, pero no ha sido observada en proporción tan elevada en otros mamíferos, aunque existe un nivel bajo de RNAmP2 en la rata y en el cobayo (Hecht, 1989). El hecho de que la familia P2 no ha sido identificada en aves, hace tentador especular que en terminos de evolución aparecen y funcionan inicialmente las protaminas de tipo P1 y que la familia P2 aparece posteriormente como un tipo de moléculas de soporte en animales más evolucionados, para determinar la estructura nuclear junto con P1, aunque también se ha propuesto que su papel importante esté relacionado con la mayor compactación necesaria por el tamaño del núcleo mediante la

formación de enlaces cruzados debidos a su alta proporción de cisteína (Cohn y Moldave, 1991).

Una característica de las protaminas es que son fosforiladas rápidamente, solo un poco después de ser sintetizadas (Bode y col, 1983; Bode, 1984) , La carga negativa de los residuos fosforilados puede servir como punto clave para formar enlaces con otras protaminas y para la estabilización de las interacciones electrostáticas proteína-proteína que pueden ser realizados con los residuos de arginina cargados positivamente. Está claro que las protaminas se unen al DNA sin haber perdido los residuos fosforilados (Louie y Dixon, 1972). Este hecho ha conducido a la proposición de que la presencia de residuos de serina fosforilados confiere a la molécula de protamina una carga negativa que podría modular la interacción de las protaminas con el DNA (Cohn y Moldave, 1991), facilitando la formación de un complejo protamina-DNA (Wehling y col, 1976).

Las protaminas fosforiladas podrían localizarse junto a un nucleosoma, e iniciar el rompimiento de la estabilidad de los contactos histona-histona favoreciendo su liberación (Bode y col, 1977) para ser sustituidos por protaminas. Esta hipótesis puede correlacionarse con el fenómeno de hiperacetilación de las histonas, sobre todo de la H4, que se encuentra presente en todas las especies que reemplazan las histonas por protaminas, pero esta ausente en aquellas especies que retienen el complemento total de histonas en el núcleo del espermatozoide (Grimes y Henderson, 1983), Esta hipótesis sugiere que la acetilación de H4 podría servir para debilitar los contactos histona-DNA en el nucleosoma, exponiendo así los dominios de la cromatina a la desestabilización y a la sustitución de las histonas por las protaminas.

Marushige y Marushige (1978), concluyen que las protaminas son desfosforiladas extensivamente después de completar su asociación con el DNA, lo cual acontece probablemente antes de que el espermatozoide penetre al epidídimo. Pirhonen y col, 1994, aislan protaminas de eyaculados de humano HP1 y HP2, caballo St1y St2, toro, cerdo y borrego P1 y muestran por secuenciación de péptidos que las formas fosforiladas de estas protaminas estan presentes en todas las especies examinadas, lo que indica que el proceso de desfosforilación no se ha completado en los espermatozoides maduros y que una porción importante de los residuos de serina permanecen fosforilados, encontrando, además, que los aminoácidos hidroxilados que

se encuentran en los dobleces de la protamina P1 son los sitios mayormente fosforilados.

D'auria y col, 1993 encuentran que las protaminas se localizan tanto en el surco mayor como en el surco menor formados por la doble hélice del DNA, donde se acomplejan con los nucleótidos del DNA. Los exámenes realizados de las fracciones aisladas de cupleína demuestran que no exhibe ninguna diferencia neta de unión específica hacia bases púricas y pirimídicas de mononucleótidos.

NIVELES DE EMPAQUETAMIENTO DEL DNA DEL ESPERMATOZOIDE.

DOBLE HELICE.

Se han demostrado algunas diferencias entre el DNA somático y el espermático, como el largo de los telómeros, la carencia de hipermetilación, diferente contenido de G+C (Tabla 2) (Groundine y Conkin, 1985; Hernández-Pérez y Rosado, 1988; De Lange y col., 1990) y diferente proporción de secuencias de alta repetición (Hernández-Pérez y col, 1978).

COMPLEJO DNA-PROTAMINAS.

Este nivel de compactación es homólogo al de la estructura de la célula somática, pero es muy diferente en su estructura. Balhorn en 1982, propone un modelo de unión entre protaminas y DNA en el cual las protaminas se unen al ácido nucleico fijándose en el interior del surco menor de la doble espiral del DNA. Esta fijación se hace mediante la interacción electrostática de las cargas positivas de los residuos de arginina, y las cargas negativas del esqueleto fosfodiéster del DNA, transformando de esta manera a un polímero polaniónico en un polímero neutro.

	Espermatozoide		Leucocito		Timo
	DNA	Cromatina	DNA	Cromatina	
A260/A230	2.2 ± 0.19	1.7 ± 0.16	2.18 ± 0.21	1.41 ± 0.20	DNA
T _m (°C)	85.8 ± 0.5	89.1 ± 0.1	84 ± 0.30	86 ± 0.15	
Hipercromicidad (%)	40.6 ± 2.6	30.5 ± 2.9	35.5 ± 2.1	26.4 ± 5.6	
Punto isopícnico	1.697 ± 0.003		1.697 ^a		1.699
% G+C (T _m)	1.704 ± 2.0		36.5 ± 1.6		1.712
%G+C(PI)	37.7 ± 2.6		37.7 ^b		39.80
ADN satélite	44.8 ± 1.8		11.1 ± 1.0		53.06
	13.3 ± 1.2				12.50

Los resultados representan el valor promedio ± la desviación estándar de por lo menos cuatro experimentos.

^a Resultados de dos experimentos por lo que no se calculó la desviación estándar.

^b Los valores del punto isopícnico están expresados como g cm⁻³ y la determinación se hizo en un gradiente de CsCl neutro.

(T_m) Resultados calculados a partir de los valores de T_m.

(PI) Resultados calculados a partir de los valores del punto isopícnico.

FIBRA DE 10nm.

La unión DNA-protaminas, junto con las fuerzas de van der Waals, permiten a nivel molecular adquirir una estructura lineal "lado a lado". Se ha demostrado que tal estructuración no confiere al DNA ninguna clase de superenrollamiento (Risley y col., 1986; Ward y col., 1989; 1990).

Considerando que el DNA del espermatozoide no se replica, ni transcribe RNA, se puede concluir que las características funcionales del superenrollamiento presente en las células somáticas es temporalmente sacrificado con el fin de conferir protección al DNA a través de un estado densamente empaquetado.

Estudios de microscopía electrónica en Rata y Conejo (Koehler y col., 1983), han demostrado que la cromatina esta presente formando una serie de láminas, paralelas al eje del núcleo. En espermatozoide de grillo (Kierszenbaum y Tres, 1978; Suzuki y Wakabayashi, 1988), se ha demostrado que la cromatina del espermatozoide esta enrollada en formación lineal a lo largo de la longitud de los núcleos. Experimentos de dicroísmo circular (Spinski y Wagner, 1977), y el uso de luz polarizada (Liovlant, 1983) en espermatozoide de caballo muestran que la cromatina del espermatozoide de los mamíferos placentarios se comporta como un líquido colestérico, en el que los filamentos del DNA, son empaquetados en formación lineal en planos paralelos. Todos estos datos son acordes con el modelo de Balhorn.

EQUIVALENTE AL SOLENOIDE.

Se ha publicado muy poca evidencia a cerca de la estructura espermática equivalente al solenoide, en 1993 Ward, propone un modelo basado en las siguientes evidencias:

Estudios de tinción inmunohistoquímica e hibridización *in situ* (Moens y Peerlman, 1989), han mostrado que los centrómeros se localizan en un foco discreto dentro del núcleo del espermatozoide. Resultados similares han sido

obtenidos (Guttenbach y Schmid, 1990; Wyrobek y col., 1990) mediante estudios de hibridización *in situ* para cromosoma específicos. Estos datos sugieren la idea de que las asas de DNA, están plegadas o en espiral dentro de un foco localizado en el núcleo del espermatozoide.

Allen y col., en 1990, observaron núcleos de espermatozoides de ratón y toro en espermatozoides intactos, así como la cromatina de núcleos parcialmente descondensados, encontrando que el DNA no está organizado como un largo legajo lineal de fibras. En cambio el DNA del espermatozoide parece estar enrollado en una compleja madeja de tamaño algo variable, pero suficiente para contener el equivalente a un replicón de DNA. Koehler y col., en 1983, notaron un arreglo similar en el DNA del espermatozoide de rata, el DNA dentro del nódulo o cuenta tiene un diámetro de 13 a 25 nm. Estos nódulos son fuertemente empaquetados dentro del núcleo del espermatozoide, en un arreglo tridimensional, que no fué descrito con precisión en su oportunidad.

En 1991 Allen y col., al observar por microscopía electrónica núcleos espermáticos totalmente hidratados, precisan que el volumen del núcleo del espermatozoide, es más de dos veces superior al estimado con anterioridad por Pogany y col., en 1981, así como que la cromatina del espermatozoide *in vivo*, está altamente hidratada, este volumen es consistente con la organización nodular.

MODELO DE DONA PARA EL ASA DEL DNA DEL ESPERMATOZOIDE.

Criterios para el modelo:

De acuerdo con los datos discutidos anteriormente, es posible construir un modelo para el DNA del espermatozoide, entre la unión de las protaminas y la organización en dominios de asa, los criterios para el modelo propuesto por Ward, 1993, son dos:

El primero es que cualquier modelo propuesto debe ser obviamente consistente con todos los datos disponibles acerca del tamaño y forma del núcleo del espermatozoide y con la estructura ribonucleoproteica de su cromatina.

El segundo criterio es sugerido por el hecho de que el espermatozoide deriva de células que contienen histonas, y la organización del DNA del espermatozoide debe ser consistente con la necesidades de empaquetamiento requeridas por ser derivado de una célula somática.

PRIMER PASO: Reemplazo de histonas por protaminas.

El principio básico del modelo son los nódulos de 60 nm, cada uno representa un dominio de asa del DNA. La localización focal de un solo dominio de asa es consistente con los datos de hibridización *in situ* reportados por algunos autores; es sabido que el DNA se une a las protaminas en una forma linear lado a lado, la manera más eficiente de empaquetar el DNA de un dominio de asa es en círculos anchos, concéntricos y apilados, como un resorte.

En una vuelta de la configuración de solenoide, existen 13 superenrollamientos de DNA, dos por cada uno de los seis nucleosomas y uno para el solenoide mismo. La primer propuesta fué que las protaminas reemplazan a las histonas, los doce superenrollamientos, son removidos quedando el DNA más linear, como originalmente se sugirió. Este criterio requiere algunos cambios, no es adecuado porque 1,200 pares de bases de DNA en un solenoide superenrollado formarían un círculo de 129 nm, dos veces el tamaño observado para la estructura redonda. De otra manera si solo fueran removidos 11 o 12 superenrollamientos del nucleosoma, el DNA podría enrollarse en dos círculos espirales para cada vuelta de la cromatina en el solenoide. Los dos círculos espirales del DNA acomplejado con protaminas, podrían unirse uno con otro por fuerzas de van der Waals.

Este primer paso del modelo predice que el DNA del espermatozoide, tiene una ligera superhélice negativa con un grado de $2/13$, ó 15% del DNA unido a histonas, lo que coincide con lo reportado por Risley y col., en 1986 y por Ward y col., en 1989, aunque debe reconocerse que los métodos usados no son lo suficientemente sensibles para distinguir entre la ausencia de superhélice, con un decremento del 85% (Ward,

1993). Tal ajuste en la regulación de la densidad de superenrollamiento del DNA durante la espermatogénesis, requiere de la presencia de una topoisomerasa. Morce-Gaudio y Risley en 1991, demostraron que la topoisomerasa II, esta presente en todos los tipos celulares que forman la secuencia de la espermatogénesis y la espermiogénesis, excepto en el espermatozoide mismo.

Finalmente el reemplazo focal de las histonas por protaminas, predicho por este modelo, es consistente con el primer modelo de Risley y col., (1986), quienes sugieren que los dominios de superenrollamiento pueden servir como unidades estructurales de transición durante la espermatogénesis.

SEGUNDO PASO: Condensación del dominio de asa del DNA.

El siguiente paso del modelo es la formación de la estructura circular vista por "microscopía atómica de fuerza" (Allen y col, 1990) en la cromatina de espermatozoide. El modelo propuesto para cada una de estas estructuras representa un dominio de asa de DNA colapsado. La comparación de la configuración de solenoide y del núcleo del espermatozoide, esta representada en la (figura2), para un dominio de asa de 47 kilopares de bases, promedio reportado para espermatozoide de Hamster por Ward y col., en 1989. Cada 39 vueltas del solenoide (cada vuelta del solenoide es igual a 13 superenrollamientos de DNA), en el par de dominios de asa, eventualmente llegan a ser dos círculos espirales de DNA, cuando se reemplazan las histonas por las protaminas. En la configuración de dona estos círculos de DNA unido a protaminas de cada brazo del asa, son colapsados en un nódulo de forma de dona con un diámetro de alrededor de 65 nm.

Este modelo también produce cambios concomitantes con la relación entre el DNA y la matriz nuclear. Primero algunos puntos durante la espermatogénesis (no se sabe aun si antes, después o durante el reemplazo por las protaminas), el número de sitios de anclaje para el DNA, puede aumentar o disminuir el tamaño del dominio de asa (Fawcett, 1970; Ward y col., 1989;). La matriz nuclear puede participar en el acomodamiento de la cromatina condensada, esta predicción es consistente con la condensación del núcleo del espermatozoide durante la espermatogénesis.

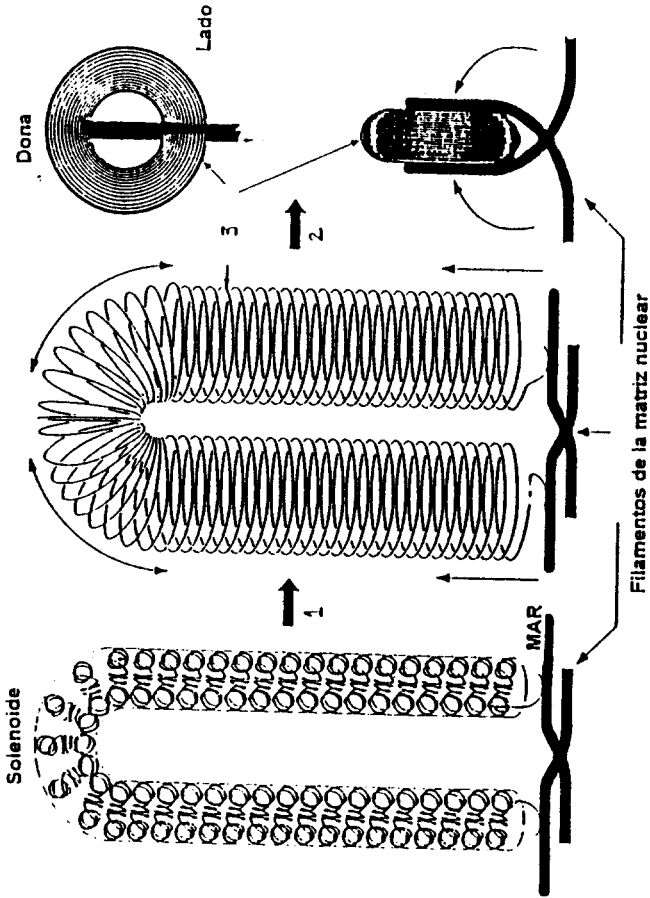


Fig. 2 Modelo equivalente al solenoide en el asa de DNA de espermatozoide. El modelo esta hecho a escala para un asa de DNA de 47 Kbp de largo, las estructuras comparativas están dibujadas a escala. En la estructura de dona, los circulos de DNA unido a protaminas son colapsados dentro de una estructura de forma toroidal haciendo 72 circulos de DNA con un diámetro promedio de 65 nm. El esquema del centro es únicamente didáctico, y no se cree que sea real, la función intermedia ocurre durante la espermiogénesis. La transición debe ser más compleja, involucrando proteínas de transición que no son consideradas en este modelo.

- 1.- Reemplazo de histonas por protaminas.
- 2.- Condensación de la cromatina.
- 3.- Complejos DNA-protaminas.

De acuerdo con el modelo, estos nódulos no son perfectamente cilíndricos, ni están dispuestos de manera regular. En realidad, el modelo predice que los círculos de DNA-protaminas están colapsados de una manera desordenada, formando una estructura tridimensional con una forma parecida a una dona. Esta dona tiene un diámetro exterior de 65 nm, un diámetro interior de 32.5 nm y una altura de 25 nm.

Tal estructura ha sido demostrada experimentalmente por Hud y col., en 1993, usando DNA purificado de Timo de Ternera y reasociándolo *in vitro* con protaminas extraídas de espermatozoides de Toro, Hamster y Ratón, y protaminas de Salmón comerciales. Al observar los productos de la reasociación concluyen que la cromatina del espermatozoide está empaquetada en una unidad fundamental de aproximadamente 90 angstroms de diámetro externo, 200 angstroms de ancho y un diámetro interno de 150 angstroms, a la que denominan "toroide"

Otros investigadores han propuesto "toroides", de tamaño similar cuando el DNA es condensado por varios cationes (Gosule y Schellman, 1978; Arscott y col., 1990). Dentro de estos estudios ha sido estimado que cada "toroide", contiene aproximadamente 60 Kilopares de bases de DNA (Arscott y col., 1990). Esto nos lleva a preguntarnos cómo la molécula de DNA del largo de un cromosoma entero, puede ser empaquetada en "toroides", cuando cada uno contiene 60 Kbp de DNA. Mientras un solo "toroide", podría representar la unidad elemental de empaquetamiento del DNA, la condensación genómica podría ser completada por la compactación local del DNA dentro de los "toroides", con regiones no enrolladas de DNA, actuando como eslabones entre vecinos. Considerando los cálculos del contenido del DNA de estos "toroides" y el tamaño del genoma haploide de los mamíferos, cada núcleo de espermatozoide contiene alrededor de 50,000 "toroides" fuertemente empaquetados.

El modelo de dona permite al DNA del espermatozoide estar altamente empaquetado, comparado con la relativamente abierta configuración del DNA de la célula somática, en el mismo nivel de organización y al mismo tiempo le permite estar organizado en una discreta unidad funcional, el dominio de asa.(fig.3).

REASOCIACION.

Los experimentos de reasociación de DNA e histonas y DNA y protaminas (Hud y col., 1993), han sido utilizados como una herramienta, que permite, establecer, la forma en que se asocia el DNA con las proteínas nucleares.

Camerini-Otero y col., en 1976; Sollner-Webb y col., en 1976, mostraron que la cromatina reasociada con una porción de histonas seleccionadas, muestra un patrón de digestión muy similar a la cromatina nativa. Germond y col., (1976), reasociaron mini-cromosomas de SV-40, obteniendo estructuras muy similares a los mini-cromosomas nativos. Laskey y col., (1977), usando un extracto libre de células de *Xenopus leavis*, reasociaron nucleosomas con DNA de SV-40, sin emplear diálisis salina.

Tatchell y van Holde en 1977, reasocian histonas con DNA purificado, a través de una diálisis salina sucesiva, en la que se disminuye la concentración de NaCl desde 2M hasta 0.5M y Tris 10mM - EDTA 0.7mM pH 7.2 y compararon velocidades de sedimentación, contenido de histonas, parámetros de dicroísmo circular, desnaturalización térmica, patrón de digestión con nucleasa micrococcica, DNAsal y tripsina, concluyendo que todos estos parámetros son similares a los de la cromatina nativa.

Los estudios de reasociación, no solo han permitido estudiar la forma en que se ensamblan los nucleosomas, también han permitido, conocer por ejemplo la energía libre de unión entre histonas y diferentes secuencias de DNA (Drew, 1991), el daño que causa la luz ultravioleta en la superficie de las histonas (Suquet y Smerdon, 1993), el reensamble de genes (Stemmer, 1994), entre otras cosas.

En este trabajo se ha tratado de demostrar si las características diferenciales descritas en el DNA obtenido de células espermáticas modifican sustancialmente la cinética de reasociación del DNA con histonas somáticas, o si esta cinética proporciona la reagregación del DNA en estructuras nucleosomales semejantes a las obtenidas por la reasocian de DNA somático con histonas somáticas. Nuestros resultados podrían constituir un paso importante en la comprensión de los mecanismos que regulan la notable estructuración del núcleo del espermatozoide ((Hernández-Pérez y col, 1978; Groundine y Conkin, 1985; Hernández-Pérez y Rosado, 1988; De Lange y col., 1990).

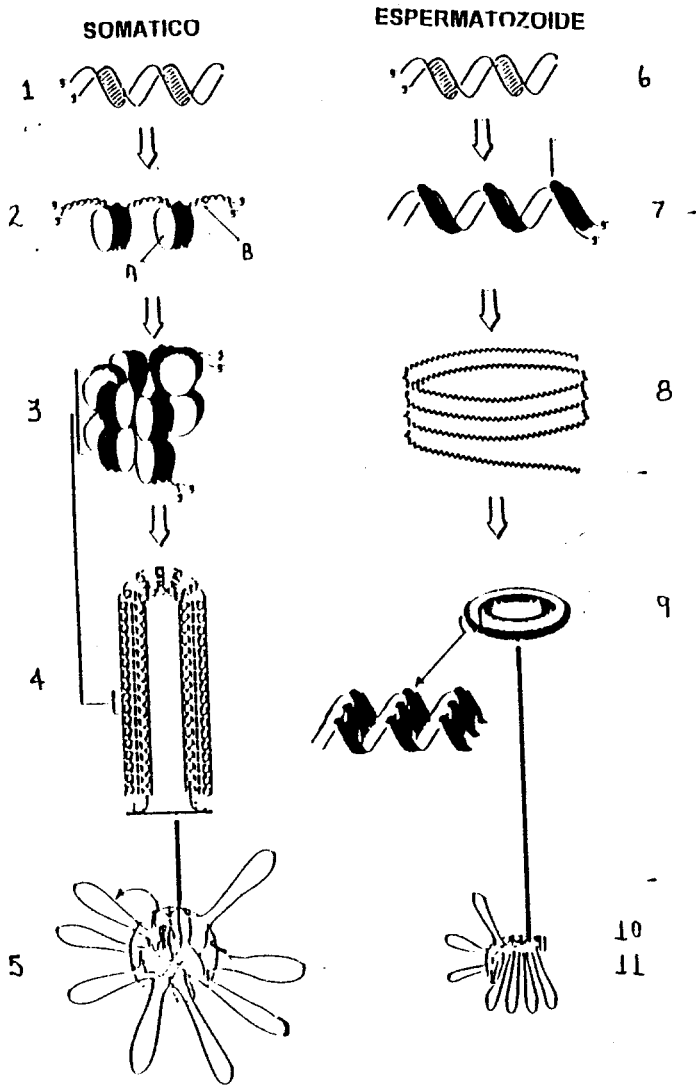


Fig 3 Comparación del enrollamiento somático y espermático del DNA.

- 1.- DNA
- 2.- Collar de perlas integrado por nucleosomas (un octámero de histonas 200 pares de DNA)
- 3.- Solenoide (6 nucleosomas por vuelta)
- 4.- Solenoide \approx cada 600 lp se anclan a la Matriz
- 5.- Los genes activos se asocian a la Matriz.

- 6.- DNA espermático.
- 7.- Las protaminas se unen al DNA
- 8.- La unión DNA-protaminas forman círculos concéntricos.
- 9.- Los círculos se colapsan en una dona
- 10.- El DNA espermático se une a la Matriz.
- 11.- Las asas son más pequeñas.

Adaptada de Ward, 1993.

HIPOTESIS

La estructuración de la cromatina del espermatozoide de mamíferos esta determinada, fundamentalmente, por las propiedades estructurales del DNA asociadas a la presencia de una matriz nuclear característica de este tipo de células.

OBJETIVOS

- Inducir la formación de nucleosomas por la incubación de DNA y proteínas histónicas del Hígado de Bovino.

- Estudiar si los cambios en la estructura del DNA del espermatozoide, previamente mencionados, interfieren o no en la reasociación de nucleosomas somáticos al incubar dicho DNA con histonas hepáticas.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

E Q U I P O

222274

POLYTRON (Tekmar tr - 10)

HOMOGENIZADOR (Caframo Wiaron Ont Tipo RZR1 - 64)

CENTRIFUGA (Beckman Damon IEC B - 20A)

ULTRACENTRIFUGA (Sorvall Pro 80)

VORTEX (Lab - Line, Instruments, Inc. No. Cat. 1290)

BALANZA GRANATARIA (Ohaus 4510)

BALANZA ANALITICA (METTLER, mod. b - 5)

ESPECTROFOTOMETRO (Beckman DU 650)

CONCENTRADOR (Hoefer Scientific Instruments No. Cat. 867112)

ANALIZADOR DE IMAGENES (Alpha Innotech Co. ID 1000 Digital)

CAMARA DE ELECTROFORESIS HORIZONTAL (Gibco BRL Horizont. 11 - 14)

CASSETTE DE DIALISIS, JEINGAS DE 5 cc, AGUJA DE 18 x IB Y FLOTADORES
(Pierce No. Cat 66425)

PERFORADOR DE GRADIENTES

ULTRACONGELADOR REVCO (Ulti 786 - 7 - D - 12)

MICROSCOPIO (Zeiss)

POTENCIOMETRO (Beckman Expandomatic SS - 2)

R E A C T I V O S

Todos los reactivos utilizados fueron de la mejor calidad posible, generalmente de grado analítico o mejor, y fueron obtenidos a través de Sigma Chemical Co., J. T. Baker S.A. de C. V, Merck Chem Co., Bio - Rad Laboratories, ICN Flow., Boehringer.

PARA EXTRACCION DE NUCLEOS.

SOLUCION ISOTONICA DE NaCl

AMORTIGUADOR I	Sacarosa	0.32 M
	EDTA	0.1 mM
	EGTA	1 mM
	Espermidina	1 mM
	Tris - HCl	10 mM
	* DTT	1 mM
	* Triton x-100	0.1 %

todo ello ajustado a pH 8.0

AMORTIGUADOR II	Sacarosa	2.0 M
	EDTA	0.1 mM
	EGTA	1 mM
	Espermidina	1 mM
	Tris - HCl	10 mM
	* DTT	1 mM
	* Triton x-100	0.1 %

todo ello ajustado a pH 8.0

AMORTIGUADOR III	EDTA	0.1 mM
	EGTA	1 mM
	Espermidina	1 mM
	Tris - HCl	10 mM
	* DTT	1 mM
	* Triton x-100	0.1 %

todo ello ajustado a pH 8.0

AMORTIGUADOR DE ALMACENAJE

Glicerol	25 % En agua destilada.
* DTT	5 mM

SOLUCIONES CONCENTRADAS

• DTT	1.0 M
* Triton x-100	10 %

* El DTT y el Triton se agregan de las soluciones concentradas en el momento de utilizar el amortiguador.

EDTA Acido etilendiaminotetracético.

EGTA Acido tetracético N, N, N', N', - etilen glicol-bis (β -aminoetil eter)

Tris Tris (hidroximetil) amino metano.

DTT dl-Dithiothreitol

OBTENCION DE NUCLEOS (Tabla 5)

La muestra se corta del Hígado de un animal recién sacrificado, se limpia un poco de la sangre que contiene inyectando una solución isotónica de cloruro de sodio en diferentes puntos de la muestra. El tejido así perfundido, se envuelve en papel aluminio y se transporta al laboratorio dentro de un termo que contiene hielo con sal. Al llegar al laboratorio se corta en partes de aproximadamente 2.5 g que se conservan en el Revco a -70°C , hasta su uso.

La muestra se saca del Revco, se corta con un bisturí en pequeñaz piezas, se vacía a tubos de ensaye de 2.2 x 29 cm, agregando el volumen adecuado de amortiguador I, se le dan 30 golpes en velocidad 40 con el polytron, se filtra la muestra a través de gasa y se colecta en el homogenizador.

Por medio de la observación microscópica del número de células enteras, se estandarizó el proceso de homogenización utilizando un sistema vidrio-teflón con una concentración de tejido al 10% (peso/volumen) preparado adicionando el volumen calculado de amortiguador III y dando 10 golpes a velocidad 5.

En un tubo de polialómero se colocan 20 ml de amortiguador I y sobre éstos se estratifican, con ayuda de una pipeta, 15 ml de cada muestra de homogenizado, empleando cuatro tubos por muestra. Se centrifuga el sistema a $770 \times 20'$ a 4°C .

Los botones obtenidos se resuspenden con 1 ml de amortiguador I, depositando todos los de una muestra en un solo tubo, quedando un volumen de 4 ml por muestra se agregaron 4 ml, de amortiguador II, para que la concentración final de sacarosa sea 1.16 M, se mezcla con vórtex. En un tubo de nitrato de celulosa se colocan 4 ml, de amortiguador II y sobre estos se estratificaron 8 ml, de cada muestra, centrifugar a $30,000 \times 60'$ a 4°C .

Se decanta la fase líquida, se limpian las paredes con gasa y un poco de amortiguador III. Los precipitados obtenidos se resuspenden en 2 ml del amortiguador de almacenaje. Se cuenta el número de núcleos obtenidos utilizando una pipeta para contener globulos blancos: se introduce muestra hasta la marca de 0.5, con amortiguador de almacenaje se lleva a 11, se agita 30" y se coloca la muestra en la camara de Neubauer. La muestra se guarda en el Revco a -70°C.

REACTIVOS PARA EXTRACCION DE DNA DE HIGADO

SDS Lauril sulfato de sodio.
Tris-HCl 0.15M - EDTA 0.015M pH 8.0
Acetato de sodio 3M pH 7.0
NaCl 5M
Etanol
Cloroformo
Cloroformo - Alcohol isoamílico 9:1
NaCl 2M
10 X SSC Citrato de sodio 0.015M - NaCl 0.15M pH 7.0

RNAse 1,080 µg/ml

RIBONUCLEASA (Sigma Chemical Co.)

Type X - A De Páncreas de Bovino, libre de proteasa.
Actividad Aprox. 100 Kunitz por mg de Proteína.
5.4 mg / ml

Bajo condiciones estériles, se colocan en un tubo con tapa de rosca, 400 µl de solución de RNAse utilizando una pipeta automática con una punta estéril y se le adicionan 1,600 µl de 1 x SSC. Se calienta la mezcla durante 10' a 80°C (para eliminar toda posible contaminación con DNAsas), se enfría en hielo, se preparan las alícuotas adecuadas para no reutilizar una misma muestra más de una vez y se guardan en refrigeración.

OBTENCION DE NUCLEOS

(William F Marzluff and Ru Chih C Huang, 1987)

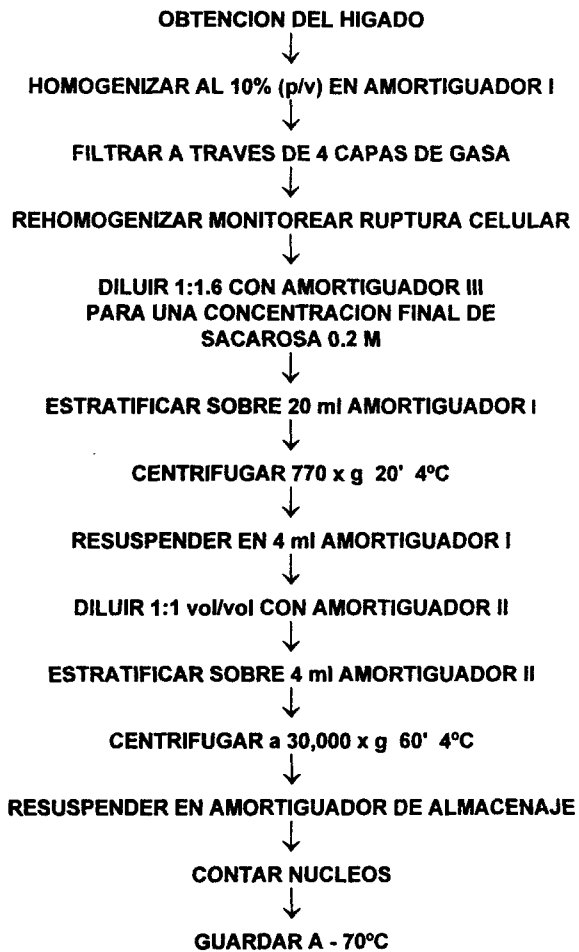


TABLA 5

FENOL SATURADO CON 1 X SSC.

Se tomo una alícuota de fenol destilado recientemente y conservado bajo congelación, se descongela en un baño de agua caliente y se le va agregando 1 x SSC, poco a poco agitando entre cada adición, hasta que se forma una capa superior de SSC. Se conserva en refrigeración. Para utilizarlo se toma la cantidad requerida de la parte inferior del tubo. Aunque se conserve en refrigeración no debe utilizarse durante periodos largos de tiempo.

OBTENCION DE DNA HIGADO BOVINO (Tabla 6)

Los núcleos se retiran del Revco y se descongelan a la temperatura del cuarto. La suspensión se centrifuga a 3,090 xg, durante 30' a 4°C, se resuspenden los núcleos en el amortiguador, se les agrega suficiente SDS en polvo hasta tener una concentración final del 2%, se agita con Vórtex y se agitan 30' a temperatura ambiente en un agitador mecánico. La suspensión viscosa se calienta en baño maría 10' a 60 °C y se enfría en hielo. De una solución NaCl 5M se adiciona lo necesario para llegar a una concentración 1M de la sal, agregar además 1 volumen de la mezcla Cloroformo-Isoamílico 9:1. Se tapa el tubo y se coloca en un agitador de columpio y se agita durante 15' en el cuarto frío. Al concluir se centrifuga la suspensión a 4.430 xg durante 15' a 4°C. Con una pipeta de 5 ml de orificio amplio y romo se extrae lenta y cuidadosamente la fase líquida superior que se coloca en un tubo de polialómero. Se repite el proceso hasta que se elimina la interfase de proteínas.

Se lleva a temperatura ambiente una alícuota de RNAsa (2,160 µg/2 ml) y se agrega a la solución obtenida en el paso anterior la cantidad suficiente para tener una concentración final de 10 µg/ml, se mezcla por inversión y se incuba en un temp-block a 37°C durante 2 horas. Parar la reacción agregando 1/10 volumen de Fenol saturado en 1 x SSC, 1 volumen de Cloroformo - Isoamílico 9:1 y 1 volumen de Acetato de sodio 3 M pH7. Se repite el proceso de desproteínización hasta la eliminación de la interfase de proteínas.

Con una pipeta de 5 ml de orificio amplio y romo se extrajo la capa superior y se deposito en un vaso de precipitados, se adicionan 2 volúmenes de etanol frío, el DNA que se precipita se enrolla lenta y cuidadosamente en una pipeta pasteur cerrada, se enjuaga cuidadosamente en etanol frío y en 1 x ssc.

Se coloca en 2 ml de NaCl 2M y se agita, en el cuarto frío, hasta que se disuelve completamente utilizando un agitador magnetico.

Se realiza un espectro, haciendo una dilución 1:50 con 1 x SSC, se lee en un rango de 200 a 300 nm, se toman las lecturas a 280, 260 y 230 nm, para calcular la pureza del DNA y su concentración, considerando un DNA puro cuando la relación 260/280 es de 2 y la de 260/230 es de 1.9, el resto de la muestra se guarda a 4°C con tres gotas de clorofomo.

REACTIVOS PARA OBTENER DNA DE ESPERMATOZOIDE.

KREBS - HEPES.

NaCl 0.15 M - KCl 6 mM - KH_2PO_4 1.5 mM - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.8 mM - HEPES (N-(2-Hidroxietil) piperazina N' - (2- ácido etanosulfónico)) 10Mm Ph 7.4

DTT Ditiotreitól

CTAB Cetil trimetil amonio.

Tris 0.1M pH8.0

SDS Lauril sulfato de sodio

NaCl 5 M

Cloroformo - Alcohol isoamilico9:1

Etanol

NaCl 2 m

10 x ssc Citrato de sodio0.015 M - NaCl 0.15 M pH7

Citrato de sodio 2.5% - Formaldehído 1%

OBTENCION DE DNA DE HIGADO BOVINO

(Marmur, 1961)

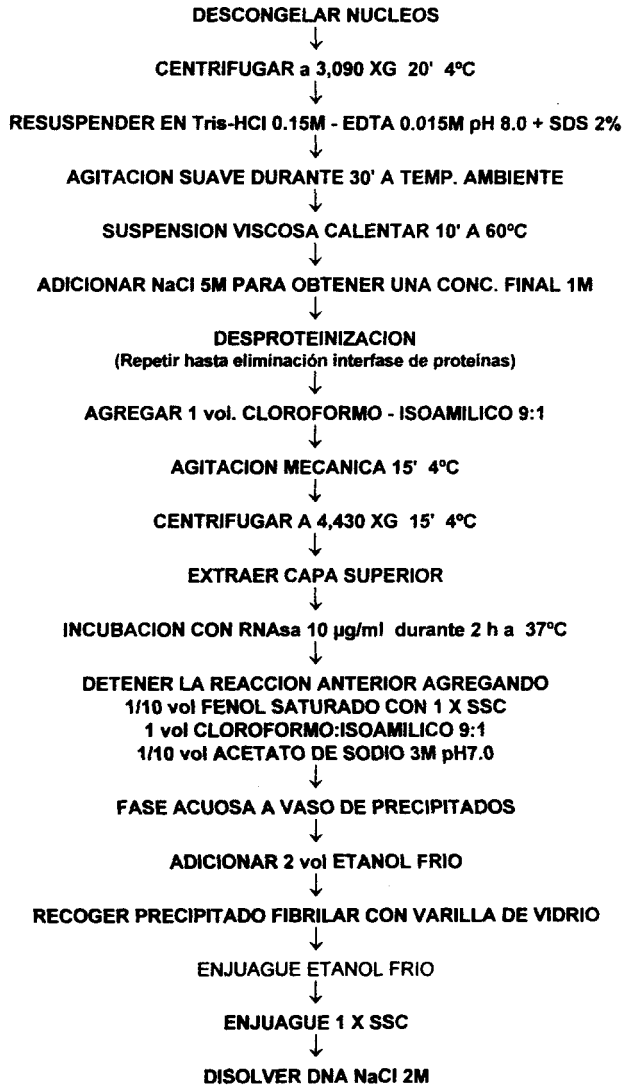


TABLA 6

OBTENCION DE DNA DE ESPERMATOZOIDE BOVINO (TABLA 7)

Se colecta el eyaculado de un Toro Holstein por vagina artificial, se vacía a un tubo cónico graduado de polipropileno y se transporta al laboratorio en recipiente de unicel con refrigerante. Al llegar al laboratorio, se deposita una gota en un portaobjetos y se observa al microscopio. Se decanta la fase líquida y se resuspende el boton en 1 volumen de Krebs - Hepes, con ayuda de una pipeta pasteur cerrada y Vórtex. En una pipeta de globulos blancos se coloca muestra hasta 0.5 y con una solución de Citrato de Sodio y Formaldehído (inmoviliza los Espermatozoides) se lleva el volumen a 11, se agita 30" en el agitador de pipetas y se deposita la muestra en la cámara de Neubauer, se cuenta en el microscopio con el objetivo de 10 X. Se ajusta con Krebs - Hepes a 2×10^8 cel/ml

Se agrega el DTT en polvo (5mg/ml), se coloca el tubo en un agitador de columpio y se agita 30' a temperatura ambiente, al concluir el tiempo de agitación se agrega el CTAB (2.5mg/ml) y se repite el proceso. Centrifugar a 1,110 xg 10'. El precipitado se resuspende con ayuda de un Vórtex en Tris 0.1 M pH8, se repite el proceso tres veces.

Se resuspende el boton final de la misma manera, se agrega SDS en polvo para obtener una concentración final del 1%, se coloca la suspensión en un agitador de columpio y se agita 15' a temperatura ambiente, se mantiene la muestra a 60 °C, durante 10' en baño maría y se enfría en hielo.

Se agrega la cantidad necesaria de una solución 5M de NaCl, para obtener una concentración final de 1M de la sal, se desproteiniza de la misma manera que para DNA de Hígado. Después de la última maniobra de desproteínización, la fase líquida se deposita en un vaso de precipitados, se agrega etanol frío, de manera muy suave dejándolo deslizar por las paredes mientras se agita lentamente. El DNA que se precipita en forma fibrilar se enrolla en una pipeta Pasteur, con el extremo cerrado, de manera lenta y cuidadosa. Se enjuaga con etanol frío, 1 x ssc y se deposita en 2 ml de NaCl 2M, se agita suavemente en el cuarto frío con un agitador magnético, hasta que se disuelve por completo.

Se realiza un espectro de igual manera que para DNA de Hígado y se guarda a 4°C, agregándole tres gotas de cloroformo como preservador.

OBTENCION DE DNA DE ESPERMATOZOIDE BOVINO

(Hernández-Pérez y col, 1978)

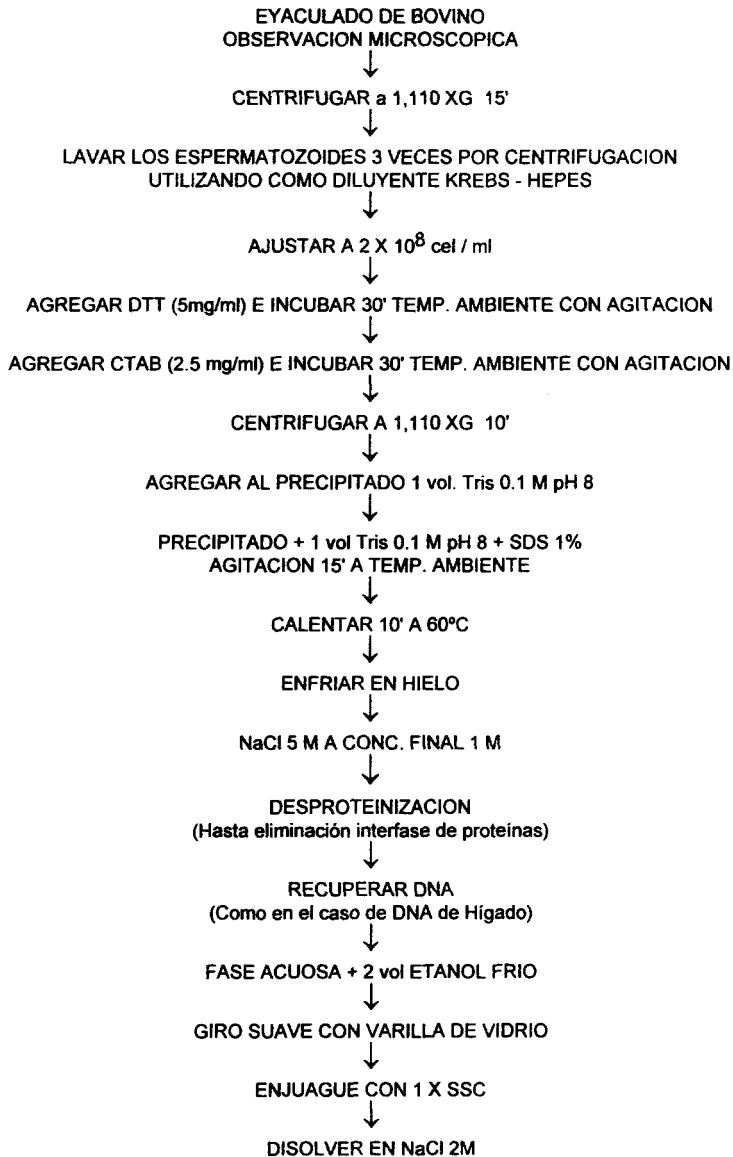


TABLA 7

REACTIVOS PARA EXTRACCION DE CROMATINA.

EDTA 0.025 M

NaCl 0.075 M, pH 8

NaHCO₃ 0.05 M

NaCl 0.10 M, pH8

AGUA ESTERIL

222274

OBTENCION DE CROMATINA (Tabla 8)

Se sacan los núcleos del Revco y se descongelan a temperatura ambiente. La suspensión nuclear se centrifuga a 3,090 xg durante 30' a 4°C y el precipitado que contiene los núcleos se resuspende en suficiente volumen de amortiguador EDTA 0.025M - NaCl 0.075M, pH 8 para obtener una concentración de 1×10^5 núcleos/ml. Se ponen 10 ml de la suspensión en un vaso de precipitados, se agitan durante 30' en el cuarto frío y se recuperan nuevamente por centrifugación a 3,090 xg 30' a 4 °C. Este proceso se repite una vez más.

Se resuspende el botón en NaHCO₃ 0.05M NaCl 0.10M pH 8, se agita y centrifuga de la misma manera antes descrita. Se resuspende en 2 ml, de agua estéril y se homogeniza utilizando un Potter-Elvehjem de vidrio con émbolo de teflón. El homogenizado se centrifuga a 9,990 xg durante 30' a 4°C. Se decanta la fase líquida en un tubo estéril, el botón se resuspende en 2 ml, de agua estéril y se rehomoniza ligeramente de la misma manera.

Se realiza un espectro, de igual manera que para el DNA de Hígado de bovino, la relación 260/280 deberá ser igual a 1.7 y la relación 260/230 a 1.3, lo que indica que tenemos cromatina con una pureza adecuada.

OBTENCION DE CROMATINA A PARTIR DE NUCLEOS DE HIGADO BOVINO

(Commerford y col., 1963)

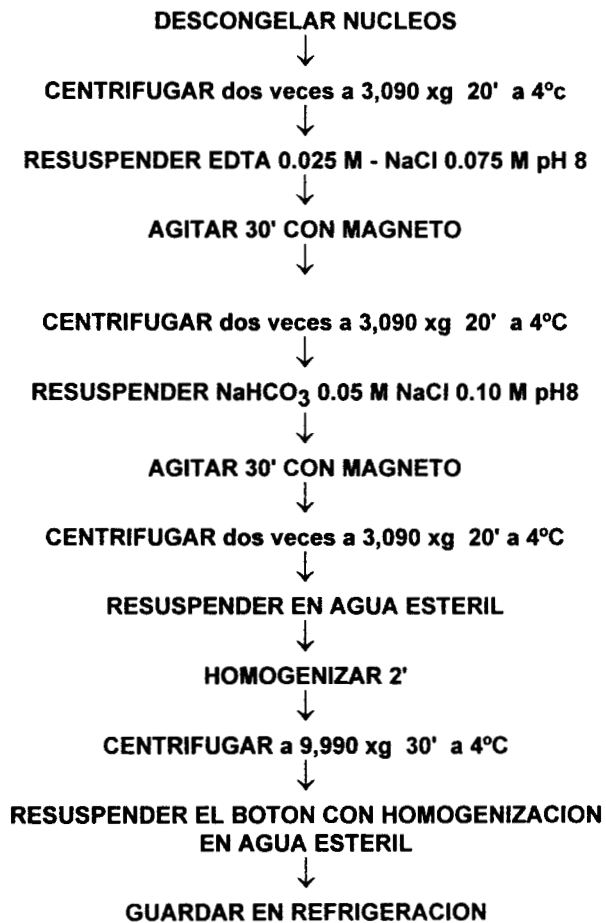


TABLA 8

REACTIVOS PARA REASOCIACION.

AMORTIGUADOR DE REASOCIACION. 1 X EDTA 1 mM - Azida de sodio 0.2% - Nonident P-40 0.1% - Tris 10 mM pH 7.4

SOLUCIONES DE CLORURO DE SODIO

NaCl 2 M NaCl 1.5 M NaCl 1 M NaCl 0.75 M NaCl 0.5 M

Estas soluciones de Cloruro de sodio se prepararon en amortiguador de reasociación.

DESOXIRIBONUCLEASA (Sigma Chemical Co. No. Cat. d 4263) De Páncreas de Bovino 2,000 Unidades Kunitz, 40,000 unidades / mg. Se pesa 1 mg., de DNAsa I (2,500 unidades), se disuelve en amortiguador de digestión y se afora a 10 ml, esta solución se separó en alícuotas que se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su uso.

NUCLEASA MICROCOCCICA (Sigma Chemical Co. No. Cat. N-5386). De *Staphylococcus aureus* 88 unidades / mg de sólido. 135 unidades / mg de proteína. La solución se preparó adicionando agua estéril de tal manera que la concentración final fuera de 1 unidad / μ l, se hicieron alícuotas y se guardaron a 4°C, hasta su uso.

AMORTIGUADOR DE DIGESTION 2 X

Para DNAsa I: Tris - HCl 80 mM - $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ - $CaCl_2$ 4mM pH 7.5

Para Nucleasa Micrococcica: Tris - HCl 10mM - $CaCl_2$ 10mM pH 8.8

EDTA 0.1 M y 0.5 M, pH 8

TBE 5X: Tris base 54 g - Acido Bórico 27.5 g - EDTA 0.5M pH 8 20 ml

AMORTIGUADOR DE CARGA: Azul de bromofenol 2.5 mg - Glicerol 1 ml - Xilen cyanol 2.5 mg. Aforar a 10 ml

AGAROSA AI 2% en TBE 0.5X

MARCADOR DE PESO MOLECULAR DNA Ladder 100 bp. (Gibco BRL No. Cat.15628-019)

Se toman 5 µg (5µl), con una punta estéril y se vacían a un microtubo ependorf estéril, se le agregan 95 µl de Amortiguador de carga, se hacen alícuotas y se guardan en refrigeración hasta su uso.

SACAROSA LIBRE DE RNAsas Y DNAsas (Sigma Chemical Co. No. Cat. S-0389). Soluciones al 5% y al 24.6 % Preparadas en Amortiguador de reasociación.

RESOCIACION (Tabla 9)

Se colocan en un cassette de diálisis, con una jeringa y una aguja de 18 x 1B, 500 µl de DNA y 500 µl de Histonas. Las concentraciones utilizadas deben ser iguales a la relación que existe normalmente en una muestra de cromatina.

El cassette con la muestra se coloca en un flotador y se deposita en un vaso de precipitados que contiene 300 ml de la solución inicial de NaCl, se coloca un magneto, se tapa con parafilm y se pone en agitación en el cuarto frío. Después de 4 horas de diálisis, se vacía la solución y se colocan 300 ml de la siguiente solución. El proceso se repite de la misma manera hasta concluir todas las diálisis.

Al concluir con la última diálisis, la muestra se extrae del cassette con la misma jeringa y aguja con las que se introdujo y se coloca en un tubo Ependorf estéril. La muestra se divide en tres alícuotas.

Una de las alícuotas se utiliza para la digestión con DNAsa I y otra para la digestión con Nucleasa Micrococcica, a cada alícuota se le adiciona un volumen igual de amortiguador de digestión 2 x, de acuerdo con la enzima con la que se va a digerir.

Para DNAsa I Se emplea 1 unidad de la enzima para 2µg de DNA. La actividad enzimática se permite durante 30' a 4°C. La digestión se detiene mediante la adición de EDTA 20 mM.

Para N. Micrococcica se emplean 2.5 unidades para 132 µg de DNA incubando a 4°C durante 30'. La reacción se detiene con EDTA 20mM.

Al concluir las digestiones, las muestras se concentraron, hasta obtener un volumen que permitiera tener una concentración adecuada para la electroforesis.

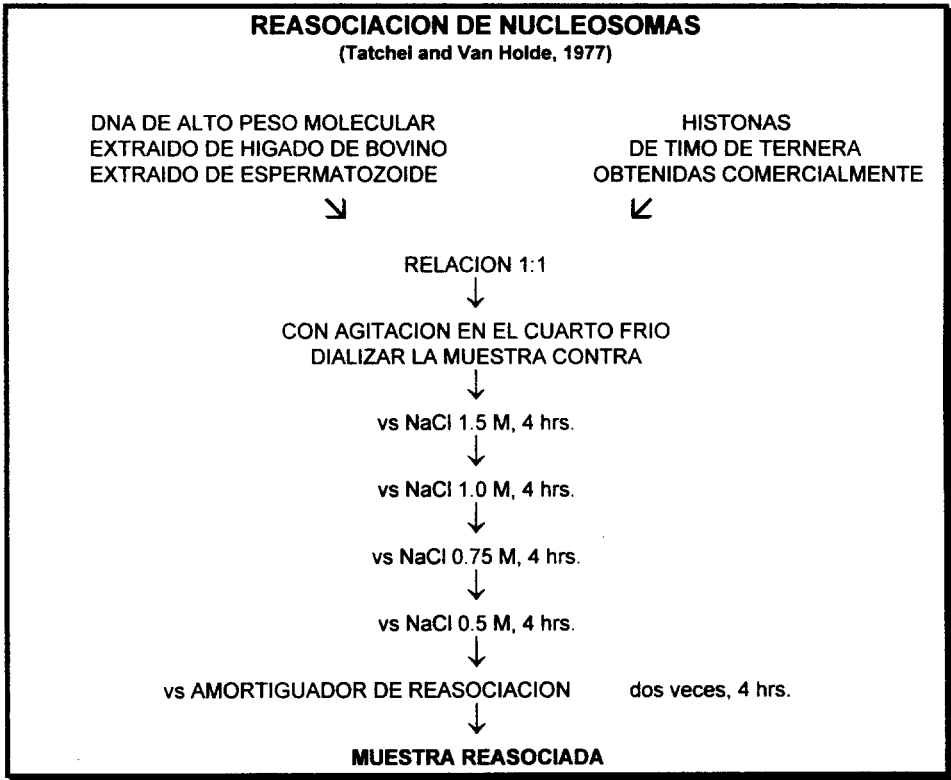


TABLA 9 A

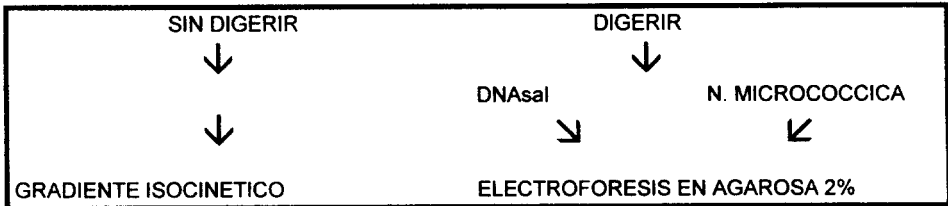


TABLA 9 B

ELECTROFORESIS

(Fletcher y col., 1994)

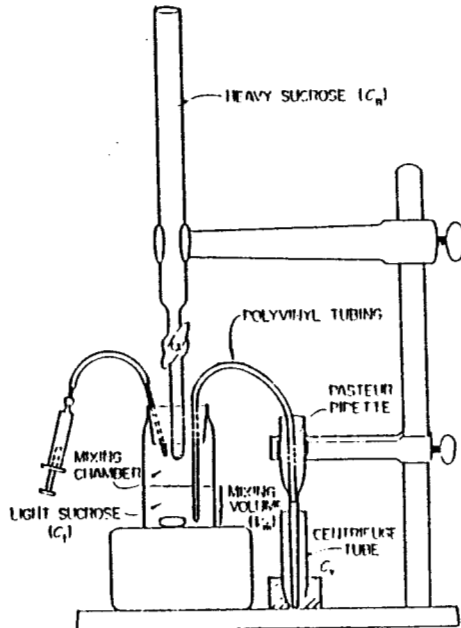
Se prepara agarosa 2 % en amortiguador TBE 0.5x, cuando llega a una temperatura de 55°C, se vacía a la cámara. Una vez que ha solidificado, se coloca el amortiguador, hasta que cubra el gel perfectamente, se retira el peine.

A las muestras se les adicionan algunos microlitros de amortiguador de carga con bromuro de etidio y se depositan con ayuda de una pipeta automática en el gel. Se corre durante 16 horas a 5 mA. Al concluir la corrida, se observa el gel en un analizador de imágenes y se le toma una impresión.

Después se tiñe el gel con solución para teñir proteínas, durante 30' y se destiñe durante aproximadamente 4 horas. Se le toma una fotografía. Para comparar la ubicación del DÑA con la de las proteínas.

GRADIENTE ISOCINETICO

(Mc Carty Jr y col., 1974)



En la cámara de mezclado se colocan 6 ml de sacarosa al 5% y se agita con un magneto, es conveniente poner una marca del nivel. En la bureta se colocan 20 ml de sacarosa 24.6%. Se cierra la cámara, se hecha a andar el agitador, se inyecta aire hasta que la sacarosa llega a la última curva de salida hacia el tubo de centrifuga, se deja de inyectar aire y se abre la bureta, una vez que han bajado 5 ml de la bureta se cierra y se extrae cuidadosamente la pipeta pasteur de él tubo de centrifuga que contiene el gradiente formado.

Con una pipeta automática y extremo cuidado se estratifica la muestra sobre el gradiente, centrifugando 40' a 35,000 rpm en un rotor sw-65, realizando tres corridas.

- a).- Muestras sin digerir: Cromatina, Reasociado de Hígado y Reasociado de Espermatozoide.
- b).- Muestras digeridas con DNAsa I, en el orden anterior.
- c).- Muestras digeridas con Nucleasa Micrococcica, en el orden anterior.

Al concluir la centrifugación los gradientes se perforaron por la parte inferior y se colectaron fracciones de 500µl.

Cada fracción se leyó a 280, 260 y 230 nm para localizar la fracción donde quedaron los mononucleosomas y sus oligómeros.

RESULTADOS

DNA HIGADO DE RATA

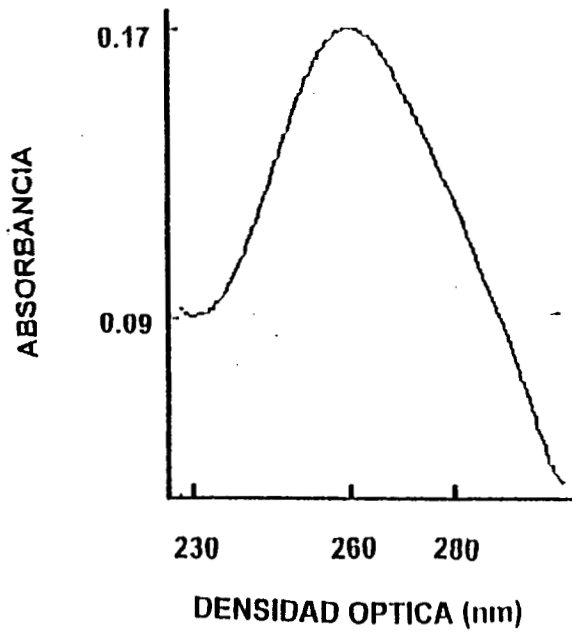


Fig. 4 Espectro de absorción de DNA de Hígado de Rata, extraído por el Método de Marmur, 1961. Representativo de 3 experimentos. Relaciones. $260/280 = 2.02$, $260/230 = 2.01$.

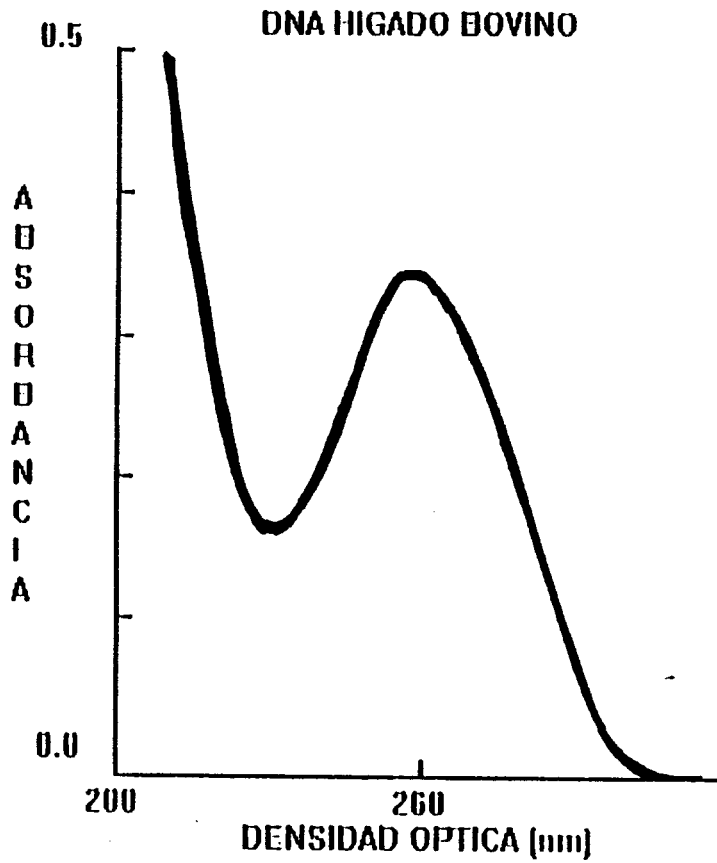


Fig. 5 Espectro de absorción de DNA de Hígado Bovino, extraído por el Método de Marmur, 1961. Representativo de 13 experimentos. Relaciones: $260/280 = 1.98$
 $260/230 = 2.08$.

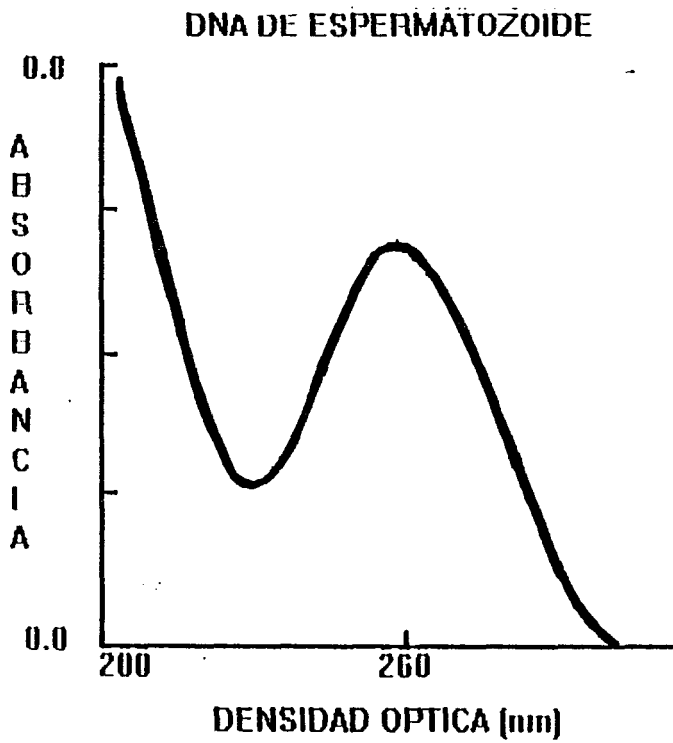


Fig. 6 Espectro de absorción de DNA espermático, extraído por el método de Hernández-Pérez y col., 1978. representativo de 7 experimentos. Relaciones $260/280=2.0$ $260/230=2.50$

CROMATINA DE HIGADO DE RATA

222274

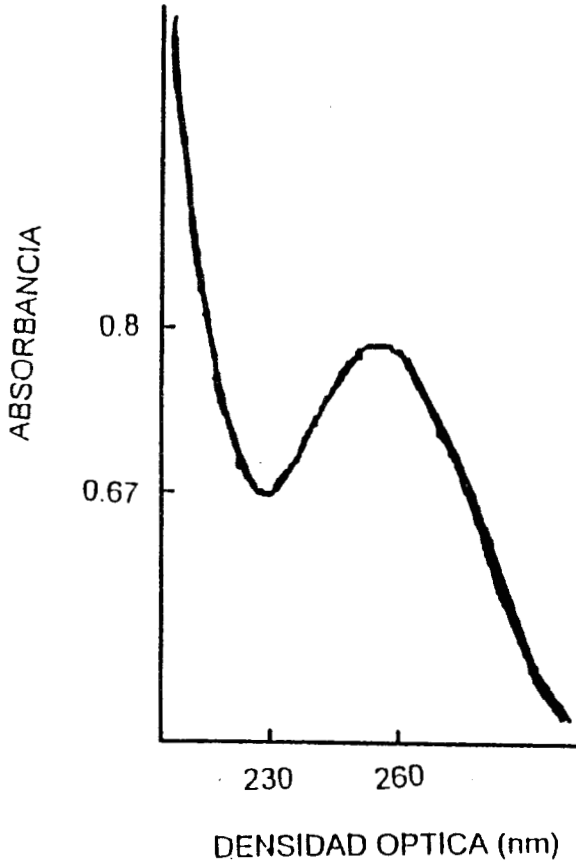


Fig. 7 Espectro de absorción de Cromatina de Rata extraída por el Método de Marushige y Bonner, 1966. Representativo de 10 experimentos. Relaciones: $260/280=1.72$ $260/230=1.20$

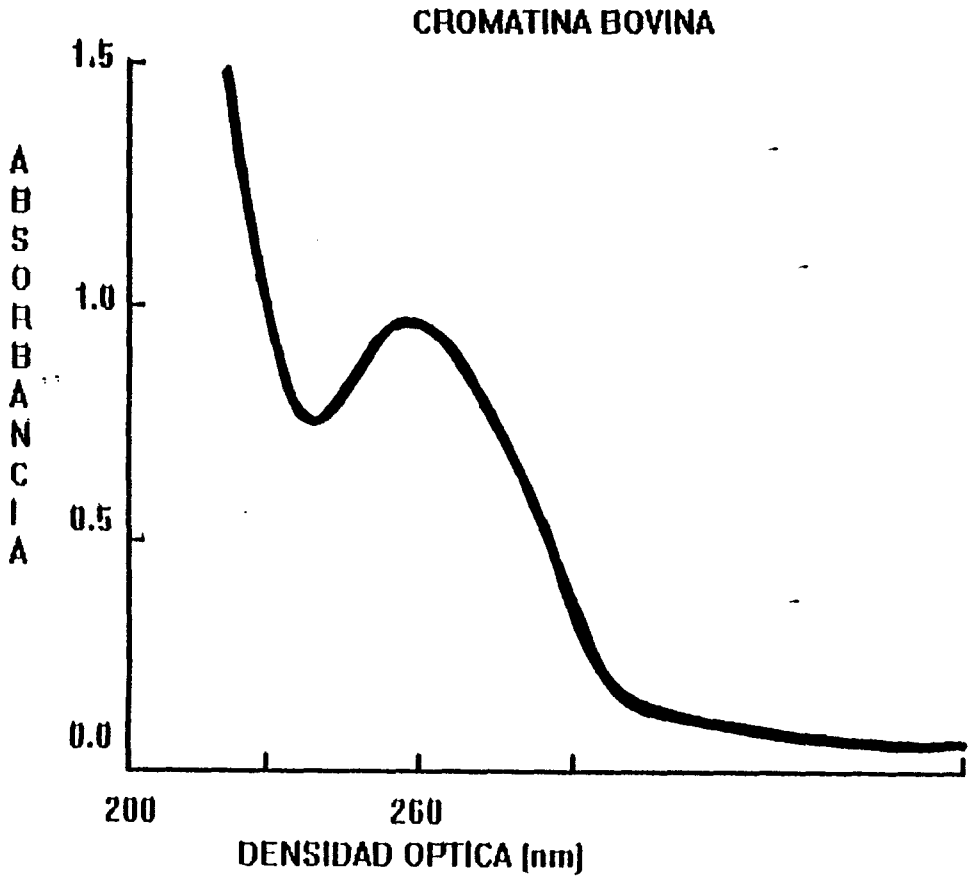


Fig. 8 Espectro de absorción de cromatina de Hígado Bovino, extraído por el método de Commerford y col., 1963. Representativo de 5 experimentos. Relaciones: $260/280=1.74$
 $260/230=1.40$.

PROMEDIOS Y DESVIACION ESTANDAR

MUESTRA	No. de muestras	260 / 280	260 / 230
DNA Hígado de Rata	3	1.84 ± 0.18	1.97 ± 0.25
DNA Hígado de Bovino	13	1.96 ± 0.12	2.22 ± 0.23
DNA de Espermatozoide	7	1.88 ± 0.07	2.22 ± 0.25

Tabla 3 Medias y desviaciones estándar de las muestras de DNA.

MUESTRA	No. de muestras	260/280	260/230
Cromatina Hígado de Rata	10	1.65 ± 0.06	1.15 ± 0.04
Cromatina Hígado Bovino	5	1.68 ± 0.07	1.31 ± 0.07

Tabla 4 Medias y desviaciones estándar de las muestras de cromatina.



Fig. 9 electroforésis en Agarosa 1.2% de los productos de digestión de núcleos de Hígado Bovino con 40u de DNAsal, 30" a 37°C.

No. de Carril	Tiempo de Digestión
1	1' 30"
2	30"
3	1' 30" Control sin enzima
4	DNA Ladder 100 bp
5	30 "
6	1'
7	30" Control sin enzima

No. de Carril	Tiempo de Digestión
8	DNA Ladder 100 bp
9	1' 30"
10	30"
11	30" Control sin enzima
12	30 "
13	1'
14	1' Control sin enzima

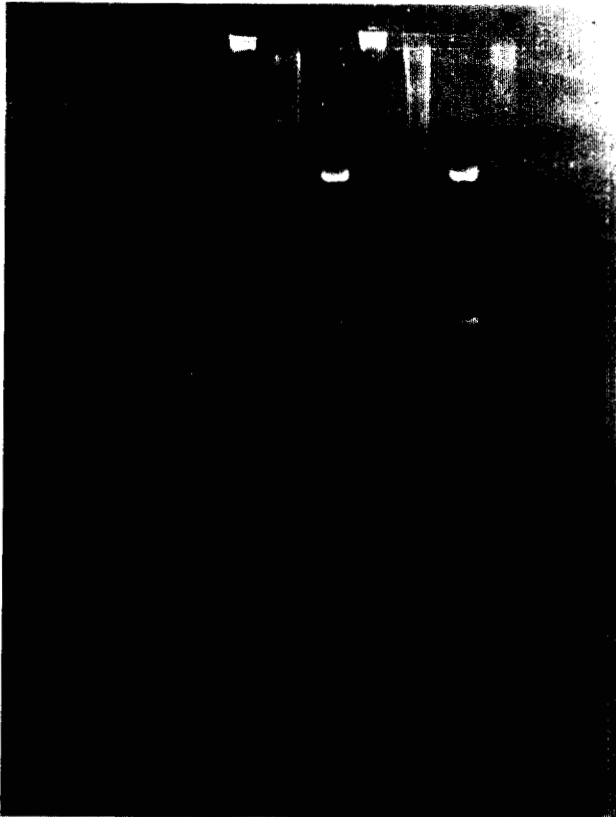


Fig. 10 Electroforésis en Agarosa 1.2% de los productos de Reasociación de DNA de Hígado Bovino con Histonas comerciales, con 24 u de DNAsa I 2' 37°C.

No. de Carril	Muestra
1	Digerida
2	Sin digerir
3	DNA Ladder 100 bp
4	Sin digerir
5	Digerida
6	Ladder 100 bp
7	Digerida

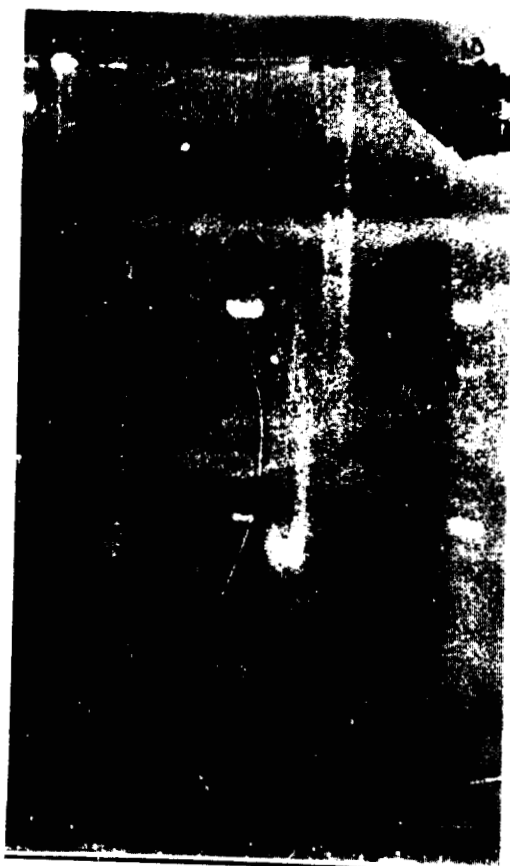


Fig.11 Electroforésis en Agarosa 1.2% de los productos de digestión de la reasociación de DNA de Hígado Bovino con Histonas Comerciales. Digestión con 7u de DNAsal 30" a 37°C.

No. de carril	Muestra
1	Cromatina sin digerir
2	Cromatina Digerida
3	Reasociación sin digerir
4	Reasociación digerida
5	DNA Ladder 100 bp

No. de Carril	Muestra
6	Cromatina digerida
7	Cromatina sin digerir
8	Reasociación sin digerir
9	Reasociación digerida
10	DNA Ladder 100 bp

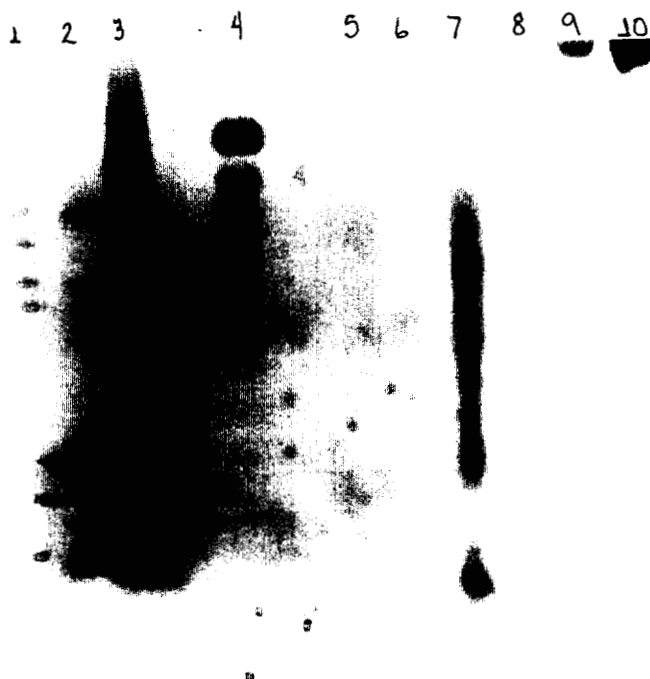


Fig. 12 Electroforésis en Agarosa 2% de los productos de digestión de DNA de Hígado ovino y DNA de espermatozoide Bovino reasociados con Histonas comerciales. Digestión con DNAsal 30' 4°C. Con Nucleasa Micrococcica 30' 4°C.

No. de Carril	Muestra
1	DNA Hígado DNAsal
2	Dna epz DNAsa I
3	Cromatina DNAsal
4	DNA Ladder 100 bp
5	DNA Hígado N.M.
6	Dna epz N.M.

No. de Carril	Muestra
7	Cromatina N.M.
8	DNA Ladder 100 bp
9	DNA Hígado sin digerir
10	DNA epz sin digerir
11	Cromatina sin digerir

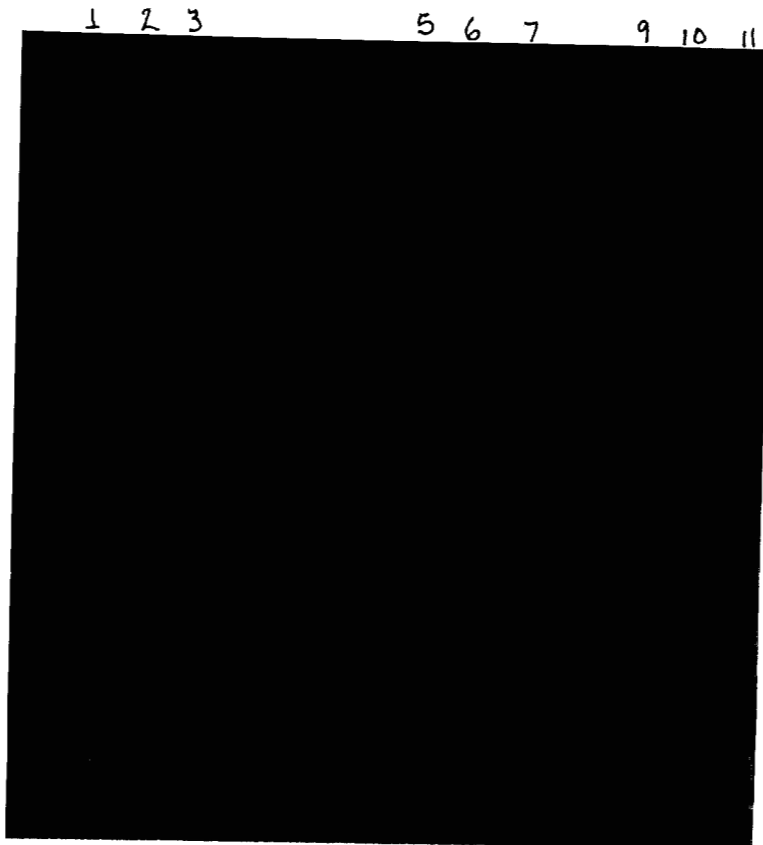
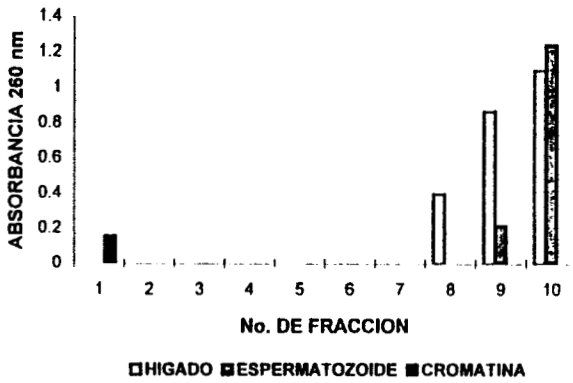


Fig. 13 Electroforésis en Agarosa 2% de los productos de digestión de DNA de Hígado bovino y DNA de espermatozoide Bovino reasociados con Histonas comerciales. Digestión con DNAsal 30' 4°C. Con Nucleasa Micrococcica 30' 4°C. TINCION PARA PROTEINAS.

No. de Carril	Muestra
1	DNA Hígado DNAsal
2	Dna epz DNAsa I
3	Cromatina DNAsal
4	DNA Ladder 100 bp
5	DNA Hígado N.M.
6	Dna epz N.M.

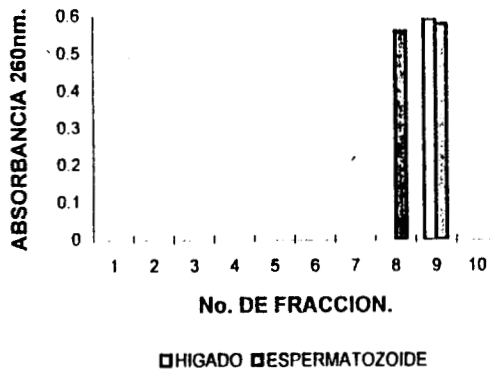
No. de Carril	Muestra
7	Cromatina N.M.
8	DNA Ladder 100 bp
9	DNA Hígado sin digerir
10	DNA epz sin digerir
11	Cromatina sin digerir

DIGERIDOS CON DNAsa I



GRAFICA 1 Gradiente isocinético de DNA de Hígado y Espermatozoide Bovinos reasociados con Histonas comerciales y Cromatina como control

DIGERIDOS CON NUCLEASA M.



GRAFICA 2 Gradiente isocinético de DNA de Hígado y Espermatozoide Bovinos, reasociados con Histonas comerciales.

RESULTADOS

Para la obtención de cromatina de Rata se empleó el método de Marushige y Bonner, 1966, al que se debió adicionar triton X-100, para lograr obtener las relaciones que estos autores reportan para la cromatina, que son $260/280 = 1.7$ y $260/230=1.3$, en nuestras manos la relación $260/280$ fué de 1.65 ± 0.06 , coincidiendo con la de los autores, sin embargo la relación $260/230$ fué de 1.15 ± 0.04

Para la obtención de la cromatina de Hígado bovino, no fue posible utilizar el método de homogenización utilizando un homogenizador vidrio-teflón, por lo que se recurrió a picar la muestra finamente con una hoja de bisturí y posteriormente homogenizar en un polytron. La fracción nuclear se obtuvo mediante la utilización del método propuesto por Marzluff y Huang (1987). Para la obtención de la cromatina se utilizó el método de Marushige y Bonner (1966) modificado, requiriéndose repetir tres veces la homogenización, agitación y centrifugación finales y el método de Commernford y col, (1963) también modificado, sustituyendo la centrifugación por elutriación por centrifugación normal, recuperándose la cromatina en el precipitado. La cromatina así obtenida proporcionó un espectro de absorción que coincide con el que reportan Marushige y Bonner: $260/280 = 1.68 \pm 0.07$ y $260/230 = 1.31 \pm 0.07$.

Marmur en 1961, reporta que un valor de aproximadamente 2 para la relación $260/230$, en el espectro ultravioleta de una muestra de DNA, debe ser considerada como un indicativo de la adecuada pureza de la muestra, considerando este dato, encontramos que para el DNA obtenido de Hígado de Rata, por este método, dicha relación fué de 1.97 ± 0.25 , para DNA de Hígado Bovino 2.22 ± 0.23 y para DNA de espermatozoide de 2.22 ± 0.25 .

Para el caso de los gradientes isocinéticos, la cromatina presento el problema de que su estado es muy viscoso y se deposita por completo en el fondo del gradiente lo que dificulta la perforación y el goteo del mismo, por esta razón los resultados se deben considerar poco adecuados y no serán considerados.

En los experimentos de centrifugación isocinética después de la reasociación de los dos tipos de DNA con histonas obtenidas de manera comercial se obtuvieron los siguientes resultados, la muestra de nucleosomas reconstituídos con DNA de Hígado y

digerida con DNAsa I, muestra un claro fraccionamiento, ya que la concentración se desplaza claramente a las últimas fracciones (Gráfica1). En el caso del espermatozoide, el desplazamiento es claro hacia la fracción 10 indicando digestión de la muestra. Sin embargo, es necesario mencionar que el patrón isocinético es consistentemente diferente cuando se utilizan nucleosomas reconstituídos con DNA de espermatozoide. En lo que respecta a la digestión con Nucleasa Micrococcica, en el Hígado la muestra queda totalmente concentrada en la fracción novena después de la digestión, indicando que toda la muestra fué digerida generando productos del mismo tamaño, sin embargo, para el caso del espermatozoide la muestra fué digerida, dando productos de dos tamaños (Gráfica 2).

Los resultados de las electroforésis, nos muestran que para el primer experimento de reasociación los productos de la digestión muestran tamaños entre los 2,072 bp y los 1,500 bp. En el segundo experimento, los tamaños de los productos van desde los 2,072 bp, hasta aproximadamente los 200 bp. Para el tercer experimento el DNA de Hígado y espermatozoide digeridos con DNAsal muestran tamaños de los 2,072 bp, hasta aproximadamente 200 bp, los digeridos con Nucleasa Micrococcica aparentemente presentan tamaños de entre 600 bp y 200 bp, las muestras sin digerir presentan tamaños muy por arriba de los 2,072 bp.

Al compara la figura 12, que presenta tinción con bromuro de etidio (para DNA), con la figura 13 que es el mismo gel de la figura 12 pero teñido para proteínas, vemos claramente que las dos tinciones se sobreponen lo que nos indica por un lado que la reasociación se llevo a cabo lo que coincide con lo reportado por Fletcher y col, (1994). Los resultados de los experimentos utilizando electroforesis nos indican que ambos tipos de DNA tanto el somático como el espermático al parecer se reasocian con las histonas obtenidas comercialmente de una manera similar. aunado a esto, apesar de una diferencia en la proporción de bandas formadas, los patrones de digestión nos permiten suponer que la reasociación fué de tipo nucleosomal.

DISCUSION

La cromatina, el material genético de los eucariontes, constituye un ensamble molecular dinámico que cambia su composición y conformación, para ser empleada en diferentes estados de la actividad génica como la transcripción y la replicación. La evidencia actual sugiere que la conducta dinámica de la cromatina tiene un importante papel funcional en la modulación de la actividad fisiológica de la célula dependiente de la información genética. Esta capacidad de cambio depende en gran medida de las propiedades intrínsecas del arreglo estructural de la cromatina en las células somáticas, considerándose que el arreglo nucleosomal proporciona todas las características de rearreglo dinámico para asegurar un funcionamiento celular normal (Hansen y Wolffe, 1992).

La cromatina somática ha sido estudiada, a través de métodos tales como microscopía electrónica, difracción de rayos x, dicroísmo circular, criofractura, así como con el empleo de métodos moleculares y bioquímicos, entre estos últimos la descondensación de la cromatina ha permitido demostrar que las interacciones termodinámicas entre el DNA y las proteínas, debidas al contenido de residuos iónicos tanto del DNA como de las histonas, son grandemente influenciadas por otros iones presentes en el medio (cationes y aniones) (Shiffman y col., 1978). La adición de contraiones causa la desionización parcial de la cromatina y del DNA, ocasionando una aparente reducción de la viscosidad y un significativo incremento en el coeficiente de sedimentación. La unión de cationes Na^+ o Mg^{++} , tanto al DNA libre como al DNA unido a histonas es tan fuerte que es capaz de inducir cambios en la estructura de la cromatina, así mismo se sabe que la cromatina se hace insoluble en NaCl 0.1M y en presencia de MgCl_2 3 - 4 mM (Li, 1975). La cromatina en una solución de cloruro de sodio 0.6 M, consiste de nucleosomas cada uno de los cuales contiene alrededor de 140 pares de bases y un DNA espaciador de 60 pares de bases, en los que H1 y las proteínas no histónicas se pierden (Staynov, 1976).

El conocimiento y comprensión de la estructura nucleosomal ha permitido, acceder a los niveles superiores de empaquetamiento de las células somáticas y comprender el mecanismo de estructuración molecular, lanzando a los investigadores en la búsqueda de la comprensión de la influencia y participación o regulación de los

procesos nucleares en la conformación de la cromatina o de ésta en ellos. Sin embargo en esta búsqueda la cromatina del espermatozoide representa un caso único.

Uno de los problemas más importantes en la biología de la reproducción de los organismos superiores, se refiere a la falta de información sobre la manera como son estructurados el núcleo y la cromatina del espermatozoide. La espermatogénesis es un proceso morfogénico complicado durante el cual la espermátide, a través de una serie intrincada de modificaciones morfo-bioquímicas, da origen al espermatozoide. Entre estos cambios destacan las modificaciones que experimenta el núcleo, el cuál de esférico se transforma en un cuerpo pequeño, aplanado con una forma más o menos característica de cada especie. De la misma manera, el complejo funcional orgánico donde reside la información genética de la célula, cambia su estructura química, de modo que las proteínas histónicas de la célula son sustituidas por una nueva clase de proteínas básicas ricas en arginina y cisteína, que son características de las células germinales masculinas, las protaminas, más tarde durante la espermiogénesis, la cromatina lleva a cabo una reorganización y condensación, que la deja incapaz de sintetizar RNA o DNA y sorprendentemente resistente a la digestión enzimática.

Tomando como sustento la evidencia de que existen diferencias importantes entre la composición del DNA obtenido de células somáticas y el DNA obtenido del espermatozoide (Tabla 2), y el hecho de que a pesar de realizar una búsqueda bibliográfica exhaustiva, nos fué imposible encontrar un experimento en el que se haya tratado de realizar la reasociación de DNA espermático con histonas somáticas, decidimos presentar la hipótesis de que la interacción de estos dos tipos de DNA con histonas obtenidas de un tejido somático, debería realizarse siguiendo una cinética diferente y tal vez proporcionando como resultado final una estructuración no nucleosomal, o bien una estructura nucleosomal con proporciones diferentes entre sus constituyentes. lo que nos impide tener un punto de comparación. Para rechazar, o comprobar esta hipótesis decidimos proceder a experimentos de reconstitución de nucleosomas (DNA de Hígado + Histonas y DNA de Espermatozoide + Histonas), en un sistema de diálisis continua tal como quedó definido un poco más adelante.

Varios estudios bioquímicos han sido dirigidos a estudiar las condiciones en las cuales es posible inducir, a partir de sus componentes, el reensamble de la estructura nucleosomal. Estos experimentos de reasociación *in vitro* de nucleosomas, han

permitido proponer que el proceso de reensamble del DNA con las histonas, se puede realizar tanto por un proceso pasivo como por un proceso activo, requiriéndose en ambos casos la presencia de Mg^{++} .

Uno de los sistemas más empleados para la reconstitución de los nucleosomas consiste en la mezcla de concentraciones adecuadas de todas las histonas que forma el corazón del nucleosoma (H2a, H2b, H3 y H4), con DNA de alto peso molecular, disueltos originalmente en una solución de NaCl 2M, seguido por la disminución secuencial de esta alta concentración salina por medio de diálisis sucesivas en amortiguador de baja fuerza iónica, durante un período de 24 hrs. En estas condiciones se ha visto que la re-estructuración del nucleosoma puede seguirse en forma gradual.

- 1o. Inicialmente. cuando la concentración de NaCl disminuye hasta ser 1M, se forman los tetrámeros $(H3 + H4)_2$.
- 2o. A una concentración de cloruro de sodio de 0.8M, ya se han empezado a formar una parte de los complejos de H2a + H2b, con los tetrámeros $(H3 + H4)_2$, finalmente
- 3o. A fuerzas iónicas inferiores a 1 mM de cloruro de sodio, la reconstitución de la cromatina se concluye con la formación de oligonucleosomas en la clásica estructura de "cuentas en una cuerda".

Con estos experimentos se ha podido concluir que las histonas en solución tienden a formar subunidades, con una estructura secundaria estable y forman el soporte adecuado para que el DNA se arrolle sobre ellas tan bien como en la cromatina nativa. Las interacciones Histona-histonas, entre las histonas H2a y H2b, entre $(H2a + H2b)$ y $(H3 + H4)_2$ o entre H1 ($H2a + H2b + H3 + H4$), son muy importantes durante la constitución, o la reconstitución, de los nucleosomas, así como para la adquisición de estructuras mucho más complejas que explican como se hace la determinación de la conformación del complejo DNA-histonas, tal como se halla presente durante el funcionamiento genómico de la estructura celular (Leffak y Jeili, 1977).

Los valores de la relación 260/230, en el espectro ultravioleta de nuestras preparaciones de DNA, oscilaron entre 1.97 para el DNA somático de Rata y 2.22 para

los DNA obtenidos de Hígado de Bovino y de Espermatozoides de Toro, estos valores están de acuerdo con los propuestos por Marmur (1961) y coinciden con los reportados por Hernández-Pérez y Rosado en 1988. Estos resultados nos permiten afirmar que las muestras de DNA con las que se trabajó tuvieron una pureza adecuada.

Para la obtención de la cromatina de Hígado Bovino, nos enfrentamos a varios problemas, que contrastaron con la facilidad con que se logró obtener cromatina murina de buena calidad. Primeramente el Hígado Bovino es de consistencia más sólida que el de Rata y tiene una estructura considerablemente más fibrosa. A pesar de que se dedicó un esfuerzo considerable para retirar las capas de peritoneo que revisten al órgano, la decisión de realizar una buena homogeinización del tejido, utilizando un homogenizador vidrio-teflón, fué prácticamente imposible de realizar, por lo que se recurrió a picar la muestra finamente con una hoja de bisturí y posteriormente homogenizar en un polytron. Esta operación nos proporcionó un tejido adecuadamente homogeneizado, pero llevando la posibilidad de producir ruptura de los núcleos y disrupción del DNA por la violencia del método utilizado.

La segunda dificultad fue la obtención de los núcleos de hígado de bovino, ya que el descenso de la fracción nuclear a través del gradiente de sacarosa era incompleto por lo que se cambió de metodología, empleándose para este fin la de Marzluff y Huang, 1987, lo cual permitió, obtener una mayor cantidad de núcleos. El método de Marushige y Bonner (1966), que se utilizó para aislar la cromatina debió ser profundamente modificado, requiriéndose repetir tres veces la homogenización, agitación y centrifugación finales, siempre y cuando se hicieran las homogenizaciones en el polytron, lo que ocasiona por un lado que la cromatina se rompa y por otro que se alargue el proceso grandemente, lo que dificulta la conservación de la cromatina.

Después de probar algunos otros métodos para la obtención de cromatina se decidió estudiar la metodología reportada por Commernford y col, 1963, que esta diseñada para 500 gr de muestra, por lo cual el procedimiento debió ser escalado para utilizarse con nuestras muestras que fueron de 5 gr. Este método emplea centrifugación por elutriación, que en nuestro caso fue sustituida por centrifugación normal, recuperándose la cromatina en el precipitado. La cromatina, resuspendida por homogenización en vidrio-teflón, proporcionó un espectro de absorción que coincide con el que reportan Marushige y Bonner.

Al comparar nuestros resultados de reasociación con los de los autores que han realizado reasociaciones de DNA somático con histonas, encontramos que el patrón electroforético es más o menos similar, sin embargo, en los casos en que se utilizó DNA obtenido de espermatozoides no fué posible obtener patrones tan claros como los reportados en la literatura con nucleosomas obtenidos con DNA somático. Para tratar de lograr una mejora en nuestros patrones electroforéticos, se decidió hacer un estudio más profundo de la cinética de digestión y la utilización de Agarosa de gran pureza, grado biología molecular. Aunque los resultados no fueron totalmente concluyentes, debemos aceptar que el patrón de reasociación parece ser semejante cuando se utilizan los dos diferentes tipos de DNA, sin embargo consideramos que los datos obtenidos en nuestros experimentos de digestión y separación electroforética de los productos, no nos permiten descartar nuestra hipótesis de manera clara.

En lo que respecta a los gradientes isocinéticos, aunque debemos reconocer que se encontraron grandes dificultades en su realización, los resultados obtenidos indicaron consistentemente que el patrón de distribución de los productos de la digestión producida tanto con DNAsa I como con nucleasa micrococcica, es diferente para las estructuras producidas por la reasociación de los dos diferentes tipos de DNA con las histonas. Es posible proponer que aunque el DNA espermático se asocia con las histonas somáticas para formar estructuras semejantes a nucleosomas, la composición relativa de estos "nucleosomas germinales" es diferente a la propuesta para los nucleosomas de células somáticas

CONCLUSIONES

El conocimiento de las características físicas y químicas de las proteínas nucleares, tanto histonas como protaminas es sólido, sin embargo la forma en que estas se unen al DNA para dar lugar a la estructuración y empaquetamiento de la cromatina del espermatozoide, no se conoce con exactitud. El mecanismo que le da a la cromatina espermática su alto grado de compactación es todavía motivo de especulación y es, en la actualidad, motivo de un extenso número de investigaciones.

La comprensión acerca de los mecanismos de empaquetamiento de la cromatina del espermatozoide, permitirán al ser elucidados no solo el mejor conocimiento de esta célula por demás importante, sino también la solución a algunos problemas de infertilidad que han sido reportados tanto en Humanos como en Bovinos, el entendimiento de la represión absoluta de los mecanismos de transcripción, que pudieran dar una luz acerca de la manipulación de las células cancerígenas, así como la protección selectiva de las células germinales durante los tratamientos oncológicos. Estas son solo algunas de las razones que hacen imprescindible la búsqueda de este conocimiento.

Los resultados obtenidos en la fase experimental, nos permiten concluir que, cuando el DNA del espermatozoide de Toro es reasociado con Histonas somáticas comerciales, a través de diálisis sucesivas en las que se reduce la molaridad de las soluciones de cloruro de sodio, se asocia con las histonas, formando una estructura "nucleosomal" similar a la que forma el DNA somático bajo las mismas condiciones. Sin embargo la presencia de diferencias consistentes tanto en el patrón obtenido por electroforesis como en los patrones obtenidos por el estudio en gradientes isocinéticos, nos permiten proponer que la composición de estas partículas nucleosomales es diferente cuando el DNA utilizado proviene de espermatozoides. Una conclusión definitiva a estas posibilidades deberá esperar a la obtención de nuevos datos obtenidos mediante otros tipos de metodología, como la microscopía electrónica.

BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D., (1994) *The Molecular Biology of the Cell*. 3rd Ed. Garland Publishing, New York.
- Allan, J., Cowling, G.J., Harbone, N., Cattini, P., Craigie, R., Goold, H. (1981) Regulation of the higher order structure of chromatin by histones H1 and H5 *J. Cell. Biol.* 90:279-288
- Allen, G.C., Hall, G.E., Jr., Childs, L.C., Weissinger, A.K., Spiker, S., and Thompson, W.F. (1993) Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells. *Plant. Cell.* 5:603-613
- Allen, M.J., Pogany, G.C., Siekhaus, W., and Balhorn, R. (1990) Atomic force microscopy studies of mammalian sperm chromatin. *J. Cell. Biol.* 111:110 (abstract613)
- Ammer, H., and Henschen, A., (1988) Primary structure of rabbit sperm protamine, the first protamine of its type with an aberrant N-terminal *FEBS Lett.* 242:111-116
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.W., Love, W.E., and Moudrianakis, E.N., (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10148-10152
- Arcott, P.G., Lee, G., Bloomfield, V.A., and Evans, D.F. (1990) Helical period of z-DNA (letter) *Nature* 23:346-706
- Auger, J., and Dadoune, J.P. (1993) Nuclear status of human sperm cells by transmission electron microscopy and image cytometry changes in nuclear shape and chromatin texture during spermiogenesis and epididymal transit *Biol. Reprod.* 49:166-175
- Ausio, J., (1992) Structure and dynamics of transcriptionally active chromatin *J. Cell. Sci.* 102:1-5
- Axel, R., (1975) Cleavage of DNA in nuclei and chromatin with staphylococcal nuclease *Biochemistry* 14:2921-2925
- Bakayev, V.V., Melnickov, A.A., Osicka, V.D. and Varshavsky, A.J., (1975) Studies on chromatin II Isolation and characterization of chromatin subunits. *Nucleic. Acids. Res.* 2:1401-1419
- Balhorn, R. (1982) A model for the structure of chromatin in mammalian sperm *J. Cell. Biol.* 93:298-305
- Balhorn, R., (1989) Mammalian protamines structure and molecular interactions in: K.W.Adolph (Ed.) *Molecular Biology of chromosome function* Springer-Verlag. New York. pp.366-395
- Balhorn, R., Weaton, S., Thomas, C., and Wyrobek, A.J., (1984) DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Exp. Cell. Res.* 150:298-308
- Ballesteros, L.M., Delgado, N.M., Rosado, A., and Hernández-Pérez, O., (1988) Structure of human sperm chromatin *Arch. Androl.* 19:63-71

Bealiche, D., Loir, M., Kruggle, W., Sautiere, P., (1987) Isolation and characterization of two protamines St1 and St2 from stallion spermatozoa and amino acid sequence of the major protamine St1. *Biochim. Biophys. Acta* 913:145-149

Bellvé, AR., McKay, DJ., Renaux, BS., Dixon, GH., (1988) Purification and characterization of mouse protamines P1 and P2 Amino acid sequence of P2. *Biochemistry* 27:2890-2897

Bianchy, F., Rousseaux-Prevost, R., Sautiere, P., Rousseaux, P., (1992) P2 protamines from human sperm are zinc-finger proteins with one Cys2/His2 motif. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182:540-547

Bloch, DP., (1969) A catalog of sperm histones. *Genetics, Suppl.* 61:93-112

Bode, J., (1984) Nucleosomal conformations induced by the small HMG proteins or by histone hyperacetylation are distinct *Arch. Biochem. Biophys.* 228:364-372

Bode, J., Gomez-Lira, MM., and Schroter, H., (1983) Nucleosomal particles open as the histone core becomes hyperacetylated. *Eur. J. Biochem.* 130:437-445

Bode, J., Willmitzer, L., and Opatzk, (1977) On the competition between protamines and histones: studies directed toward the understanding of spermiogenesis. *Eur. J. Biochem.* 72:393-403

Bolander, F.F., (1994) *Molecular Endocrinology*. Academic Press, Inc. 2da Ed. Printed in USA

Boseley, P.G., Bradbury, E.M., Butler-Browne, G.S., Carpenter, B.G., and Stephens, R.M., (1976) Physical studies of chromatin The recombinant of histones with DNA *Eur. J. Biochem.* 62:21-31

Burgoyne, L., Hewish, D., and Mobbs, J., (1974) Mammalian chromatin substructure studies with the calcium-magnesium endonuclease and two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem. J.* 143:67-72

Burton, D.R., Hyde, J.E., and Walker, I.D., (1975) Histones F2a1 y F3 interact reversibly and cooperatively with DNA to form an equimolar complex in chromatin *FEBS LETTERS* 55:77-80

Butler, G.C., and Neelin, J.M., (1961) A comparison of histones from chicken tissues by zone electrophoresis in starch. *Can J. Biochem.* 39:485-491

Camerini-Otero, R.D., Sollner-Webb, B., and Felsenfeld, G., (1976) The organization of histones and DNA in chromatin: Evidence for an arginine-rich histone *Kernel Cell* 8:333-347

Christensen, ME., Rattne, JB., and Dixon, GH., (1984) Hyperacetylation of histone H4 promotes chromatin decondensation prior to histone replacement by protamines during spermatogenesis in rainbow trout. *Nucleic. Acids. Res.* 12:4575-4592

Coelingh, J.P., Monfoort, C.H., Rozijn, T.H., Gevers, L.J.A., Schiphof, R., Steyn-Parve, E.P., Braunitzer, G., Shrank, B., and Ruhfus, A., (1972) The complete amino acid sequence of the basic nuclear protein of bull spermatozoa *Biochim. et Biophys. acta.* 285:1-14

Cohn, WE., and Moldave, K., (1991) Cap. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology* Vol. 40

Commenford, S.L., Hunter, M.J., and Oncley, J.L. (1963) The preparation and properties of Calf liver deoxyribonucleoprotein J. of Biol. Chem., 238: 2123-2134

Cowan, A.E., and Myles, D.G. (1993) Biogenesis of surface domains during spermiogenesis in the guinea pig Dev. Biol. 155:124-133

Csordas, A., (1990) On the biological role of histone acetylation. Biochem. J 265:23-38

Czichos, J., Kohler, M., Reckmann, B., and Renz, M., (1989) Protein-DNA conjugates produced by UV irradiation and their use as probes for hybridization Nucleic. Acids. Res. 17:1563-1572

D'auria, G., Paolillo, L., Sartorio, R., and Wurzbarger, S., (1993) Structure and function of protamines: and H nuclear magnetic resonance investigation of the interaction of cupleines with mononucleotides. Biochim. et Biophys. Acta. 1162:209-216-

D'anna, J.A., Jr and Isenberg, I., (1973) A complex of histones II b2 and IV Biochemistry 12:1035-1043

D'anna, J.A., Jr and Isenberg, I., (1974) Interaction of renatured histones f3 and f2a1 Biochem. Biophys. Res. Commun. 61:343 - 347

de Lange, T., Shiule, L., Myers, R.M., Cox, d.R., Naylor, S.L., Killery, A.M., and Varmus, H.E., (1990) Structure and variability of human chromosome ends. Mol. Cell. Biol. 10:518-527

de-Lange, R.J., Fambrough, D.M., Smith, E.L., and Bonner, J., (1969a) Calf and pea histone IV. II amino acid sequence of calf thymus histone IV presence of epsilon-N-acetyllysine. J. Biol. Chem. 244:319-334

de-Lange, R.J., Fambrough, D.M., Smith, E.L., and Bonner, J., (1969b) Calf and pea histone IV amino acid compositions and the identical COOH-terminal 19 residue sequence. J.Biol. Chem. 244:5669-5679

Dixon, G.H., and Smith, M. (1968) Nucleic acids and protamine in salmon testes. Prog. Nucleic. Acids. Res. 8:9-34

Dixon, GH., (1972) The basic proteins of trout testis chromatin: aspects of their synthesis, post-synthetic modifications and binding to DNA. Acta Endocrinol. (Copenhagen), Suppl. 168:130-154

Domenjoud, L., Fronia, C., Uhde, F., and Engel, W., (1988) Sequence of human protamine 2 cDNA. Nucleic. Acids. Res. 16:7733-

Drew, H.R. (1991) Can one measure the free energy of binding of the histone octamer to different DNA sequence by salt-dependent reconstitution? J. Mol. Biol. 219:391-392

Elsevier, SM., (1982) Messeger RNA encoding basic chromosomal proteins of mouse testis. Dev. Biol. 90:1-12

Fawcett, D.W. (1970) A comparative view of sperm ultrastructure. Biol. Reprod. 2(suppl):90-127

Felix, K. (1960) Protamines Advance. Protein. Chem. 15:1-56

- Finch, J.T., and Klug, A., (1976) Solenoidal model for sperstructure in chromatin Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1897-1901
- Fletcher, T.M., Krishnan, U., Serwer, P., and Hansen, J.C. (1994) Quantitative agarose gel electrophoresis of chromatin: Nucleosome-dependent changes in charge, shape, and deformability at low ionic strength Biochemistry, 33:2226-2233
- Frambrough, D.M., and Bonner, J., (1966) On the similarity of plant and animal histones. Biochemistry 5:2563-2570
- Freemont, P.S., Lane, A.N., and Sanderson, M.R., (1991) Structural aspects of protein-DNA recognition Biochem. J. 278:1-23
- Gatewood, JM., Cook, GR., Balhorn, R., Bradbury, EM., and Schmid, CW., (1987) Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin Science 236:962-964
- Gatewood, JM., Schroth, GP., Schmid, CW., Bradbury, EM., (1990) Zinc-induced secondary structure transitions in human sperm protamines J. Biol. Chem. 265:20667-60672
- Germond, J.E., Bellard, M., and Oudet, P., (1976) Stability of nucleosomes in native and reconstituted chromatins Nucleic. Acids. Res. 3:3173-3192
- Gosule, L.C., and Schellman, J.A., (1978) DNA condensation with polyamines I. Spectroscopic studies. J. Mol. Biol. 12:311-326
- Greil, W., Igo-Kemenes, T., and Zachav, H.G., (1976) Nuclease digestion in between and within nucleosome Nucleic. Acids. Res. 3:2633-2644
- Grimes, SR Jr., and Henderson, N., (1983) Acetylation of histones during spermatogenesis in the rat. Arch. Biochem. Biophys. 221:108-116
- Groundine, M., and Conkin, K.F., (1985) Chromatin structure and de novo methylation of sperm DNA: implications for activation of the paternal genome Science. 228:1061-1068
- Guttenbach, M., and Schmid, M. (1990) Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradiative in situ hybridization. Am. J. Hum. Genet. 46:553-558
- Hansen, J.C., and Wolffe, A.P., (1992) Influence of chromatin folding in transcription initiation and elongation by RNA polymerase III Biochemistry 31:7977-7988
- Hayes, J.J., Clark, D.J., and Wolffe, A.P., (1991) Histone contributions to the structure of DNA in the nucleosome Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6829-6833
- Hayes, J.J., Tullius, T.D., and Wolffe, A.P., (1990) The structure of DNA in a nucleosome Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7405-7409
- Hecht, NB., (1989) in "histones and other basic nuclear proteins" L. Hnilica, G. Stein and J. Stein, eds. CRC Press, Boca Raton, Florida.347-373
- Heidaran, MA., Kozak, CA., and Kistler, WS., (1989) Nucleotide sequence of the Stp-1 gene coding for rat spermatid nuclear transition protein I (TP1): homology with protamine P1 and assignment of the mouse Stp-1 gene to chromosome 1 Gene 75:39-46

Hernández-Pérez, O., Bello, Ma., and Rosado, A., (1978) The human spermatozoa genome. *Analysys by DNA reassociation kinetics Biochem. Biophys. Acta*, 521:557-565

Hernández-Pérez, O., y Rosado, A., (1988) *Biología molecular del espermatozoide de humano Ciencia*, 39:249-260

Hewish, D.R., and Burgoyne, L.A., (1973) Chromatin sub-structure: the digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease *Biochem. Biophys. Res. Commun* 52:504-510

Horowitz, R.A., Agard, D.A., Sedat, J.W., and Woodcock, C.L., (1994) The three-dimensional architecture of chromatin *In situ*: Electron tomography reveals fiber composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon *J. of Cell. Biol.* 125:1-10

Hud, N.V., Allen, M.J., Downing, K.H., Lee, J., and Balhorn, R. (1993) Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 193:1347-1354

Hud, N.V., Allen, M.J., Downing, K.H., Lee, J., and Balhorn, R. (1993) Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 193:1347-1354

Hyde, J.E., and Walker, I.O., (1975) Covalent cross-linking of histone in chromatin *FEBS LETTERS* 50:150-154

Isenberg, I., (1979) Histones (review). *Annu. Rev. Biochem.* 48:159-191

Jennings, C., and Powel, D., (1995) Genome organization in the murine sperm nucleus *Zygote* 3:123-131

Jeong, S.W., and Stein, A., (1994) Micrococcal nuclease digestion of nuclei reveals extended nucleosome ladders having anomalous DNA lengths for chromatin assembled on non-replicating plasmids in transfected cells *Nucleic. Acids. Res.* 22:370-375

Johnson, PA., Peschon, JJ., Yelick, PC., Palmiter, RD., Hecht, NB., (1988) Sequence homologies in the mouse protamine 1 and 2 genes *Biochim. Biophys. Acta.* 950:45-53

Karawajew, L., and Heymann, S., (1980) Model considerations on nucleosome structure. *Studia Biophysica, Berlín*, 79:11-12

Kayne, P.S., Kim, U., Han, M., Mullen, J.R., Yoshizaki, F., and Grunstein, M., (1988) Extremely conserved histone H4 n terminus is dispensable for Growth but essential for repressing the silent mating loci in Yeast *Cell* 55:27-39

Kierszenbaum, A.L., and Tres, L.L. (1978) The packaging unit a basic structural feature for the condensation of late cricket spermatid nuclei *J. Cell. Sci.* 33:265-283

Kleichline, L.D., Ville, C.A., and Wassarman, P.M., (1976) Structure of eukaryotic chromatin *Bichim. et Biophys. Acta.* 425:84-94

Koehler, J.K., Wurschmidt, U., and Larsen, M.P., (1983) Nuclear and chromatin structure in rat spermatozoa *Gamete. Res.* 8:357-370

Kornberg, R.D.E., (1974) Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. Chromatin structure is based on a repeating unit of eight histone molecules and about 200 DNA base pairs Science 184:868-871

Kornberg, R.D.E., Geoghegan, T.E., and Keller, G.H., (1974) A two-subunit histone complex from calf thymus Biochem. Biophys. Res. Commun. 59:542 - 547

Kossel, A., (1928) "The Protamines and Histones", Longmans Green, New York.

Laskey, R.A., Mills, A.D., and Morris, N.R., (1977) Assembly of Sv-40 chromatin in a cell-free system from Xenopus eggs Cell 10:237-245

Lee, K.L.D., Pentecost, B.T., D'anna, J.A., Tobey, R.A., Gurley, L.R., and Dixon, G.H., (1987) Characterization of DNA sequences corresponding to three distinct HMG-1 mRNA species in line CHO Chinese hamster cells and cell cycle expression of the HMG-1 gene Nucleic. Acids. Res. 15:5051-5068

Leffak, I.M., and Jeili, I.H., (1977) Histone deoxyribonucleic acid complexes studied by thermal denaturation and circular dichroism spectroscopy Biochemistry 16:5869-5878

Leningher, AL., Nelson, DL., and Cox, MM., (1982) Principles of Biochemistry. 2a. ed., Worth Publishers, Print in USA. pp.806-810

Lennox, R.W., (1984) Differences in evolutionary stability among mammalian H1 subtypes. Implications for the roles of H1 subtypes in chromatin J. Biol. Chem 259:669-672

Lennox, R.W., and Cohen, L.H., (1983) The histone H1 complements of dividing and non dividing cells of the mouse. J. Mol. Biol. Chem. 258:262-268

Leuba, S.H., Zlatanova, J., and Van Holde, K., (1994) On the location of linker DNA in the chromatin fiber studies with immobilized and soluble micrococcal nuclease J. Mol. Biol. 235:871-880

Li, T.S., (1975) Sperm immunology, infertility, and fertility control Obstet. Gynecol. 44:607-623

Liovlant, F. (1983) Cholesteric organization of DNA in the stallion sperm head Tiss. Cell 16:535-555

Loir, M., and Lanneau, M., (1978) Transformation of ram spermatid chromatin. Exp. Cell. Res. 115:231-243

Louie, AJ., and Dixon, GH., (1972) Trout testis cells. II Synthesis and phosphorylation of histones and protamines in different cell types. J. Biol. Chem. 247:5498-5505

Marmur, J. A (1961) procedure for the isolation of deoxiribonucleic acid from microorganisms J. Mol. Biol., 3:208-218

Martian, J.K.W., Paton, A.E., Bunich, G.J., and Olins, D.E., (1980) Nucleosome cores have two specific binding sites for nonhistone chromosomal proteins HMG 14 and HMG 17 Science 209:1534-1536

- Marushige, K., and Bonner, J., (1966) Template properties of liver chromatin J. Mol. Biol. 15:160-174
- Marushige, K., and Dixon, G.H., (1971). Transformation of trout testis chromatin J. Biol. Chemistry. 246:5799-5805
- Marushige, Y., and Marushige, K., (1978) Phosphorylation of sperm histone during spermiogenesis in mammals Biochim. Biophys. Acta. 518:440-449
- Marzluff, W.F., and Huang, R.Ch. C. (1984) Transcription of RNA in Isolated Nuclei.Chap. 4 Transcription and translation A practical approach. Ed. Hames and Higgins. IRL Press Oxford, England,
- McCarty, K.S. Jr., Vollmer, R.T., and McCarty, K.S. Sr. (1974) Isocinetetic gradients. Anal. Biochem., 61:120-132
- McKay, D.J., Renaux, B.S., and Dixon, G.H., (1986) Human sperm protamines. Amino-acid sequence of two forms of protamine P2 Eur. J. Biochem. 156:5-9
- Mezquita, C., (1985) Protamines in birds NATO Adv. Study. Inst. Ser. 101:315-321
- Moens, P.B., and Pearlman, R.E. (1989) Satellite DNA I in chromatin loops of rat pachytene chromosomes and in spermatids. Chromosoma. 98:287-294
- Morce-Gaudio, M., and Risley, M.S. (1991) Topoisomerase expression during spermatogenesis. J. Cell. Biol. 115:50 (abstract 286)
- Noll, M., (1974) Subunit structure of chromatin Nature (London) 251:249-251
- Noll, M., (1977) DNA folding in the nucleosome. J. Mol. Biol. 116:49-71
- Noll, M., and Kornberg, R.D., (1977) Action of Micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1 J. Mol. Biol. 109:393-404
- Ogawa, Y., Quagliarotti, G., and Jordan, J., (1969) Structural analysis of the glycine-rich, arginine-rich histone 3 sequence of the amino-terminal half of the molecule containing the modified lysine residues and the total sequence J. Biol. Chem. 244:4387-4392
- Ohe, Y., and Iwai, K., (1981) Human spleen histones H3 Isolation and amino acid sequence J. Biochem. 90:1205-1211
- Olins, A.L., and Olins, D.E., (1973) Spheroid chromatin units (v bodies) J. Cell Biol 59: 252a
- Olins, A.L., Carlson, R.D., Wright, E.B. and Olins, D.E., (1976) Chromatin bodies: Isolation, subtraction and physical characterization Nucleic. Acids. Res. 3:3271-3291
- Olins, D.E., and Olins, A.L., (1974) Spheroid chromatin units (v bodies) Science 183:330-332
- Oliva, R., and Dixon, G.H., (1989) Chicken protamine genes are intronless. The complete genomic sequence and organization of the loci. J. Biol. Chem. 264:12472-12481

Oosterhof, D.K., Hozier, J.C., and Rill, R.L., (1975) Nucleas action on chromatin: evidence for discrete, repeated nucleoprotein units along chromatin fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:633-637

Oudet, P., Germond, J.E., Sures, M., Gallwitz, D., Bellard, M., and Chambon, P., (1977) Nucleosome structure I: All four histones, H2a, H2b, H3 y H4, are required to form a Nucleosome, but an H3-H4 alone. *Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant.* 42:287-300

Oudet, P., Gross-Bellard, M., and Chambon, P., (1975) Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating units. *Cell* 4:281-300

Panyim, S., and Chalkley, R., (1969) A new histone found only in mammalian tissues with little cell division *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37:1042-1049

Paull, T.T., Haykinson, M.J., and Johnson, R.C., (1993) The nonspecific DNA-binding and DNA-bending proteins HMG 1 and HMG 2 promote the assembly of complex nucleoprotein structure *Genes Dev.* 7:1521-1534

Pienta, K.J., and Coffey, D.S. (1984) A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the nucleus and chromosomes *J. Cell. Sci. Suppl.*, 1:123-135

Pirhonen, A., Linnala-Kankkunen, A., and Mäenpää, PH., (1994) Identifictation of phosphoseryl residues in protamines from mature mammalian spermatozoa *Biology of Reproduction* 50:981-986

Poccia, D.L., (1986) Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early development *Int. Rev. Cytol.* 105:1-65

Poccia, D.L., and Green, G.R., (1992) Packaging and unpackaging the sea urchin genome *Trends. Biochem. Sc.* 17:223-227

Pogany, G.C., Corzett, M., Weston, S., and Balhorn, R.(1981) DNA and protein content of mouse sperm: Implications regarding sperm chromatin structure *Exp. Cell. Res.*, 136:127-136

Pruss, D., and Wolffe, A.P., (1993) Histone-DNA contacts in a nucleosome core containing a *Xenopus* 5S r RNA gene *Biochemistry* 32:6810-6814

Puigdomenech, P., Romero, MC., Allan, J., Sautiere, P., Giancotti, V., and Crane-Rattner, J.B., and Hamkalo, B.A., (1987) Higher order structure in metaphase chromosomes. I the 250 Angstroms fiber. *Chromosoma* 69:363-372

Rawn, J.D., (1989) *Bioquímica Vol. II Interamericana Mc. Graw-Hill* 1a ed. 1989

Reeves, R., and Chang, P., (1983) Investigations of the possible functions of glycosylation in the high mobility group proteins: Evidence for a role in nuclear matrix association *J. Biol. Chem.* 258:679-687

Renz, M., Nehls, P., and Hozier, J., (1977) *Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol.* 42:245-252

Richards, B.M., and Pardon, J.F., (1970) The molecular structure if nucleohistone (DNH). *Exp. Cell. Res.* 62: 184-196.

- Rill, R.L., and Van Holde, K.E., (1973) Properties of nuclease-resistant fragments of calf thymus chromatin *J. Biol. Chem.* 248:1080-1083
- Ris, H., and Kornberg, J., (1979) Chromosome structure and levels of chromosome organization In *Cell Biology* vol.2 (ed. D.M. Prescott and L. Goldstein), pp267-361 New York: Academic Press.
- Risley, M.S., Einheber, S., and Bumcrot, D.A., (1986) Changes in DNA topology during spermatogenesis. *Chromosoma* 94:217-227
- Roark D.E., Geoghegan, T.E., and Keller, G.H., (1974) A two-subunit histone complex from calf thymus *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59:542 - 547
- Roth, S.Y., and Allis, D., (1992) Chromatin condensation: does histone H1 desphosphorylation play a role? *TIBS* 17:93-98
- Sahasrabudhe, C.G., and Van Holde, K.E., (1974) The effect of trypsin on nuclease-resistant chromatin fragments *J. Biol. Chem.* 249:152
- Schulter, D., (1988) Protamine in invertebrates *Holothuria Nature*, 331:496-498
- Seyedin, S.M., and Kistler, W.S., (1980) Isolation and characterization of rat testis H1t. *J. Biol. Chem.* 258:5949-5954
- Shawn, B.R., Herman, T.M., Kovacic, R.T., Beaudreau, G.S., and Van Holde, K.E., (1976) Analysis of subunit organization in chicken erythrocyte chromatin *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:505-509
- Shiffman, M.L., Maciewicz, R.A., Hu, A.W., Howard, J.C., and Li, H.J., (1978) Protein dissociation from DNA in model systems and chromatin *Nucleic. acids. Res.* 5:3409-3426
- Simon, R.H., and Felsenfeld, G., (1979) A new procedure for purifying histone pairs H2A + H2B and H3 + H4 from chromatin using hydroxylapatite *Nucleic. Acids. Res.* 6:689-696
- Simon, R.H., Camerini-Otero, R.D., and Felsenfeld, G., (1978) An octamer of histone H3 and H4 forms a compact complex with DNA of nucleosome size. *Nucleic. Acids. Res.* 5:4805-4818
- Simpson, R.T., and Whitlock, J.P. Jr., (1976) Chemical evidence that chromatin DNA exists as 160 base pair beads interspersed with 40 base pair bridges *Nucleic. Acids. Res.* 1:117-127
- Sollner-Webb, B., and Felsenfeld, G., (1975) A comparison of the digestion of nuclei and chromatin by staphylococcal nuclease *Biochemistry* 14:2915-2929
- Sollner-Webb, B., Camerini-Otero, R.D., and Felsenfeld, G., (1976) Chromatin structure as probed by nucleases and proteases: evidence for the central role of histones H3 and H4 *Cell* 9:179-193
- Sperling, L., and Klug, A., (1977) X-ray studies on "native" chromatin *J. Mol. Biol.* 112:253-263
- Spinski, M.I., and Wagner, T.E. (1977) The total structure and organization of chromosomal fibers in eutherian sperm nuclei *Biol. Reprod.* 16:428-440
- Staynov, D.Z., (1976) Thermal denaturation profiles and the structure of chromatin *Nature* 264:522-525

- Stemmer, W.P.c., (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751
- Strätling, W.H., (1979) Role of histone H1 in the conformation of oligonucleosome as a function of ionic strength. *Biochemistry* 18:596-603
- Strätling, W.H., Müller, U., and Zantgraf, H., (1978) The higher order repeat structure of chromatin is built up of globular particles containing eight nucleosomes *Exp. Cell. Res.* 117:301-311
- Subirana, JA, (1982) "Proceeding of the fourth International Symposium on Spermatology" (J. Andre, ed.), pp. 197-213. Nijhoff, The Hague, The Netherlands.
- Suquet, C., and Smerdon, M.J., (1993) UV Damage to DNA strongly influences its rotational setting on the histone surface of reconstituted nucleosomes. *J. Biol. Chem.* 268:23755-23757
- Suzuki, M., and Wakabayashi, T. (1988) Packaging of DNA in cricket sperm: a compact model of DNA packaging. *J. Mol. Biol.* 204:653-662
- Tatchell, K., and van Holde, K.E. (1977) Reconstitution of chromatin core particles *Biochemistry*, 16:5295-5303
- Thoma, F., Koller, Th., and Klug, I., (1979) Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of salt-dependent superstructure of chromatin *J. Cell. Biol.* 33:403-427
- Thomas, J.O., (1984) The higher order structure of chromatin and histone H1 *J. Cell. Sci. Suppl.* 1:1-20
- Tremethick, D.J., and Drew, H.R., (1993) High mobility group proteins 14 and 17 can space nucleosomes in vitro *J. Biol. Chem.* 268:11389-11393
- van Holde, K.E., and Zlatanova J. (1995) Chromatin higher order structure: chasing a mirage?. (review). *J. Biol. Chem.* 270:8373-8376
- van Holde, K.E., Sahasrabudhe, C.G., and Shaw, B.R., (1974) A model for particle structure in chromatin. *Nucleic Acids Res.* 1:1579-1586
- van Holde, K.E., Shaw, B.R., Lohr, D., Herman, T.M., and Kovacic, R.T., (1975) *Proc. FEBS Meet.*, 10th p57
- Varshavsky, A.J., Bakayev, V.V., and Georgiev, G.P., (1975) Heterogeneity of chromatin subunits in vitro and location of histone H1 *Nucleic. Acids. Res.* 3:477-492
- Voet, D., and Voet, J.G., (1995) *Biochemistry* 2a. Ed. Published by John Wiley and Sons, Inc Printed in USA.
- Ward, W.S. (1993) Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.* 48:1193-1201
- Ward, W.S., and Coffey, D.S., (1991) DNA Packaging and Organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells *Biology of Reproduction* 44:569-574

- Ward, W.S., Partin, A.W., and Coffey, D.S. (1989) DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma*, 98:153-159
- Ward, W.S., Partin, A.W., and Coffey, D.S., (1990) Specific organization of genes in relation to the sperm nuclear matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173:20-25
- Waterborg, J.H., and Matthews, H.R., (1984) Patterns of histone acetylation in *Physarum polycephalum*. H2A and H2B acetylation is functionally distinct from H3 and H4 acetylation. *Eur. J. Biochem.* 142:329-335
- Wehling, K., Krauss, S., and Wagner, K.G., (1976) Cooperative binding of fluorescein-labeled couplein by Dna Nucleic. Acids. *Res.* 3:149-164
- Weischet, W.O., Allen, J.R., Riedel, G., and van Holde, K.E., (1979) The effects of salt concentration and H-1 depletion on the digestion of calf thymus chromatin by micrococcal nuclease. *Nucleic. Acids. Res.* 6:1843-1862
- Winkfein, R.J., Connor, W., Mezquita, J., Dixon, G.H., (1985) Histone H4 and H2b gene in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) *J.Mol. Evol.* 22:1-19
- Woodcock, C.L., (1994) Chromatin fibers observed *In situ* in frozen hydrated sections. Native fiber diameter is not correlated with nucleosome repeat length *J. of Cell. Biol.* 125:11-19
- Woodcock, C.L.F., Frado, L.L., and Ratther, J.B., (1984) The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. *J. Cell. Biol.* 99:42-52
- Woodcock, C.L.F., (1973) Ultrastructure of inactive chromatin *J. Cell Biol* 59:368a
- Woodcock, C.L.F., Sweetman, H.E., and Frado, L.L., (1976) Structural repeating units in chromatin *Exp. Cell. Res.* 97:11-19
- Wyrobek, A.J., Alhborn, T., Balhorn, R., Stanker, L., and Pinkel, D. (1990) Fluorescence *in situ* hybridization to Y chromosomes in decondensed human sperm nuclei. *Mol. Reprod. Dev.* 27:200-208
- Yelick, P.C., Balhorn, R., Johnson, P.A., Corzett, M., Mazrimas, J.A., Kleene, K.C., and Hecht, B., (1987) Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not *Mol. Cell. Biol.* 7:2173-2179
- Yoshida, M., (1987) High glutamic and aspartic region in nonhistone protein HMG (1+2) Unwinds DNA double helical structure *J. Biochem. (Tokyo)* 101:175-180
- Zlatanova, J., and Van Holde, K., (1996) The linker histones and chromatin structure *New Twists. Progress. in Nucleic. Acids. Res. and Mol. Biol.* 52:217-259
- Zubay, G., and Doty, P., (1959) The isolation and properties of deoxyribonucleoprotein particles containing single nucleic acids molecules. *J. Mol. Biol.* 1:1-20