

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología-Microbiología

**Caracterización electroforética de proteínas básicas de
la cromatina del espermatozoide del “erizo rojo”**

Loxechinus albus **Molina 1782**

TESIS

Presentada por:

Br. Rosalía Callohuari Quispe

Para optar el título profesional de:

BIOLOGO - MICROBIOLOGO

TACNA - PERU

2004

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS No 67 Titulo Profesional de **BIÓLOGA - MICROBIÓLOGA**

El secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias, certifica que el Consejo de Facultad ha designado como jurados para la sustentación de la tesis **CARACTERIZACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS BÁSICAS DE LA CROMATINA DEL ESPERMATOZOIDE DEL "erizo rojo" *Loxechinus albus* Molina, 1782.**

El mismo que esta conformado por:

Presidente : Mgr. Daladier Castillo Cotrina
Secretario : Mgr. Rosa Caffo Marruffo
Vocal : Blga. Soledad Bornás Acosta

Para examinar y calificar el trabajo de tesis sustentado en acto publico el día 22 de noviembre del 2004

Presentado por la Señorita Bachiller **ROSALÍA CALLOHUARI QUISPE** de la Escuela Académico Profesional de Biología - Microbiología.

El jurado calificador en forma secreta e individual emitió su calificativo sobre el trabajo expuesto y se procedió a obtener el promedio que arrojó el calificativo de Aprobado por unanimidad con tres votos a favor con la nota de dieci y cinco y promedio de sobresaliente

Para ratificar lo detallado firman:



Mgr. Daladier Castillo Cotrina
Presidente



Mgr. Rosa Caffo Marruffo
Secretario



Blga. Soledad Bornás Acosta
Vocal

Dedicatoria:

A Dios mi noble compañero de viaje por la vida.

*A mis padres Jorge y Saturnina por su inmenso amor y lucha constante
por brindarme la oportunidad de realizarme como profesional,
sacrificando aún su propio bienestar.*

*A mis queridos hermanos Hilda y Yony por su permanente
apoyo y fuente de inspiración.*

Agradecimientos:

Mi infinita gratitud al Mgr. Roberto Castellanos Cabrera, por su permanente asesoramiento desde su inicio hasta la culminación del presente trabajo de tesis. Del mismo modo agradezco sus valiosos consejos y enseñanzas.

Al Dr. Manel Chiva Royo, Departamento de Ciencias Fisiológicas II. Facultad de Medicina. UPC, España por las sugerencias brindadas para el presente trabajo.

Al Dr. Jhoni I. Quispe Becerra, Departamento de Ecología e Hidrología. Facultad de Biología. UM, España por sus consejos y su generoso desprendimiento al enviar sendos materiales bibliográficos.

A los Dres. Francisco Solís Marín, Centro de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. México; Dr. Wolfgang Stotz, y al Dr. Julio Vásquez Departamento de Biología Marina. Facultad de Ciencias del Mar. UCN. Chile, por el apoyo con material bibliográfico.

Al Mgr. Mario Monteguirfo G., Mgr. Miryam López del CIBN. UNMSM. y al Blgo. Edward Barriga del IMARPE. ILO.

Mi consideración especial a la Mblgo. Manuela Cosavalente Sánchez, al Mgr. Daladier Castillo Cotrina y a mis queridos amigos.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Problema.....	5
1.2 Hipótesis.....	6
1.3 Objetivos.....	6
II. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 Estructura de la cromatina en eucariotas.....	7
2.2 Regulación del plegamiento de la cromatina.....	14
2.3 La cromatina espermática y las proteínas nucleares	15
2.4 Descripción del equinodermo.....	24
III. MATERIAL Y METODOS.....	29
3.1 Material biológico.....	29
3.2 Muestreo.....	30
3.3 Métodos Preparativos.....	30
3.3.1 Obtención de esperma de <i>Loxechinus albus</i>	30
3.3.2 Obtención de núcleos espermáticos.....	32
3.3.3 Obtención de proteínas básicas espermioespecíficas.....	35

3.4. Métodos Analíticos.....	37
3.4.1 Electroforesis en PAGE-AA-UREA.....	37
3.4.2 Cuantificación de la intensidad de las bandas.....	39
3.4.3 Determinación del Peso Molecular.....	40
IV. RESULTADOS.....	41
5.1 Patrón general de las proteínas básicas espermioespecíficas.....	41
5.2 Purificación y cuantificación de las PBNE.....	43
5.3 Caracterización de las proteínas básicas espermioespecíficas.....	47
V. DISCUSIÓN.....	49
VI CONCLUSIONES.....	56
VII. RECOMENDACIONES.....	57
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	58
APÉNDICE	

RESUMEN

El presente estudio consiste en el aislamiento, extracción, purificación y caracterización de las proteínas básicas nucleares espermioespecíficas (PBNE) del "erizo rojo" *Loxechinus albus*, Molina 1782 equinodermo comestible y de importancia comercial. El análisis se ha realizado a nivel electroforético.

El contenido de las proteínas básicas espermioespecíficas consisten de componentes denominados histonas espermioespecíficas (SpH) y su caracterización por electroforesis en gel de poliacrilamida, nos da una fracción histónica en la que se encuentran las proteínas conocidas como; SpH1 con un peso molecular de 23 700 Da, SpH2A con 13 400 Da, SpH2B con 15 700 Da, H3 con 15 300 Da y H4 con 11 300 Da.

Del patrón general de las proteínas básicas nucleares espermioespecíficas, se puede observar que la histona SpH2B mantiene la característica de su baja movilidad electroforética y alto peso molecular observado en otros equinodermos. Asimismo SpH3 y SpH4 son las histonas más conservadas.

I. INTRODUCCIÓN

Las proteínas de la cromatina del esperma contrariamente al alto grado de conservación evolutiva que exhiben las histonas somáticas, revelan una variabilidad estructural y composicional enorme. Los datos que emergen de estudios realizados en una amplia gama de organismos, indican que las proteínas esperma-específicas nucleares (PBNE) no son tan heterogéneas como se pensaron originalmente. De hecho, desde el punto de vista compositivo pueden ser arreglados en un número discreto de tipos básicos: tipo H (histona), tipo P (protamina) y tipo PL (como-protamina) con una composición intermedia entre histonas y protaminas. La investigación sobre el tipo PL se ha realizado principalmente en moluscos. Así, estos estudios han resultado ser gratificantes no sólo por proveer una mejor visión de la clasificación de esas proteínas, sino que también proporcionan un entendimiento más profundo de su evolución.

De acuerdo a la hipótesis vertical ($H \rightarrow PL \rightarrow P$) de Subirana y col (1973) sólo histonas (tipo H) o los precursores PL estarían presentes en los grupos de metazoos primitivos, mientras que los más especializados tipos PL y P sería más prevalecientes en el esperma de organismos de niveles filogenéticos superiores de las ramas de deuterostomados y protostomados. (Ausió, 1999)

En equinodermos de acuerdo a estudios realizados por Poccia, 1995, se ha encontrado poca variabilidad de las PBNE, en lo que respecta a las histonas propiamente dichas. (en Saperas y col., 1997)

Sin embargo, el grado de similitud o diferencia exhibida por las PBNE de dos especies dadas no siempre se correlacionan con las relaciones taxonómicas o filogenéticas entre estas. En otras palabras, dos especies relativamente cercanas pueden presentar PBNE muy diferentes como en el caso de peces óseos; anfibios; entre los moluscos; (en Saperas y col., 1996), mientras que las especies más distantes pueden desplegar moléculas de SNBP similares. (Castellanos, 1998)

En el Pacífico Sur de América solo se tiene estudios realizados a este nivel en *Tetrapigus niger* "erizo negro", (Guevara, 1980, Reyes y col. 2001, Imschenetzki y col. 2003) y se desconoce como está constituida la estructura molecular proteica del nucleosoma en la cromatina espermática del "erizo rojo" *Loxechinus albus*. La caracterización electroforética de las proteínas básicas de la cromatina espermática, permite establecer los tipos de proteínas básicas que están constituyendo el nucleosoma de la cromatina de esta especie.

Por otro lado, estudios relacionados a PBNE no solo son importantes para explicar el origen filogenético de los seres vivos, sino porque son importantísimos para entender los fenómenos relacionados al DNA. Durante muchos años la

comunidad científica había considerado la regulación de la expresión genética y la estructura de la cromatina como dos campos de investigación independientes. Hoy en día resulta claro que para poder entender como se regula la expresión de los genes, debemos entender cual es la estructura de la cromatina y como se remodela.

La estructura de la cromatina es una entidad dinámica, juega un rol regulador importante en los procesos dependientes del molde de DNA, incluyendo la transcripción, replicación, recombinación, reparación, segregación, estabilidad cromosómica, progresión del ciclo celular, y silenciamiento epigenético

La alteración regulada de la estructura de la cromatina, llamada "chromatin remodeling", puede lograrse por modificación covalente de histonas o por la acción de complejos de remodelación ATP-dependientes, para permitir el acceso de las proteínas necesarias al ADN, por ejemplo para reparar algún deterioro. Una variedad de mecanismos puede usarse para remodelar la cromatina; algunos actúan localmente en un solo nucleosoma y otros actúan más ampliamente. Una histona nucleosomal puede llevar una marca postransduccional específica y localizada, esto es reconocida por los factores y es requerida para la asociación estable de la maquinaria de reparación del ADN. Será interesante en el futuro extender los descubrimientos al respecto y entender las múltiples relaciones entre

el código de histona, dinámicas de cromatina y reparación de ADN. (Allard et al., 2004)

Está ahora claro que la cromatina afecta muchos aspectos de la función del cromosoma. La aplicación de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), la inmunolocalización, el análisis de las modificaciones de la histona, y digestión de nucleasa micrococcal continuará proporcionando la visión en los procesos de la transcripción, replicación, segregación, y la integridad del cromosoma. (Pidoux, et al., 2004). ChIP es la mejor herramienta usada para entender qué marcas van donde y qué efectos tiene, paralizando las interacciones DNA-proteína *in situ* pero, su confianza reside en la especificidad de los anticuerpos. Para la verdadera secuencia del código de histona, las técnicas sofisticadas de espectrometría de masas pueden ayudar a determinar la frecuencia de estas marcas y en qué áreas genómicas ejercen autoridad. (Maher, 2003)

Teniendo en consideración los hechos señalados anteriormente, resulta de máximo interés identificar y caracterizar las proteínas básicas espermioespecíficas del "erizo rojo" *Loxechinus albus*. Este estudio si se profundiza permitirá la localización de genes activos en la cromatina espermática para establecer el genoma de esta especie, obtener genes relacionados con su reproducción, los cuales podrán ser clonados para lograr un mejoramiento genético.

Este recurso actualmente se encuentra fuertemente sobre-explotado por su alto valor comercial. Las gónadas que son la porción comestible, tienen el mismo aspecto tanto en hembras y machos. Asimismo, cabe señalar que esta especie sólo se encuentra en Perú y Chile.

1.1 PROBLEMA

La falta de estudios tanto a nivel nacional e internacional, referente a como estaría constituida la estructura proteica de la cromatina de los espermatozoides maduros del "erizo rojo" *Loxechinus albus*; así como el desconocimiento que si la cromatina espermática se encuentra constituida por proteínas histonas verdaderas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) o por proteínas no histonas nos ha llevado a realizar el presente estudio para establecer la estructura molecular proteica del nucleosoma en la cromatina del esperma maduro de *L. albus*, permitiéndonos plantear el siguiente problema:

¿Que proteínas básicas están presentes en la cromatina del espermatozoide del "erizo rojo" *Loxechinus albus*?

1.2 HIPÓTESIS

La estructura de la cromatina en espermatozoides del "erizo rojo" *Loxechinus albus* Molina, 1782, se encuentra constituida por proteínas básicas denominadas histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

- Caracterizar electroforéticamente la estructura proteica de la cromatina del espermatozoide maduro del "erizo rojo" *Loxechinus albus* Molina, 1782.

1.3.2 Objetivos específicos

- Aislar y purificar los núcleos espermáticos de *Loxechinus albus*.
- Extraer y establecer el patrón general de las proteínas básicas espermioespecíficas.
- Purificar las proteínas básicas espermioespecíficas.
- Caracterizar electroforéticamente las proteínas espermioespecíficas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Estructura de la Cromatina en Eucariotas

El superenrollamiento de DNA en procariontes es inducido y mantenido por la acción de la enzima DNA girasa. El superenrollamiento del DNA en eucariota es el resultado principalmente del plegado del DNA sobre las proteínas histonas para formar la cromatina. La formación de la cromatina es el primer paso en una serie de eventos de plegamiento que reducen la longitud de DNA 10,000 veces de su forma extendida en un cromosoma mitótico compacto. (Anexo 11, Fig. 12)

2.1.1 Histonas y Estructura de la Cromatina

Las histonas pueden resolverse en cinco clases mayores por los procedimientos de fraccionamiento bioquímicos y por sus propiedades físicas. Las histonas llamadas H2A, H2B, H3, y H4; están entre las secuencias de proteínas más altamente conservadas.

Esta conservación habla de la importante naturaleza de la estructura de las histonas y sugiere que una alteración de incluso un solo aminoácido de la cadena lateral o es letal o fuertemente seleccionado en contra. Su síntesis ocurre durante la fase S del ciclo celular. Durante la replicación del ADN, el mantenimiento de la estructura de la cromatina es el resultado

neto de dos reacciones. La primera, conocido como la segregación del nucleosoma materno, es el traslado de histonas core pre-existente hacia las dos cromátidas nacientes detrás de la horquilla. En contraste la otra la mitad del complemento del nucleosoma está hecho de histonas recientemente sintetizado en una reacción conocida como el ensamblaje de nucleosoma de novo. Esta reacción que es esencial para la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae*, ocurre vía un mecanismo de pasos ordenados en que histonas acetiladas H3 y H4 son depositadas primero y rápidamente unido por los dímeros H2A/H2B para completar el nucleosoma core (revisado por Verreault, 2000). La primera evidencia de tales asociaciones en la cromatina viene del trabajo de Kornberg y Thomas, 1974.

2.1.2 Nucleosomas

El nucleosoma fue descubierto a través de:

- a) Su apariencia en el microscopio electrónico como las cuentas de un collar (cuerpos nu) de la cromatina decondensada.
- b) Por la generación de aproximadamente 200 pb de escaleras de DNA después de la digestión limitada con nucleasa micrococcal.
- c) Por el asilamiento del complejo nucleoproteínico de 11,5S.

Estas observaciones y los patrones de entrecruzamiento histona-histona, y los datos de la difracción de rayos X permitieron a Kornberg proponer el nucleosoma como tal. (Rev. Workman & Kingston, 1998)

El nucleosoma propiamente dicho está compuesto de: La partícula core (octámero) y el DNA envuelto en él (~ 146 pb). El cromatosoma incluye el nucleosoma y un adicional de 20 pares de bases (pb) de DNA linker asociado a la histona linker (H1 o H5). La estructura de cristal de rayos X ha revelado que el nucleosoma tiene 2.8 Å (Luger et al., 1997). (Anexo 13, Fig.14)

Estructura del Nucleosoma

De acuerdo a la estructura determinada por cristalografía de rayos X, las dimensiones corresponden aproximadamente a dos vueltas completas de DNA; considerando a la proteína que une el DNA al nucleosoma. La evidencia de que el DNA realmente está alrededor de las histonas core, se ha logrado con la digestión de nucleosomas core con DNase I a diferencia de la nucleasa micrococcal, es capaz de digerir el DNA nucleosomal expuesto.

El octámero de histona es de forma cilíndrica con un diámetro exterior de 6.5 nm, compuesta de un tetrámero central de dos copias de cada H3 y H4 que están flanqueados por dos heterodímeros H2A/H2B. Cada una de las histonas del centro comparte un motivo común que consiste en dos α - hélices cortas y una hélice central larga separada por los puentes beta. Estas estructuras constituyen una de las porciones más ordenadas de las histonas y ha sido llamado el pliegue de la histona. Este

pliegue provee sitios de interacciones histona-DNA así como también provee la dimerización de histonas por un motivo handshake; además contribuyen a fomentar la oligomerización de proteínas histona dentro del octámero. Una interacción entre los dímeros H3-H3 y H3/H4 maneja la formación del tetrámero, y una interacción entre cada H4 del tetrámero con una H2B de un dímero de H2A/H2B lleva a la formación del octámero. Es importante que la interfaz de H4-H2B sea considerablemente más hidrofóbica que las interfaces H3-H3 y así anticipar que sea menos estable a baja fuerza iónica. Esta característica puede explicar quizás que mientras el tetrámero H3/H4 es estable en concentraciones salinas fisiológicas, el octámero completo es estable sólo en concentraciones salinas altas o cuando está envuelto con DNA en forma de nucleosoma core. Dentro del nucleosoma core, 146 pb de DNA están envueltas 1.65 veces alrededor del octámero de histona en una superhélice hacia la izquierda con casi 7.6 giros de la hebra de DNA /vuelta superhelicoidal. (Ramakrishnan, 1997; Wu, Grunstein, 2000).

El camino de los 12 giros centrales de DNA sigue un camino de cargas histona-positivos repetidos en la superficie del octámero. El camino de la hélice DNA alrededor del octámero no es uniforme: Se distorsiona por la estructura local del DNA unido a la superficie de histonas. Las más notables son las curvaturas mayores a 10–15 y 40 pb del eje bivalente (el

centro de la superhélice de ADN), dónde las interacciones de las histonas se sobresalen o abrochan el ADN exterior. La estructura de arriba fue determinada usando los cuatro histonas principales de *Xenopus laevis*. (Aalfs et al. 2000)

2.1.3 Plegamiento de orden superior de la cromatina

En la célula eucariótica, la cromatina esta empacada en una fibra de 30 nm de diámetro van Holde (1988), Finch y Klug (1976) propusieron un simple modelo helicoidal con seis nucleosomas/vuelta con una H1, unida en el interior. Este modelo llamado solenoide, o variantes de este, que han sido introducidos en los libros de texto, tiene muchas evidencias en contra. (ejem. van Holde and Zlatanova, 1995, Usachenko,1996), y una gran variedad de modelos alternativos han sido propuestos. El modelo alternativo describe un patrón irregular de plegamiento en una estructura “slinky-like” con el DNA linker dentro de la fibra. Basado en estudios de imagen de microscopia crío- electrónica, los ángulos de entrada y salida del DNA linker en los nucleosomas son bastante bajos y forman una estructura en forma de piruleta una vez unido la H1. Recientes observaciones usando pinzas de láser óptico parece favorecer el modelo irregular de zigzag. (Hammermann et al, 2000)

El nucleosoma es el ladrillo primario de la cromatina. Woodcock y Dimitrov (2001), propusieron una nueva nomenclatura describiendo los diferentes niveles jerárquicos de la estructura de orden superior de la cromatina similar al usado para el plegado de las proteínas. La fibra de 10 nm o estructura de collar de perlas representaría la estructura primaria. La fibra de 30nm definiría la estructura secundaria. La estructura terciaria estaría asociada con el establecimiento de interacciones de la fibra de la cromatina de extensiones grandes. Las estructuras primarias y secundarias han sido intensivamente estudiados por métodos bioquímico, biofísico, y microscopía. (Anexo 12, Fig. 13)

A pesar de estos esfuerzos, la dinámica de la estructura terciaria permanece oculta por la falta de información interpretable y apropiada tecnología. Agregando un nivel más de dificultad técnica, la morfología de la cromatina dentro de un solo núcleo comprende, en cualquier momento dado, una combinación de eucromatina localmente extendido y heterocromatina fuertemente condensada. La eucromatina es a menudo asociado con regiones transcripcionalmente activas contrario a la heterocromatina. Los telómeros y centrómeros son regiones constitutivas del cromosoma en forma de heterocromatina. (Adkins et al. 2004)

La última comprensión del cromosoma eucariótico dependerá del conocimiento de la naturaleza de este plegado y el plegado de orden superior de la fibra de 30nm en un cromosoma mitótico. La regulación de este plegado será esencial para entender los procesos de la transcripción, replicación, reparación, recombinación y el metabolismo del ADN.

2.1.4 Compactación adicional de orden superior

Los solenoides pueden ser más compactados y plegados bajo varias condiciones en los loops superenrollados gigantes en cromatina de orden superior asociado con los cromosomas en metafase. El superenrollamiento adicional y compactación generan el cromosoma en metafase.

2.2 **Regulación del Plegamiento de la Cromatina**

Durante la replicación del ADN y la expresión génica la estructura de la cromatina es desplegada. Los genes transcritos o ADN recientemente replicados son muy sensibles a la digestión de nucleasas. Estas regiones genéticas están también asociadas con formas modificadas de histonas incluyendo las formas acetiladas y fosforiladas. (Recillas, 2000)

La acetilación de histonas se ha relacionado con tres aspectos de la funcionalidad de la cromatina: Depósito de las histonas nuevamente

sintetizadas, expresión de genes específicos y con procesos de condensación y decondensación de la cromatina. Pareciera que el rol de la acetilación es la de favorecer el reemplazo de histonas por protaminas durante la espermatogénesis de ciertas especies. De hecho hay un aumento de los niveles de acetilación en esta fase especialmente de la H4.

La fosforilación de ocho aminoácidos serina y treonina de la histona H1 se pone en correlación con la forma muy condensada de las fibras de la cromatina visto en los cromosomas mitóticos. Dentro de 10 minutos después de la mitosis, todos estos residuos de fosfato están alejados, antes del inicio del próximo ciclo celular. Existen otras modificaciones postranscripcionales como la metilación, ADP-ribosilación y ubiquitinización.

Hasta ahora la evidencia que une la modificación de la histona con la expresión del gen y la replicación del ADN es muy circunstancial, estando principalmente en forma de correlaciones en lugar de causal en la naturaleza.

2.3 La Cromatina Espermática y Las Proteínas Nucleares

2.3.1 Función relacionada con el cambio de estructura

Los espermatozoides son células altamente especializadas para realizar su función fecundativa desde un punto de vista bioquímico en

algunas especies como en el erizo rojo, la realizan en condiciones ambientales hostiles, por lo que esta célula debe estar capacitada para protegerse y superar esta circunstancia de hostilidad. Cada organismo resuelve este problema de diversas formas y es evidente que las diversas formas que adopta la capacitarían para ello. En la mayor parte de los casos el material está fuertemente condensado lo que impide que la cromatina se disgregue en su paso hacia el óvulo. En las últimas etapas de la condensación se produce la inactivación reversible (de manera generalizada pero no completa) de la transcripción.

La condensación es importante para proteger al genoma de mutágenos ambientales (Bloch, 1969) aunque tal protección sea relativamente débil, debido a que los espermatozoides y espermátides tardías son sensibles a mutaciones de origen químico. Las protaminas (que sustituyen a las histonas durante la espermiogénesis) son sensibles a agentes alquilantes y por lo tanto, pueden aumentar la sensibilidad del espermatozoide a determinados tipos de mutágenos

2.3.2 Clasificación de las proteínas básicas nucleares espermioespecíficas asociadas al DNA.

Dentro de la escala zoológica las proteínas básicas espermioespecíficas del núcleo de espermatozoides pueden ser de diversos

tipos; a diferencia de las proteínas del núcleo de células somáticas, que son muy conservadas. Un intento temprano por clasificar las PBNE fue llevado a cabo por David Bloch en 1969. (Anexo 2, Fig. 6)

Basados en la información actual, los PBNE pueden ser agrupados en tres categorías principales:

- A). Tipo histona (tipo H);
- B). Tipo protamina (tipo P); y
- C). Tipo como- protamina (tipo PL).

El primer grupo de PBNE en esta clasificación, el tipo histona (tipo H), básicamente corresponde al tipo *Rana de Bloch*. Consiste de histonas que están composicional y estructuralmente relacionadas a las histonas que se encuentran en los núcleos de células somáticas (Anexo 13, Cuadro, 2). Este grupo incluye variantes esperma-específicas principalmente para histonas H1 y H2B (spH1, spH2B) como los presentes en el esperma de equinodermos (Poccia, 1995).

Histona H1

Esta histona presenta una mayor variabilidad en su secuencia, es rica en lisina y su peso molecular está entre 20,000 y 26,000. En mamíferos existen cinco subfracciones somáticas y una variante testicular H1t. También existen variantes tejido específicas; en núcleos de eritrocitos

de peces, de anfibios; en aves se encuentra la histona H5 cuya función sería la de compactar fuertemente la cromatina para inactivarla. La histona H₀ que se encuentran en tejido de mamíferos donde no se produce replicación del DNA. Se han encontrado especies de H1₀ con similares composiciones de aminoácidos en peces, reptiles anfibios e invertebrados, pero no existe esta especie en plantas (revisado por Castellanos, 1998). En equinodermos existen subtipos de histonas H1 durante su embriogénesis (Imschenetzki y col. 2003). Se han descrito en *Tetrapygus niger* una histona K1 específica de espermatozoides que tienen características peculiares (Guevara y col., 1980).

Histona H2A

Por electroforesis en gel de poliacrilamida se resuelve hasta en 20 componentes diferentes pero la mayoría de ellos no son variantes de su secuencia sino formas con modificaciones post-transcripcionales y solo existirían cinco formas no modificadas de H2A:H2A₁, H2A, H2B, H3 y H4.

Histona H2B

Se las puede clasificar en subclases que presentan además de las mutaciones puntuales, variaciones típicas en la longitud del polipéptido con secuencias típicas que sugieren dominios estructurales específicos, que

pueden estar presentes o no dependiendo de la especialización de la célula. En tejidos somáticos de mamíferos se ha encontrado una variante H2B₁, en ratón se han visto dos variantes de H2B iguales en peso molecular y carga pero que difieren en una sustitución Ser/Gly, en la posición 73.

En la espermatogénesis en mamíferos existen también variantes (Shires y col. 1975). En equinoideos se pueden encontrar hasta tres variantes de H2B. En plantas superiores se presentan variantes con pesos moleculares elevados (Spiker, 1982).

Histona H3

Los mamíferos presentan las tres variantes somáticas: H3.1, H3.2 y H3.3; las dos primeras difieren en la sustitución de Cys/Ser en la posición 96, mientras que la última difiere de la H3.2 en la sustitución Ile-Gly por Val-Met en la posición 89-90. La H3.1 parece ser específica de mamíferos mientras que las otras dos serían co-expresadas en idéntica forma en todos los vertebrados estudiados.

La H3 en espermatozoide de equinodermos es muy conservada excepto en la posición 96, que en especies superiores ha mutado de cisteína. En esperma de ratón hay una variante que difiere de la somática

en algunos aminoácidos en la región C-terminal. (revisado por Castellanos, 1998).

Histona H4

Es la histona más conservada en especies animales y vegetales. La conservación de su estructura primaria tiene gran importancia en su funcionalidad. En *Tetrahymena* se han encontrado dos variantes de H4 en el que se han invertido la posición de Lys-Arg en la posición 19-20. En erizo de mar tiene una cisteína en posición 73 que en el transcurso de la evolución se cambió a treonina (Strickland y col. 1974).

El segundo grupo, el tipo protamina (tipo P), consta de proteínas altamente básicas ricas en arginina ($\text{Arg} \geq 30 \text{ mol } \%$) ($\text{His} + \text{Lys} + \text{Arg} = 45 - 80 \text{ mol } \%$, $\text{Ser} + \text{Thr} + \text{Gly} = 10 - 25 \text{ mol } \%$) (Hunt, et al 1996) de peso molecular relativamente pequeño (aprox. $4\ 000$ y $\leq 10\ 000$). Este grupo incluye al *Salmon* y el tipo ratón de la clasificación de Bloch. Durante la espermiogénesis, estas proteínas reemplazan la mayoría de las histonas como-somáticas germinales que están presentes a comienzos de la espermatogénesis, y son las PBNE principales encontrados dentro del esperma maduro.

El tipo como-protamina (PL) es el tercer grupo de proteínas de esta clasificación (Subirana, et al 1973; Ausio, 1986,1995) y es el grupo más

estructuralmente heterogéneo. Este grupo es equivalente al tipo *Mytilus* en la clasificación de Bloch. Consta de proteínas básicas que tienen un contenido de arginina + lisina en cantidades usualmente al menos de 35-50 mol %. Todas las proteínas de este grupo están estrechamente relacionadas a las moléculas de la familia histona H1. Están extendidos a todo lo largo del reino animal. Las proteínas PL reemplazan la mayoría de los componentes de histonas durante la espermiogénesis, aunque a una magnitud más pequeña que las proteínas del tipo P.

Proteínas PL están Relacionadas a Histona H1

En la almeja *Spisula solidissima*. PL-I es la única proteína PL presente en el esperma de este organismo, tiene una masa molecular de $\approx 50,000$ y está por consiguiente mayor que cualquier protamina o histona, incluyendo la mayoría de las histonas de la familia H1. El análisis estructural de PL-I reveló que, como la histona H1, esta proteína tiene un centro globular tripsina-resistente, con una alta similitud secuencial (51 %) a la histona H5. La histona H5 forma parte de la familia histona H1, el cual está presente en eritrocitos nucleados de ciertos vertebrados (Neelin, 1968). Interesantemente, los eritrocitos y espermatozoides ambos son células terminantemente diferenciadas. Todas las proteínas PL-I descritas a

la fecha tienen un core globular, el cual es similar al core globular de la histona H5.

Además los análisis de las proteínas PL de los moluscos bivalvos revelaron que todos ellos (PL-I, PL-II, PL-III, PL-IV) están relacionados a la histona H1 a pesar de su heterogeneidad estructural.

Es importante notar que el contenido de arginina de PL-I puede ser tan alto como 35 mol % en algunos organismos bivalvos. La histona H1 rica en arginina relacionada a las proteínas PL-I con características similares a aquellos encontrados en bivalvos han sido descritos en el esperma de tunicados y peces. (Lewis et al, 2004)

2.3.3 Evolución de las Proteínas básicas nucleares espermioespecíficas (PBNE)

En 1973 Subirana y col. hipotetizaron que las proteínas del tipo del protamina (tipo P) han evolucionado de un precursor de histona como-somático primitivo vía un intermedio tipo PL a través de un mecanismo de evolución vertical ($H \rightarrow PL \rightarrow P$). El soporte experimental para esta hipótesis se basó en el análisis de la composición de los aminoácidos.

Si la hipótesis vertical es correcta, predice que sólo histonas (PBNE del tipo H) o los precursores PL estarían presentes en los grupos de

metazoos primitivos, mientras que los más especializados tipos PL y P sería más prevalecientes en el esperma de organismos de niveles filogenéticos superiores. (Anexo 2, Fig. 7 y Anexo 3, Fig. 8).

La presencia de tipos de PBNE análogos en protostomados y en las primacías de los deuterostomados a una aparente simetría evolutiva es indicativa de la existencia de convergencia evolutiva. La investigación actual a nivel del gen finalmente debería determinar si la evolución global de PBNE representa un genuino caso de convergencia o si es el resultado de evolución paralela de un antepasado común del gene de la histona H1. Recientemente, la evidencia ha sido obtenida sugiriendo que los patrones de expresión del gen en células espermatozoides juegan un importante rol en la generación de genes nuevos. (Ausió, 1999)

2.3.3 Origen de histonas core e histona linker

El análisis cristalográfico de histonas ha proporcionado una caracterización estructural detallada del plegado de las histonas core y el dominio globular hélice-alado de las histonas linker. El último es ubicuo entre los animales, plantas, y hongos, está ausente en algunos taxa de protistas (Wu, G. et al, 2000). Ambos, el modelo de distribución de H1 hélice-alado y un examen de la región C-terminal fueron revisados (Kasinsky et al, 2001) con el objetivo de proporcionar una visión en la

evolución de esta familia de proteínas (Anexo 4, Fig.9). En ella refiere que el origen de la evolución de histonas core, puede remontarse a archaeobacterias y de las histonas linker a eubacterias.

2.4 Descripción del Equinodermo *Loxechinus albus* (Molina, 1872)

2.4.1 Información taxonómica

Reino	Animalia
Phylum	Echinodermata Bruguière, 1791
Subphylum	Echinozoa Haeckel, 1895
Clase	Echinoidea Leske, 1778
Subclase	Euechinoidea Bronn, 1960
Orden	Echinoidea Claus, 1976
Familia	Echinidae Gray, 1825
Género	<i>Loxechinus</i>
Especie	<i>Loxechinus albus</i> Molina, 1782
Nombre común:	Erizo rojo

2.4.2 Características taxonómicas

Loxechinus albus es semiesférico, de color verde y rojizo o purpúrea en la zona ambulacral e interambulacral de los individuos grandes. Las placas ambulacrales poseen de 6 a 11 pares de poros, con un

tubérculo primario. El sistema ambulacral es dicíclico con un ano central y numerosas placas periproctal grandes. En los adultos, las espinas primarias son cortas y cónicas. Las espinas secundarias y miliares son numerosas. Los pedicelarios globíferos tienen un cuello corto y las válvulas grandes llevan de uno a cuatro dientes laterales en cada lado.

2.4.3 Hábitat y preferencias de sustrato

En el norte y centro chileno (18, 20° a 40° S), la colonización larval (de 2 cm) ocurre principalmente en áreas intertidales rocosas (revisado por Vásquez, 2001) y se alimentan de películas de diatomea béntica, y pedazos de algas. Los individuos mayores a 4,5 cm de diámetro emigran hacia los ambientes subtidales. *Loxechinus albus* es uno de los raedores bénticos más importantes en los ecosistemas intertidales y subtidales poco profundos, existe información sobre el contenido intestinal de poblaciones salvajes. Bückle et al. 1980 encontró 22 algas como también animales pertenecientes a diferentes grupos zoológicos, en los individuos de Chiloé. Asimismo, se observaron que no hay diferencias significativas en la composición dietética con los cambios estacionales. Los componentes dietéticos principales son el alga verde *Ulva sp* para los individuos pequeños, y *Lessonia sp* para los individuos grandes. La eficacia de absorción para los individuos grandes, medido como porcentaje de materia

orgánica total ingerido fue el siguiente; *Lessonia sp.* (75%), *Ulva sp.* (73.5%) y *Macrocystis sp.* (70.9%). En los individuos pequeños es más alto para *Ulva sp.* (78.7%), seguido por *Lessonia sp.* (68.3%), y *Macrocystis sp.* (55.1%).

2.4.4 Ecología de la reproducción

El erizo es un organismo dioico, sin dimorfismo y de fecundación externa. El periodo reproductor de *L. albus* varia con la latitud, mostrando un desplazamiento temporal del periodo de desove. (Anexo 5, Fig.10) A excepción de la Región Magallánica (Oyarzun et al, 1999)

La época de maduración gonadal máxima y desove tienen una duración aproximada de 3 meses en el año. Sin embargo es posible mediante la técnica de inyección con KCl, obtener gametos durante 6 meses en el año, periodo que transcurre entre el inicio de la producción de gametos y el desove. Entre los distintos tipos de inyección al desove empleados corrientemente en equinoideos ya sean mecánicos, como la extracción de la linterna de Aristóteles, o bien químicos como la inyección de peróxido de hidrógeno o de KCl. Los resultados muestran que el inductor más efectivo es el KCl 0,5M seguido de la extracción de la linterna de Aristóteles y el menos efectivo el H₂O₂ (Zamora, Stotz, 1994).

2.4.5 Distribución geográfica e importancia económica

Loxechinus albus es una especie endémica de las costas peruanas y chilenas, distribuido desde la Isla Lobos de Afuera, Perú (60° 53' S) hasta el extremo sur de América del Sur (Cabo de Hornos, Chile 56° 70' S).

Es uno de las especies económicamente más importantes en los sistemas bentónicos del litoral Pacífico sureste de América del Sur. Usado como una fuente de alimento desde tiempos pre-colombinos y por las poblaciones indígenas de las costas chilenas (revisado por Vásquez, 2001).

Aunque en nuestras costas existen otras especies de erizos, solo la especie *L. albus* se explota comercialmente. En Chile, durante las tres últimas décadas el desembarque se ha incrementado en aprox. Un 1000% (SERNAP 1957-1999). La captura mundial de erizos de mar y otros equinodermos, según la FAO, fue en 2002 de 124 995 TM con un incremento de 16,65% respecto al año anterior. En el Perú; Pisco, Ilo, Marcona, Matarani y Atico, es donde se dan los mayores desembarques de este recurso, con un total de 253 TM en el año 2000 (IMARPE, 2000). De acuerdo a la demanda japonesa es más apreciado el erizo proveniente de Atico (comunicación personal con el exportador H. Vera del Rio), por sus características organolépticas. En estos últimos 7 años la exportación del “erizo rojo” *Loxechinus albus*, se ha incrementado de 21 TM en el año

1999 a 67TM en el año 2003 (SUNAD-ADUANAS, 2004). Asimismo es de destacar el procesamiento de la materia prima que vienen desarrollando en nuestra ciudad el consorcio PROPEUR S.A., VERA DEL RIO S.A. y GRAN S.A., otorgándole un valor agregado al producto final, convirtiéndose en un rubro de exportación emergente, siendo el principal destino Japón, seguido por China y Hong Kong.

Los parámetros de calidad que se evalúan en gónada, son su tamaño, color y textura. La mejor calidad es aquella que presenta mayor tamaño, color intenso, mejor textura y firmeza, y sobre todo la integridad de la gónada.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico estuvo constituido por esperma obtenido de especímenes maduros del “erizo rojo” *Loxechinus albus* (Molina 1782), equinodermos procedentes de las playas de Ilo (Moquegua) y Vila-Vila (Tacna).

Las muestras fueron colectadas durante los meses que corresponden aproximadamente al máximo desarrollo gonadal, entre los meses de julio a noviembre de 2001 y enero de 2003; de acuerdo al ciclo reproductivo de *Loxechinus albus* descritos en Vásquez, 2001; (anexo 5, fig. 10). En el Perú el ciclo reproductivo de esta especie aun no está determinada. También se ha obtenido material biológico correspondiente a eritrocitos de pollo de acuerdo al método descrito por Ruiz-Carrillo et al. 1980.

Los reactivos utilizados en la realización del presente trabajo tales como la acrilamida, bis-acrilamida, el fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) y persulfato de amonio (PAM), fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. y el sodio dodecil sulfato (SDS) de Pierce Chemical Co. La urea de grado

ultra pura fue de Schwarz Mann Co. El tetrametiletilendiamino (TEMED) fue de Merck Co. Todas las soluciones se prepararon a temperatura ambiente con agua bidestilada y se conservaron para su uso a 4°C y a -20°C.

3.2 MUESTREO

Para el presente estudio se tomaron muestras aleatorias de individuos sexualmente maduros, debido a que se trata de una población constituida por la misma especie, y siendo el estudio a nivel molecular, no es necesario estimar el tamaño de la muestra, porque se trata de una población de células espermioespecíficas (espermatozoides).

3.3 MÉTODOS PREPARATIVOS

3.3.1 OBTENCIÓN DEL ESPERMA DE *Loxechinus albus*

La obtención del esperma se realizó mediante el método de desove inducido. Para lo cual se seleccionaron solo individuos con un diámetro de testa entre 54–70 mm aproximadamente, a los cuales se les inyectó KCl al 0,4 M (2-3 ml) a cada extremo de la zona oral tratando de dar en la cavidad celómica. Al iniciar el desove inducido, los erizos fueron colocados en posición aboral en vasos de 25 ml. Luego de alrededor de 5

minutos logra expulsar el esperma de color blanco lechoso, el cual fue rápidamente recolectado con la ayuda de una pipeta Pasteur y depositado en pequeños viales conteniendo Buffer A (Sacarosa 0,25 M, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 3 mM, Tris HCl 10 mM, pH 7,0, PMSF 50 mM) helado y guardados en un cooler con hielo para su transporte hacia el laboratorio.

En el laboratorio las muestras fueron observadas al microscopio para comprobar la madurez de los espermatozoides. Inmediatamente las muestras madurez positivas fueron diluidas en Buffer A y se efectuó una primera centrifugación a 14 000 rpm por 30 segundos por 3 veces con el mismo Buffer A helado, con la finalidad de eliminar los contaminantes. Posteriormente fue conservado en glicerol (100 % glicerol, 40 % esperma en Buffer A), a -4 °C. La conservación en glicerol permite su almacenamiento y transporte de la muestra sin peligro a su deterioro o degradación.

3.3.2 MÉTODO OBTENCIÓN DE LOS NÚCLEOS ESPERMÁTICOS

Los núcleos espermáticos fueron obtenidos según los métodos descritos por Subirana y col.1973, Chiva y col.1987-1992, con ligeras modificaciones.

El aislamiento de los núcleos se inicia con el material almacenado en glicerol a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizaron centrifugaciones para eliminar el glicerol a 3000 rpm por 10 min. por 3 veces, de esta manera se logra su reconstitución con el Buffer A. Esta solución a la concentración señalada, proporciona un medio isosmótico para las células espermáticas. La presencia de iones divalentes colaboran con el mantenimiento de una estructura nuclear estable, y son importantes, por que permiten al núcleo resistir el shock osmótico.

Seguidamente el sedimento fue procesado en un homogenizador Elvenjen-Potter, empleando Buffer A, al cual se le agregó Tritón X-100 al 2% que es un detergente que disuelve los lípidos de las membranas biológicas; y 50 mM de fenilmetilfulfonilfluoruro (PMSF) como inhibidor de proteasas, al momento de utilizarla, se usa para evitar la fuerte proteólisis por la gran cantidad de enzimas proteolíticas que contiene el acrosoma del espermatozoide.

La muestra homogenizada se deja en reposo por 90 min. a temperatura ambiente con homogenizaciones ocasionales cada 15 min. Luego de lo cual se centrifuga a 3 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue eliminado y el sedimento resuspendido nuevamente en

Buffer B (Buffer A, Triton X-100 al 2%), homogenizado y posteriormente se realiza una segunda centrifugación a 3 000 rpm durante 10 min.

A continuación el sedimento se trata con el Buffer C (Tris HCl 10 mM, pH: 7,0; EDTA 20 mM), homogenizando y centrifugando a 3 000 rpm durante 10 min., finalmente se obtiene un sedimento de núcleos espermáticos.

Todos los pasos fueron realizados utilizando una microcentrífuga Eppendorf en el Laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Ciencias de la UNJBG y una centrifuga refrigerada Sorvall con un rotor SS-34 del Centro de Investigaciones de Bioquímica y Nutrición de la UNMSM.

La metodología consiste en efectuar una serie de homogenizaciones con tampones o buffers osmóticos a pH fisiológico, seguido de centrifugaciones cortas a baja velocidad, de esta manera los sedimentos van enriqueciéndose en suspensión nuclear (que es la fracción más voluminosa). El método que se sigue se basa en una modificación del método original de Chaeveau y col., 1956 y que ha sido empleado por Subirana y col. (1973), Mezquita y Teng, (1977). El propósito que se persigue al obtener los núcleos es triple: primero, mantener la morfología

del núcleo intacto; segundo, conservar el contenido nuclear durante toda la purificación y tercero, eliminar el material citoplasmático.

El protocolo seguido se esquematiza en el Anexo 6, Figura 11. Todas las operaciones se realizan a 4°C. La primera centrifugación permite eliminar el alcohol en el que se conserva las muestras. La homogenización con el tampón A a la concentración de sacarosa señalada, proporciona un medio isosmótico con la célula. En esta primera fase se comienza a romper las células pero sin destruir los orgánulos especialmente los núcleos, si ocurriera esto, el DNA sería contaminado con elementos de otros compartimientos celulares, de manera que después podrían encontrarse durante la extracción, proteínas no asociadas inicialmente al DNA.

Lo que se pretende es alcanzar las condiciones más favorables para la preservación del núcleo y a la misma razón obedece la utilización del calcio en este tampón. Los iones divalentes colaboran en el mantenimiento de una estructura nuclear estable, y son importantes porque permiten al núcleo resistir el shock osmótico y protegerlo de la deformación, rompimiento y liberación de material intranuclear que pueda presentarse durante la purificación. Cabe mencionar que el PMSF se añadió en el momento de la utilización del tampón.

3.3.3 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS BÁSICAS ESPERMIOESPECÍFICAS

A. EXTRACCION DE PROTEÍNAS BÁSICAS NUCLEARES

La extracción de proteínas básicas espermioespecíficas se realizó por extracción ácida utilizando HCl 0.6 N a una alícuota conteniendo sedimento nuclear, después de su descongelación a 4 °C hasta llegar a una concentración de 0,4 N (Subirana y col.,1973; Chiva y col., 1990) se homogeniza levemente y se centrifuga a 14 000 rpm por 30 min. Se retiene el sobrenadante que contiene las proteínas básicas espermioespecíficas. Según se representa en el Anexo 7, Fig.12

B. PRECIPITACIÓN CON ACETONA

Los pasos anteriores conducen a la obtención de las proteínas deseadas, pero se encuentran en el medio líquido de modo que debe utilizarse un método que las precipite y después recuperarlas por centrifugación.

Las proteínas retenidas en el sobrenadante en el medio ácido, son vertidas en tubo de ensayo al cual se le agrega 6 volúmenes de acetona helada y se deja en reposo por 12 h a - 4 °C. Después de lo cual se centrifuga a 11 000 rpm por 10 min descartando el sobrenadante.

C. LAVADO Y SECADO DE PROTEÍNAS

En esta etapa se debe obtener el máximo de proteínas precipitadas, con una mínima precipitación de sales. Las proteínas son centrifugadas a 10 000 rpm por 10 min. Se decanta y se realiza lavado con acetona acidificada fría (6 volúmenes de acetona y 1 volumen de HCl 0,1 N). El sedimento obtenido de la centrifugación es lavado con acetona pura fría y se vuelve a centrifugar a las mismas condiciones por dos veces más para eliminar los restos de HCl, procediendo luego a colocar el sedimento en un Eppendorf posteriormente secado en una bomba de vacío por 10 a 15 min. para su secado y conservadas a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso en electroforesis.

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.4.1 ELECTROFORESIS EN PAGE-AA-UREA

La caracterización electroforética de las proteínas básicas espermioespecíficas del "erizo rojo" *Loxechinus albus*, se realizó mediante el sistema de electroforesis en gel de poliacrilamida de Panyim y Chalkley (1969) modificado por Hurley (1977), que es una importante contribución metodológica para separar histonas.

La electroforesis vertical se llevó a cabo en geles conteniendo acrilamida al 15%, bis-acrilamida al 0,1%, urea 2.5 M y ácido acético al 5.4 % (Anexo 8), en una cámara electroforética diseñada en el Laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Ciencias, UNJBG.

A. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de proteínas obtenidas en los procesos anteriores, fueron disueltas en buffer muestra (Anexo 9) a una concentración de 1 mg/ml. Antes de la electroforesis las muestras fueron sometidas a un baño maría hirviente por 2 min. y luego llevadas a baño helado para su enfriamiento.

B. ELECTROFORESIS

La electroforesis se realizó a temperatura ambiente utilizando un sistema de gel vertical en una placa de 12 x 12 cm y 1,5 mm de espesor. El gel se sometió a una pre-electroforesis por 90 minutos a un amperaje de 20 mA y 150 voltios; para eliminar el frente de iones que afectaría la electroforesis. El ánodo se conectó en la cámara inferior y el cátodo en la cámara superior. Se recorre de positivo a negativo.

Seguidamente se colocaron 10 μ l de cada muestra de proteína preparada anteriormente, en cada pocito de gel. Se realizó la electroforesis, hasta que el colorante que marca el frente de corrida (pironina) llegue al final de la placa (unas 3 horas en placas pequeñas).

C. DETECCIÓN DE LAS BANDAS

El método más común para visualizar las proteínas en un gel es la tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250 (Anexo 10). Para obtener tinciones permanentes, las proteínas se fijaron en el gel por precipitación. El tiempo de tinción fue de 5-15 min. Posteriormente, el gel se destiñe por difusión para eliminar el color de fondo y obtener un mayor contraste de las bandas de proteínas; se logra por la inmersión del gel en una solución decolorante como ácido acético al 5%, el cual se va renovando hasta el grado de decoloración deseado. Es conveniente que tanto la coloración como la decoloración se realicen con agitación.

D. SECADO DE GELES

Los geles se secaron entre dos láminas de celofán de acuerdo al método empleado en el laboratorio de bioquímica para su conservación y escaneado para su procesamiento con el software de análisis de geles.

3.4.2 CUANTIFICACIÓN DE LA INTENSIDAD DE LAS BANDAS

El Coomasie blue suele unirse más o menos con la misma intensidad a la mayoría de las proteínas, de modo que a la medida de la intensidad de las bandas puede utilizarse como una medida razonable de la cantidad de proteínas, la misma que se cuantificó a través del software de análisis de imagen de dominio público Scion Image Beta 4.0.2 for Windows. (Desarrollado en el Instituto Nacional de Salud de los ESTADOS UNIDOS)

3.4.3 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR

Se determinó a través de una curva estándar utilizando histonas de eritrocito de pollo de peso molecular conocido, para luego proyectar los valores de R_f de las histonas de *Loxechinus albus* y hallar sus respectivos pesos moleculares.

IV. RESULTADOS

4.1 Patrón general de las proteínas básicas espermioespecíficas

En las Figuras 1A y 1B se presenta el patrón general de las PBNE. Las flechas indican la posición de las diferentes histonas durante la electroforesis para cada una de las especies. Se observa claramente la variabilidad electroforética del eritrocito de pollo y del equinodermo *Loxechinus albus*, el primero presenta seis histonas (H), mientras que el segundo solo cinco, además se diferencian por la presencia de dos bandas de menor movilidad (H1 y H2B) y una de mayor (H2A) movilidad electroforética en el caso de *Loxechinus albus*. Las proteínas se han separado en base a su carga/masa molecular, siendo la de mayor movilidad la histona H4 y la de menor movilidad la H1, asimismo se destaca la presencia de H2B de *Loxechinus albus* en una posición diferente a la H2B del eritrocito de pollo.

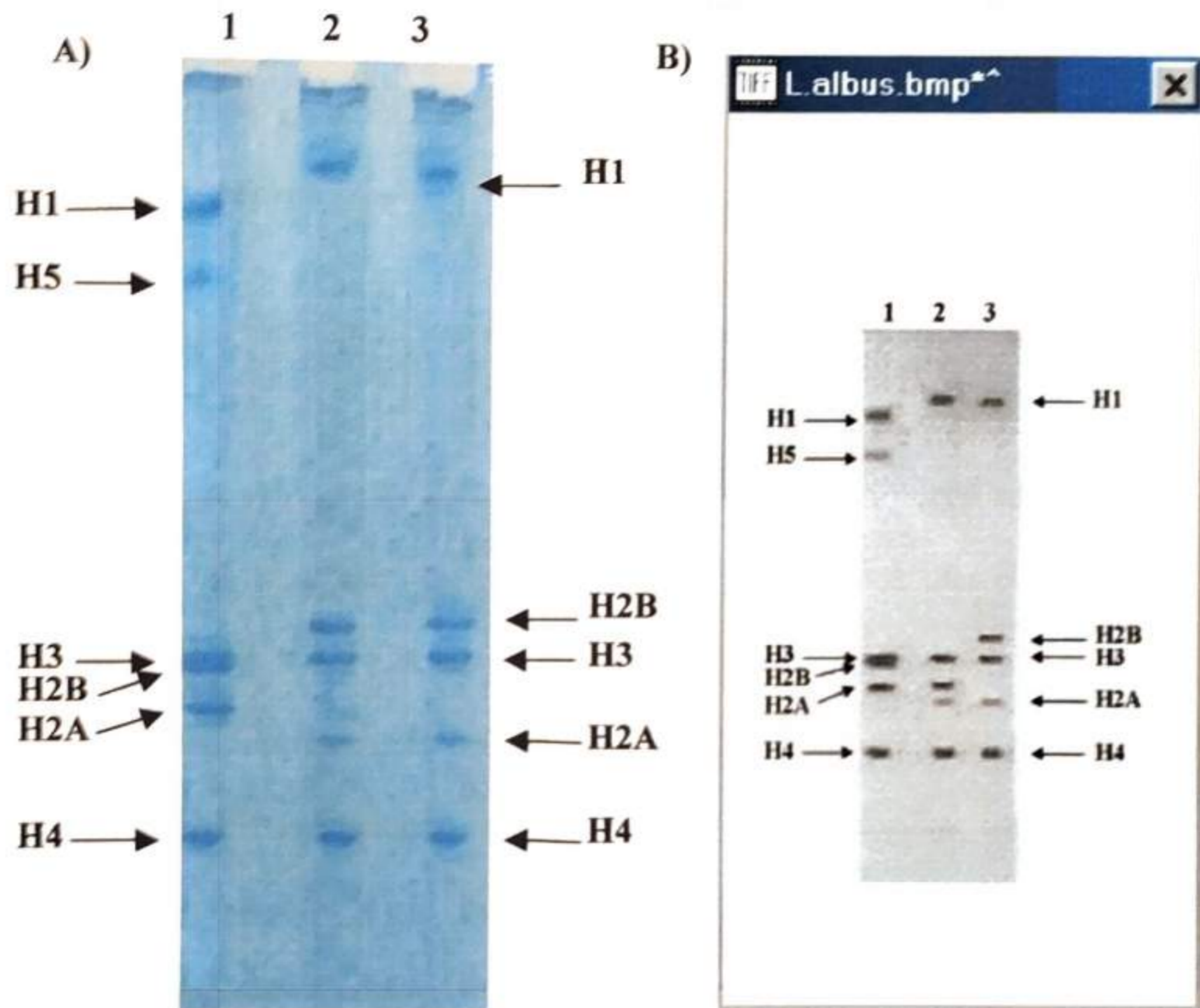


Figura 1A) Muestra el gel de poliacrilamida, urea, ácido acético (Urea-AA-PAGE) en el *carril* 1 fueron colocadas proteínas básicas nucleares de eritrocito de pollo; en el *carril* 2 y 3 las muestras de proteínas básicas de esperma de *Loxechinus albus*. En **1B)** Puede apreciarse el mismo gel a través del software Scion Image v.B.4.0.2, el archivo de imagen esta en Formato TIFF.

4.2. Purificación y Cuantificación de las Proteínas Básicas Nucleares Espermioespecíficas.

4.2.1 Purificación de las Proteínas Básicas Nucleares Espermioespecíficas.

Empleando el software Image J V. 1.32j, en donde se muestra el grado de pureza de las histonas que se correlaciona con el grado de separación de las mismas (Figura 2), los picos observados corresponden a las bandas proteicas de las histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4 del eritrocito de pollo y las segundas corresponden al *Loxechinus albus*. Las ordenadas corresponden al grado de nivel de grises, siendo el pico más alto el que presenta mayor concentración de color, las abscisas corresponden al ancho de las bandas y las longitudinales corresponden a las distancias corridas en el gel. Observe que la histona H2B y H3 del eritrocito de pollo se aprecia como un solo pico, pero por cuestiones didácticas ha sido coloreado para comparar la posición de la H2B en ambas especies.

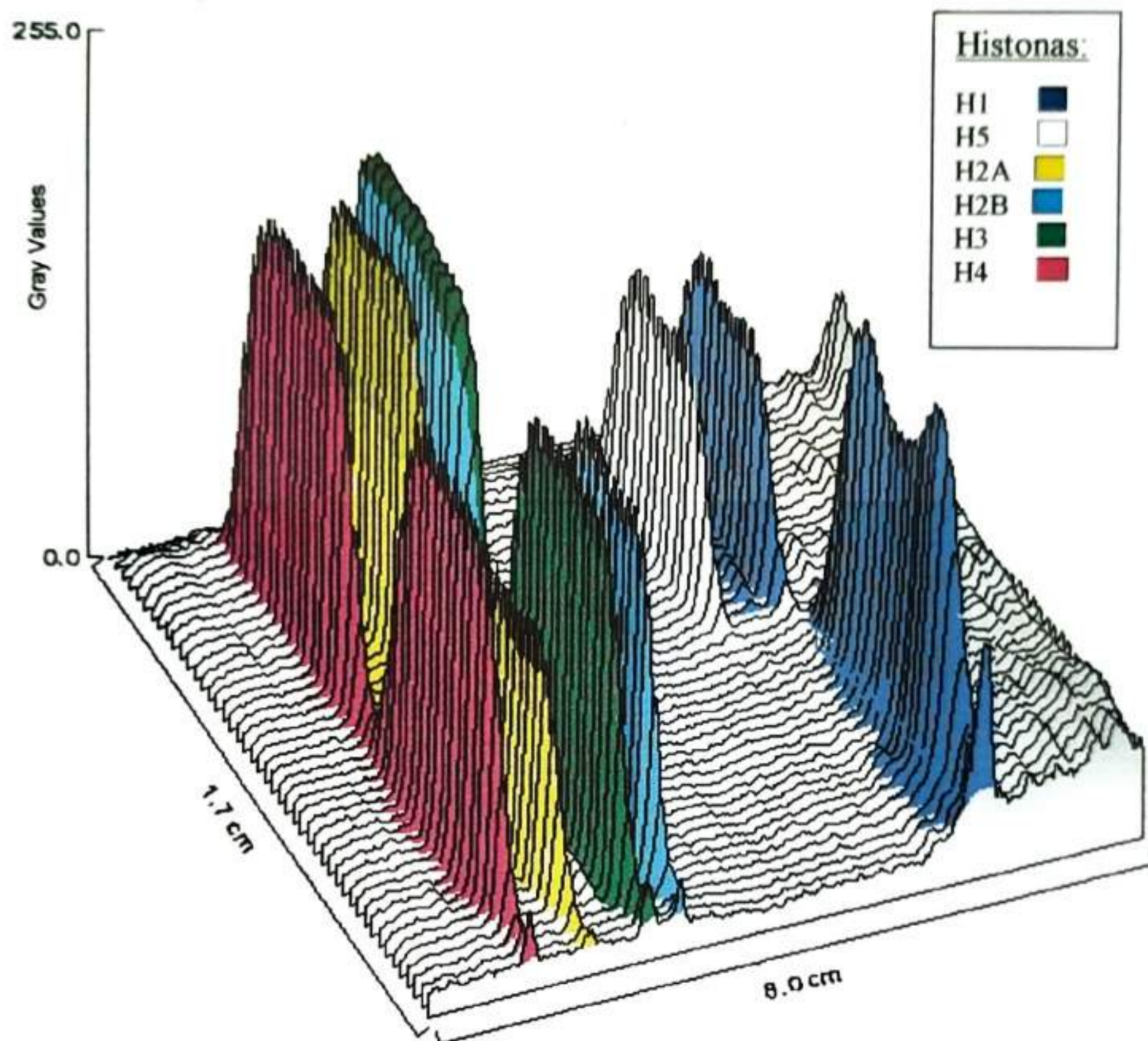


Figura 2. Bandas tridimensionales de las histonas espermioespecíficas según el software Image J.

4.2.2 Cuantificación de las proteínas básicas nucleares espermioespecíficas.

De acuerdo a la figura 3(A) del electroforegrama nos indica que los picos mas pronunciados corresponden a las histonas H1, H5, H3, H2B, H2A y H4 del eritrocito de pollo. Respecto a la Figura 3(B) el electroforegrama corresponde a histonas H1, H2B, H3, H2A y H4 de *Loxechinus albus*, y los valores en cada uno de los picos en 3(B) indican el área en píxeles bajo los picos, los cuales corresponden a las siguientes proporciones de histonas de *Loxechinus albus*: H1: 17,9%; H2B: 21,4%; H3: 22,5%; H2A: 11% y H4: 27,2%.

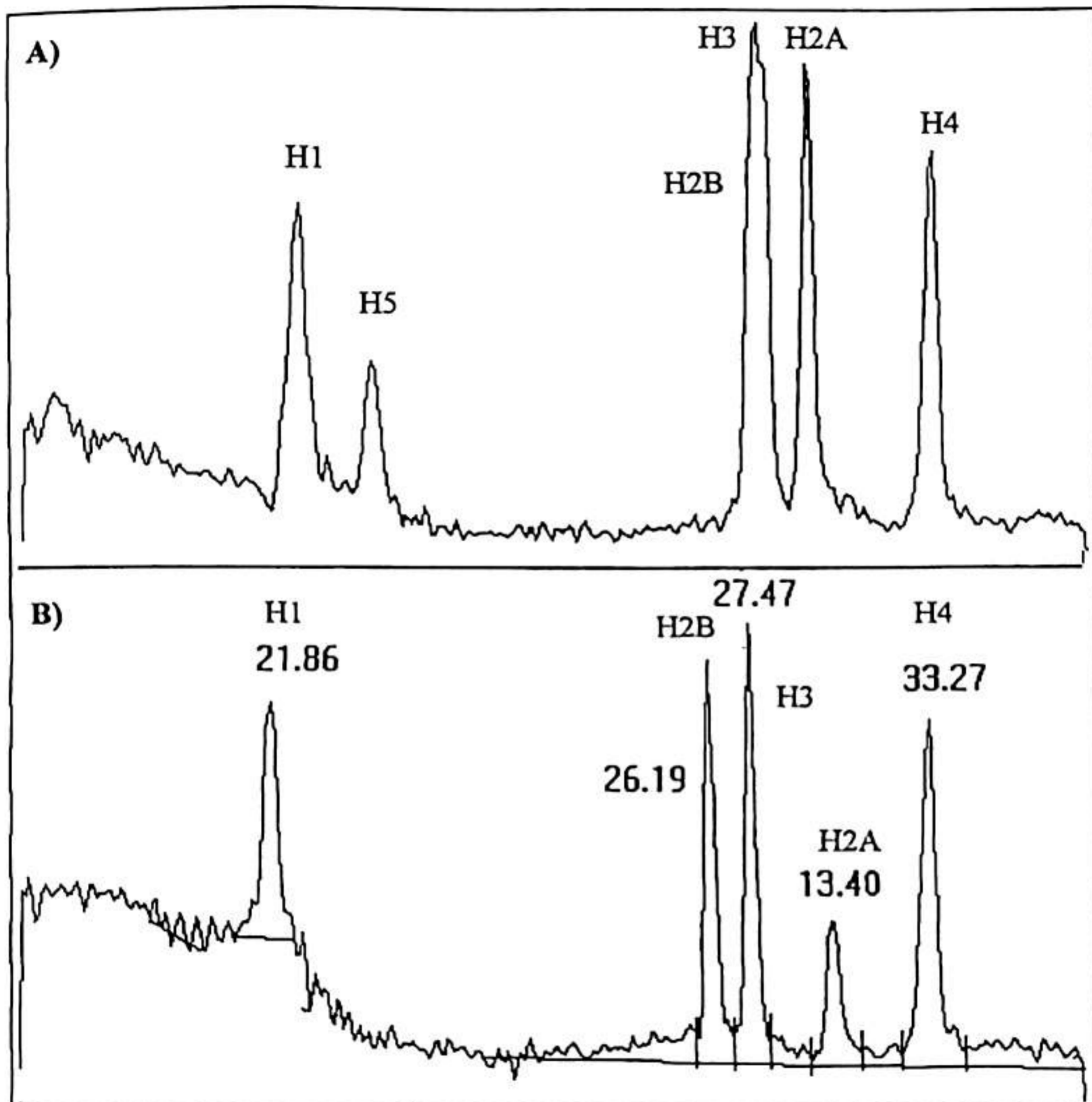


Figura 3: Electroforegramas de histonas H1, H5, H3, H2A y H4 del eritrocito de pollo (A) y de histonas H1, H2B, H3, H2A y H4 de *L. albus* (B), obtenidos usando el software Scion Image. Los valores en (3B) indican el área en píxeles bajo los picos, los cuales corresponden a las siguientes proporciones de histonas de *L. albus*: H1: 17,9%; H2B: 21,4%; H3: 22,5%; H2A: 11% y H4: 27,2%.

5.3 Caracterización Electroforética de las Proteínas Básicas Nucleares

Espermioespecíficas

Determinación del Peso Molecular

En la Figura 4 se observan los densitogramas de las dos especies, en 4(A), se aprecia los picos de densidad óptica y la distancias recorridas por las histonas, las mismas que fueron medidas y llevadas a una unidad de movilidad relativa (Rf) (Anexo 1, Cuadro 1), Las histonas de *Loxechinus albus* se calcularon de acuerdo a su movilidad relativa en el gel de electroforesis comparando con los valores de movilidad relativa de las histonas de eritrocito de pollo (Anexo 1, Fig. 5). De lo cual se determina que los Pesos moleculares de las histonas de *Loxechinus albus* son: H1 (23 700 Da), H2B (15 700 Da), H3 (15 300 Da), H2A (13 400 Da) y H4 (11 300 Da). En la figura 4(B), se observa el densitograma correspondiente a las cinco histonas de *L. albus*, en la cual se puede calcular la concentración de proteínas en cada banda de histonas.

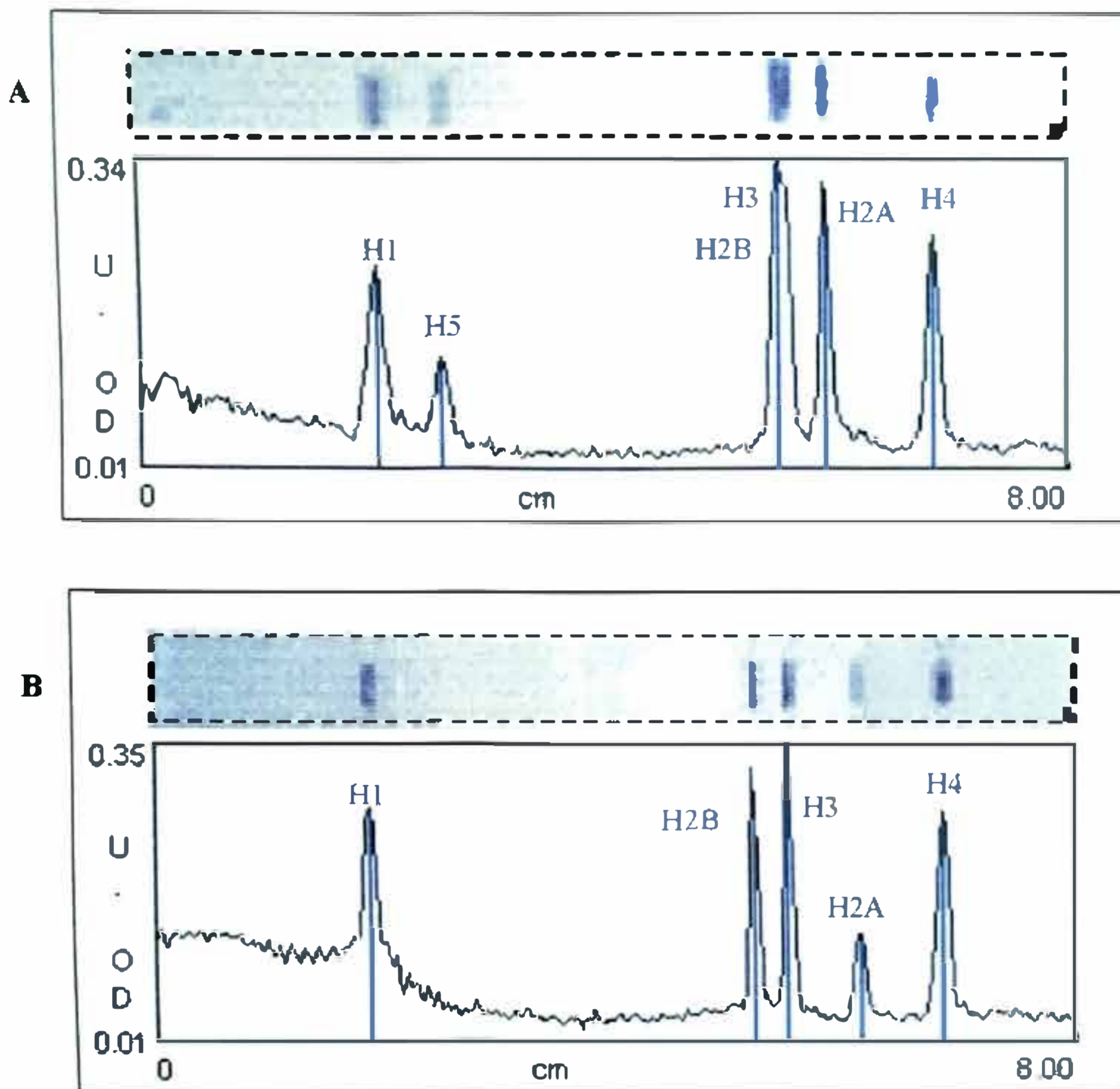


Figura 4. Densitogramas de histonas de eritrocito de pollo (A) y de *L. albus* (B). este gráfico también es útil para determinar el peso molecular de las histonas dependiendo de su carga y masa molecular al recorrer una distancia de 8 cm de gel. El análisis se realizó usando el programa de análisis de geles Scion Image Beta 4.0.2 para Windows.

V. DISCUSIÓN

Los espermatozoides obtenidos por desove inducido fueron biológicamente activos, observándose que poseen motilidad y capacidad de fertilizar oocitos extraídos por el mismo método. Se utilizaron cantidades significativas de núcleos espermáticos a partir de esperma conservado en glicerol al 60%, siguiendo el procedimiento indicado en Material y Métodos.

El estudio de las proteínas espermioespecíficas del núcleo de células espermáticas de la especie analizada ha permitido mostrar las diferencias que existen entre el erizo rojo *Loxechinus albus* y eritrocito de pollo por medio de la electroforesis en gel de poliacrilamida.

La separación de proteínas por electroforesis se basa en la capacidad que tienen las proteínas de migrar en un campo eléctrico, éstas contienen grupos iónicos que atendiendo a su relación carga/masa presentan una migración diferencial en una disolución gelificada al someterlas a un campo eléctrico. Este tipo de geles permiten separar proteínas básicas como las histonas y protaminas. La poliacrilamida actúa como un medio de soporte (fibras de acrilamida con puentes de bisacrilamida); la urea es un agente desnaturizador que elimina las

interacciones entre proteínas; el ácido acético crea un medio ácido impidiendo que las proteínas permanezcan neutras. El TEMED, actúa como catalizadores de la polimerización.

El contenido de las proteínas básicas histónicas de los núcleos del espermatozoide de *L. albus* se muestra en la Fig. 1A y 1B, con las proteínas de los núcleos de eritrocito de pollo por comparación. De acuerdo con el trabajo con otros equinodermos como la estrella de mar (Zalenskaya et al., 1980; Massey y Watts, 1992) las histonas core del nucleosoma espermático muestran un patrón de migración típico de núcleos somáticos, y no contiene la histona más grande H2B presente en el espermatozoide del erizo de mar (von Holt et al., 1984). En *Loxechinus albus* la presencia de la histona H1 es notoria como una banda de menor velocidad de migración que las histonas tipo somáticas, un rasgo aparentemente compartido por todos los espermatozoides de equinodermos como en *Tetrapigus niger* y *Parechinus angulosus* (Reyes et al, 2001). La Histona H2A son menos eficientemente teñidos con Coomassie Blue que otras histonas, un hecho al parecer común entre los equinodermos.

La extracción de las proteínas básicas espermioespecíficas con HCL 0,4N, fue realizada de acuerdo a los métodos establecidos por Subirana et.al., 1973; Chiva et.at., 1990), el cual permitió obtener el patrón electroforético que se aprecia en la Fig. 1.

La purificación de proteínas básicas específicas del esperma permitió obtener proteínas con alto grado de pureza en función a su capacidad de solución en ácidos (HCL 0,4N) por ser básicas, logrando separarlas de las proteínas no histónicas insolubles en medios ácidos y su centrifugación a 14 000 rpm por 20 min. La precipitación con acetona permitió obtener proteínas altamente purificadas para el presente estudio.

No obstante la homogeneidad puede lograrse por cromatografía de exclusión molecular o cromatografía de intercambio iónico, electroforesis sobre geles de poliacrilamida y enfoque isoelectrico, los cuales poseen mayor capacidad de resolución y pueden detectar fácilmente la presencia de impurezas proteicas de menor cuantía. Pero se aprecia una buena separación de las histonas tal como se observa en la Fig. 2, lo cual indica un buen grado de pureza, las mismas que pueden ser analizadas y cuantificadas como porcentajes de histonas de *Loxechinus albus*: H1: 17,9%; H2B: 21,4%; H3: 22,5%; H2A: 11% y H4: 27,2% (Fig. 3). Estos valores indican la cantidad de histonas aislada de los nucleosomas espermáticos, los cálculos obtenidos con el software no son muy fiables para el caso de H2A, pues éste analiza intensidades de color y dicha histona no se tiñe eficientemente con el Coomassie blue, por tanto este valor es un poco subjetivo.

Con el objeto de obtener una alta resolución de las histonas estudiadas, se empleó el procedimiento descrito por Panyim y Chalkley (1969). La determinación de los pesos moleculares de las proteínas por electroforesis ha llegado a ser un procedimiento de rutina en el laboratorio. La electroforesis en gel de poliacrilamida proporciona un método de fácil ejecución, económico y poderoso para la caracterización molecular de las proteínas. El peso molecular de una proteína bajo investigación es determinado por comparación de su movilidad electroforética con proteínas estándares de peso molecular conocido (Anexo 1, Figura 5).

Las proteínas con una alta carga positiva se vuelven insolubles en detergentes cargados negativamente como el SDS; por ello Colom y Subirana (1979) validaron un método en el que la movilidad relativa es inversamente proporcional al logaritmo del número de residuos de aminoácidos. Ellos realizaron el experimento en un gel de poliacrilamida ácido acético-urea utilizando un polímero de iridina como estándar. Posteriormente Ausió y Subirana (1982) realizaron estudios para la determinación de pesos moleculares de proteínas básicas por equilibrio de sedimentación y gel de electroforesis, en donde se aplica una fórmula de densidad de carga, con lo que se obtiene valores más exactos que los reportados por Colom y Subirana (1979).

En el presente trabajo para la curva de calibración se utilizaron histonas de eritrocito de pollo. Aunque la curva de calibración resulta bastante aparente, este método puede considerarse como indicativo en la determinación del peso molecular. Empleando el software Scion Image V.B.4.0.2 se obtuvo los pesos moleculares de las histonas de *L. albus* correspondientes a; H1 (23 700 Da), H2B (15 700 Da), H3 (15 300 Da), H2A (13 400 Da) y H4 (11 300 Da) (Fig. 4).

Por otro lado, la condensación nuclear espermiogénica es un proceso prácticamente universal. Este hecho contrasta con la gran diversidad que exhiben las proteínas espermáticas (PBNE), tanto en su composición como en su estructura. Esta variabilidad las convierte en un modelo muy interesante para estudiar los diversos mecanismos implicados en producir el cambio evolutivo de proteínas cuya única restricción sea la de mantener la condensación del material genético.

De acuerdo a la hipótesis vertical ($H \rightarrow PL \rightarrow P$) de Subirana y col (1973) sólo histonas (tipo H) o los precursores PL estarían presentes en los grupos de metazoos primitivos, mientras que los más especializados tipos PL y P serían mayormente prevalecientes en el esperma de organismos de niveles filogenéticos superiores de las ramas de deuterostomados y protostomados (Ausió, 1999). Las razones para la reversión recurrente al tipo H y la conservación de la tendencia de

H→PL→P, con el tipo P siempre presente en las especies en la punta de las ramas evolutivas, no está aún claro (Anexo 2, Fig .7 y Anexo 3, Fig.8). La fertilización interna puede ser un factor que establece el mantenimiento de la selección de protaminas en los peces cartilagosos y tetrápodos más altos como los reptiles, pájaros, y mamíferos (Kasinsky 1989). No obstante, el parecido de esta transición a aquellos observados durante la espermatogénesis quizás sea una reflexión de los cambios ontogénicos que acompañan cada uno de los estallidos filogenético mayores, como ya había sido anticipado intuitivamente por David Bloch (1969) (Anexo 2, Fig.6).

En los equinodermos, el esperma retiene histonas del tipo-somático que incluye el esperma-específico favorablemente especializado SpH1 y SpH2B, variantes de histonas que están presumiblemente involucradas, en el estado compactado de la cromatina en el esperma (Poccia 1995).

Por otra parte, la heterogeneidad de histonas espermáticas también difiere de los patrones bien establecidos de variabilidad de histona. Como se reporta para la histona H1, la cual tiene la variación más alta entre las distintas células, tejidos y especies, Von Holt. 1985. Pero en el caso de SpH1 de esperma del erizo de mar, está representado por una sola forma en todas las especies analizadas hasta ahora. Además, la variación de las dos histonas que forman el dímero nucleosomal es distintiva para cada uno; SpH2A es representada por una sola forma, mientras

SpH2B esta representado por más de una isoforma von Holt (1985) y trabajos comparativos realizados en histonas de *Tetrapigus niger* (Orden Arbacioida) y *Parechinus angulosus* (orden Echinoida), confirman esta variabilidad en los equinodermos, Reyes (2001). Estos resultados confirman que la histona espermática H2B no sigue la misma historia evolutiva como SpH2A en los erizos de mar ancestrales. Por consiguiente, la evolución de spH2B espermático es una excepción a la historia evolutiva de histonas de H2B. *Loxechinus albus* pertenece al orden Echinoida en él se han observado la presencia de solo histonas (tipo H) y la característica general en los equinodermos como son la presencia de H1 y H2B de mayor peso molecular que aquellas presentes en histonas somáticas.

VI. CONCLUSIONES

1. Se ha logrado obtener las proteínas básicas espermioespecíficas del “erizo rojo” *Loxechinus albus*, correspondientes a las histonas core (H2A, H2B, H3 y H4) y la histona linker (H1). No se han observado proteínas del tipo protaminas.
2. Se han caracterizado las siguientes proteínas básicas espermioespecíficas del “erizo rojo” *L. albus* : H1 (23 700 Da), H2A (13 400 Da), H2B (15 700 Da), H3 (15 300 Da) y H4 (11 300 Da).
3. Las proporciones obtenidas en cada fracción de proteínas básicas espermioespecíficas fueron: H1 (17,9%), H2B (21,4%), H3 (22,5%), H2A (11%) y H4 (27,2%), siendo la histona H4 la de mayor proporción.
4. La histona H2B mantiene la característica de su baja movilidad electroforética y alto peso molecular observado en otros equinodermos.
5. La histona H4 es la más conservada respecto a las demás histonas seguido de la histona H3.

VII. RECOMENDACIONES

1. Ampliar la caracterización de las proteínas básicas espermioespecíficas del “erizo rojo” *Loxechinus albus*, Molina, 1782 para permitir la separación, aislamiento y purificación por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) y determinar la composición de aminoácidos en moles por ciento de cada una de las histonas.
2. Otros aspectos más específicos es la determinación de los niveles de acetilación en los aminoácidos lisina de cada una de las proteínas nucleosomales para estudios de la expresión génica. Este estudio si se profundiza permitirá la localización de genes activos en la cromatina espermática para establecer el genoma de esta especie.
3. También es necesario continuar con los estudios a nivel molecular sobre los aspectos reproductivos, a fin de permitir la conservación de esta especie cuya importancia alimenticia hace que sea depredada actualmente, ya que constituye una fuente generadora de divisas para nuestro país.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AALFS J., and KINGSTON R.(2000) What does 'chromatin remodeling' mean? *TIBS* 25, 548-555
2. ADKINS N., WATTS M., and GEORGEL, P. (2004). To the 30 nm chromatin fiber and beyond, *Bioch et Biophysica Acta*, 1677, 12– 23.
3. ALLARD S., MASSON J., and COTÉ J. (2004) Review Chromatin remodeling and the maintenance of genome integrity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1677, 158-164.
4. AUSIO J. (1986) Structural variability and compositional homology of the protamine-like components of the sperm from the bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B, 439-449
5. AUSIO J. (1995) Histone H1 and the evolution of the nuclear spermspecific proteins. In: Jamieson BGM, Ausio J, Justine JL (eds) Advances in spermatozoal taxonomy and phylogeny.: Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle 166:447–462
6. AUSIÓ J. (1999). Histone H1 and Evolution of Sperm Nuclear Basic Proteins. *J. Biol Chem*, 274(44), 31115-31118.
7. AUSIÓ J. and SUBIRANA J. (1982). Conformational study and determination of the molecular weight of highly charged basic proteins by sedimentation equilibrium and gel electrophoresis. *Biochemistry*, 21, 5910- 5918.
8. BLOCH D. 1969 A catalog of sperm histones. *Genetics (suppl)* 61:93-111

9. BÜCKLE L, ALVEAL K, TEREFIÑO E, GUIADO C, CÓRDOVA L, & VALENZUELA J. (1980) Biological studies on the Chilean sea urchin *Loxechinus albus* (Molina) (Echinodermata: Echinoidea). Food analysis and seasonal feeding rate. *Anal. Cen. Cien. Mar. Limnol. Univ. Nac. Auton. (Mexico)*. 7:149-158
10. COLOM J. & SUBIRANA J. (1979) Protamines and related proteins from spermatozoa of molluscs: characterization and molecular weight determination by gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Acta*, 581:217-227
11. CASTELLANOS R., (1998). Aislamiento, purificación y caracterización de proteínas básicas espermioespecíficas de *Argopecten purpuratus*. Tesis Magistral. Fac. Medicina. UNMSM, Lima.
12. CHIVA M, KASINSKY H. & SUBIRANA J. (1987). Characterization of protamines from four avian species. *FEBS Lett.* 215 (2), 237-240.
13. CHIVA M, KULAK D, and KASINSKY H. (1989). Sperm basic proteins in the turtle *Chrysemys picta*: Characterization and evolutionary implications. *The journal of experimental zoology.* 249 : 329-333
14. FINCH J, KLUG A. (1976) Solenoidal model for superstructure in chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73 1897– 1901.
15. GARCÍA H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ. Diag.* 1(2), 31-41.
16. GUEVARA L. (1980). Estructura de la cromatina de los espermatozoides del Erizo *Tetrapyrgus niger*: Caracterización de los nucleosomas. Tesis de Maestría. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

17. HAMMERMANN M, TÓTH K, RODEMER C., WALDECK W, MAY R, and LANGOWSKI J. (2000) Salt-Dependent Compaction of Di- and Trinucleosomes Studied by Small-Angle Neutron Scattering *Biophys J*, **79**(1), 584-594.
18. IMSCHENETZKY M, PUCHI M, MORIN V, MEDINA R, MONTECINO M. (2003). Remodeling during sea urchin early development: molecular determinants for pronuclei formation and transcriptional activation *Gene* **322**, 33-46
19. INSTITUTO DEL MAR DEL PERU (2000). Dirección de Evaluación de Invertebrados Marinos. Seguimiento de la pesquería de invertebrados marinos en el litoral peruano.
20. KASINSKY H. (1989) Specificity and distribution of sperm basic proteins. In *Histones and Other Basic Nuclear Proteins* (Hnilica L, Stein G, and Stein J. eds) , pp. 73-163
21. KASINSKY H., LEWIS, J., DACKS, J. and AUSIÓ., J. (2001). Origin of H1 linker histones. *The FASEB Journal*, **15**, 34-42.
22. KORNBERG R. & THOMAS J. (1974). Chromatin structure: Oligomers of histones. *Science* **184**, 865-868.
23. KORNBERG R. & THOMAS J. (1975). An octamer of histones in chromatin and free in solution. (di-imidoester crosslinking / dimers). *Proc.Nat. Acad..Sct.USA. (Biochemistry)*.**72**(7), 2626-2630
24. LEWIS J, SAPERAS N, SONG Y, ZAMORA M, CHIVA M, and AUSIÓ J. (2004) Histone H1 and the origin of protamines PNAS **101** (12): 4148-4152.

25. LUGER K, MADER A., RICHMOND R, SARGENT D. & RICHMOND T.(1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251 – 260.
26. MAHER, B. (2003). The Histone Code Volume 17 | Issue 2 | 13 | Jan. 27, The Scientist Inc.
27. MASSEY, C. B. AND WATTS, S. A. (1992). Patterns of sperm-specific histone variation in sea stars and sea urchins: primary structural homologies in the N-terminal region of spermatogenic H1. *J. Exp. Zool.* **262**, 9-15.
28. MEZQUITA C., TENG C. (1977) Studies on a protamine (galline) from fowl sperm. *Int.J.Pept.Prot.Res.***8**:565-578
29. NEELIN J. (1968) Variability in cell-specific and common histones of avian erythrocytes. *Can. J. Biochem.* **46**, 241-247
30. OYARZÚN S, MARÍN S, VALLADARES C. & IRIARTE J.(1999) Reproductive cycle of *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea) in two areas of the Magellan region (53°S, 70-72°W), Chile . *Sci. Mar.*, **63**: 439-449
31. PANYIN S, and CHALKLEY R. 1969. High resolution acrylamida gel electrophoresis in histones. *Arch, Biochem Biophys* **130**, 337-346.
32. PIDOUX A, MELLONE B, & ALLSHIRE R. (2004). Analysis of chromatin in fission yeast. *Methods* **33**: 252–259
33. POCCIA, D., 1995. - Male germ line specific histones of sea urchins and sea stars. *In*: JAMIESON, B. G. M., AUSIO, J., & JUSTINE, J.-L. (eds),

Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy. *Mém. Mus. natn. Hist. nat.*, 166 : 475-489

34. RAMAKRISHNAN V. (1997) Structure of histone and nucleosome organization. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 83-112.
35. RECILLAS F. (2000) La estructura de la cromatina y su relación con la regulación de la expresión genética. *BEB*, 20(1), 6-8.
36. REYES E, MORIN V, SCHWAGER S, PUCHI M, BUSTOS P, IMSCHENETZKY, M. (2001). Variability of sperm specific histones in sea urchins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 128: 451_457
37. RUIZ-CARRILLO A, PUIGDOMENECH P, EDER G. & LURZ R (1980). Stability and reversibility of higher ordered structure of interphase chromatin: continuity of deoxyribonucleic acid is not required for maintenance of folded structure. *Biochemistry* 19, 2544-2554.
38. SAPERAS N, CHIVA M, PFEIFFER D, KASINSKY H, & AUSIÓ J. (1997) Sperm Nuclear Basic Proteins (SNBP) of Agnathans and Chondrichthyans: Variability and Evolution of Sperm Proteins in Fish. *J.Mol Evol*, 44, 422-431.
39. SAPERAS N, BUESA C, ABIÁN J, VANDEKERCKHOVE J, KASINSKY H, & CHIVA M. (1996). The Primary Structure of a Chondrichthyan Protamine: A New Apparent Contradiction in Protamine Evolution. *J Mol Evol*, 43, 528-535.
40. SHIRES A, CARPENTER M. CHALKLEY R. (1975) New histones found in mature mammalian testes. *Cell Biol/Proc.Nat.acad.Sci.USA* 72, 2714-2717.

41. SPIKER, 1982 En plantas superiores se presentan variantes con pesos moleculares elevados). Histone variants in plants. Evidence for primary structure variants differing in molecular weight *J. Biol. Chem.*, 257: 14250 - 14255.
42. STRICKLAND et al. 1974. Sequence of the cysteine-containing portion of histone F2al from the sea urchin *Parechinus angulosus*. *FEBS Lett.* 1; 40(2):346-8.
43. SUBIRANA J, COZCOLLUELA C, PALAU J, and UNZETA M. (1973) Protamines and other basic proteins from spermatozoa of molluscs. *Biochim. Biophys. Acta* 317, 364-379
44. USACHENKO, S., GAVIN, I., and BAVYKIN, S. (1996). Alterations in Nucleosome Core Structure in Linker Histone-depleted Chromatin *JBC*. 271(7), 3831-3836.
45. VAN HOLDE, K. (1988) Chromatin, pp. 289-343, Springer Verlag, New York
46. VAN HOLDE, K., ZLATANOVA, J. (1995) Chromatin Higher Order Structure : Chasing a Mirage ? *JBC* 270 (15), 8373-8376.
47. VÁSQUEZ, J. (2001). Ecology of *Loxechinus albus* In: LAWRENCE, J.M. (ed) Edible sea urchins: Biology and Ecology. Developments in Aquaculture and *Fisheries Science* 32. 161-175.
48. VERREAULT, A. (2000) De novo nucleosome assembly : new pieces in an old puzzle. *Genes & Development* 14(12): 1430-1438

49. VON HOLT C, DE GROOT P, SCHWAGER S. & BRANDT W. (1984) In *Histone Genes: Structure, Organization, and Regulation* (ed. G. Stein, J. Stein and W. Mazluff). John Wiley and Sons.
50. VON HOLT C. 1985. Histones in perspective. *Bio Essay* 3, 120_124.
51. WOODCOCK C. & DIMITROV S. (2001) Higher-order structure of chromatin and chromosomes, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 130– 135.
52. WORKMAN J, KINGSTON R. (1998) Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev. Biochem.* 67, 545–79.
53. WU J, and GRUNSTEIN M. (2000) 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *TIBS.* 25, 619-623.
54. WU G, MCARTHUR A, FISER A, ALI A, SOGIN M, & MULLER M. (2000) Core Histones of the Amitochondriate Protist, *Giardia lamblia*. *Mol.Biol. Evol.* 17(8), 1156–1163.
55. ZALENSKAYA I, ZALENSKAYA E. & ZALENSKY A. (1980) Basic chromosomal proteins of marine invertebrates-II. Starfish and Holothuria. *Comp. Biochem. Physiol.* 65B, 375-378
56. ZAMORA S, STOTZ W. (1994) Cultivo masivo en laboratorio de juveniles de erizo *Loxechinus albus* (Molina, 1782), (Echinodermata: Echinoidea). *Invest.Pesq.* (Chile) 38: 37-54
57. www.scioncorp.com

Software de análisis de imágenes de dominio público Scion Image Beta 4.0.2 para Windows. 2000 (Desarrollado en el Instituto Nacional de Salud de los ESTADOS UNIDOS).

APÉNDICE

ANEXOS

Anexo 1: Cuadro 1. Peso Molecular y movilidad relativa de las histonas de eritrocitos de pollo y *Loxechinus. albus*

Figura 5. Determinación del Peso Molecular de las proteínas básicas espermioespecíficas de células espermáticas de *L. albus* en PAGE ácido acético-Urea al 15%.

Anexo 2: Figura 6: Principales tipos de PBNE y sus transiciones durante la espermatogénesis en diferentes grupos de metazoos.

Figura 7: Representación esquemática de las relaciones filogenéticas de los grupos principales de deuterostomas.

Anexo 3: Figura 8: Representación esquemática de la evolución de los principales tipos de PBNE.

Anexo 4: Figura 9: Diagrama esquemático de la evolución del motivo hélice-alado en la histona H1 linker de protistas.

Anexo 5: Figura 10: Variación geográfica del periodo de reproducción de *Loxechinus albus* a lo largo de la costa chilena (modificado de Zamora y Stotz 1992) por Vásquez (2001).

Anexo 6: Figura 11: Aislamiento y Purificación de Núcleos Espermáticos de *Loxechinus albus*.

Anexo 7: Figura 12: Extracción de Proteínas Básicas Nucleares espermioespecíficas de *Loxechinus albus*.

Anexo 8: Gel de electroforesis PAGE – AA - UREA

Anexo 9: Buffer Muestra: 2X

Anexo 10: Solución de tinción: Coomassie blue R-250

Anexo 11: Figura 12: Localización de cromatina en célula somática.

Anexo 12: Figura 13: Estructura de la cromatina en eucariotas

Anexo 13: Figura 14: Estructura del nucleosoma.

Cuadro 2: Características de las proteínas histónicas.

ANEXO 1

Cuadro 1. Peso Molecular y movilidad relativa de las histonas de eritrocitos de pollo y *Loxechinus. albus*

Histona	PM (kD)	Rf del eritrocito de pollo	Rf de <i>L.albus</i>	PM <i>L.albus</i>
H1	21 500	0,25	0.24	23 700
H5	----	----	----	----
H3	15 300	0,69	0.69	15 300
H2A	13 800	0,74	0.77	13 400
H2B	----	----	0.65	15 700
H4	11 300	0,86	0.86	11 300

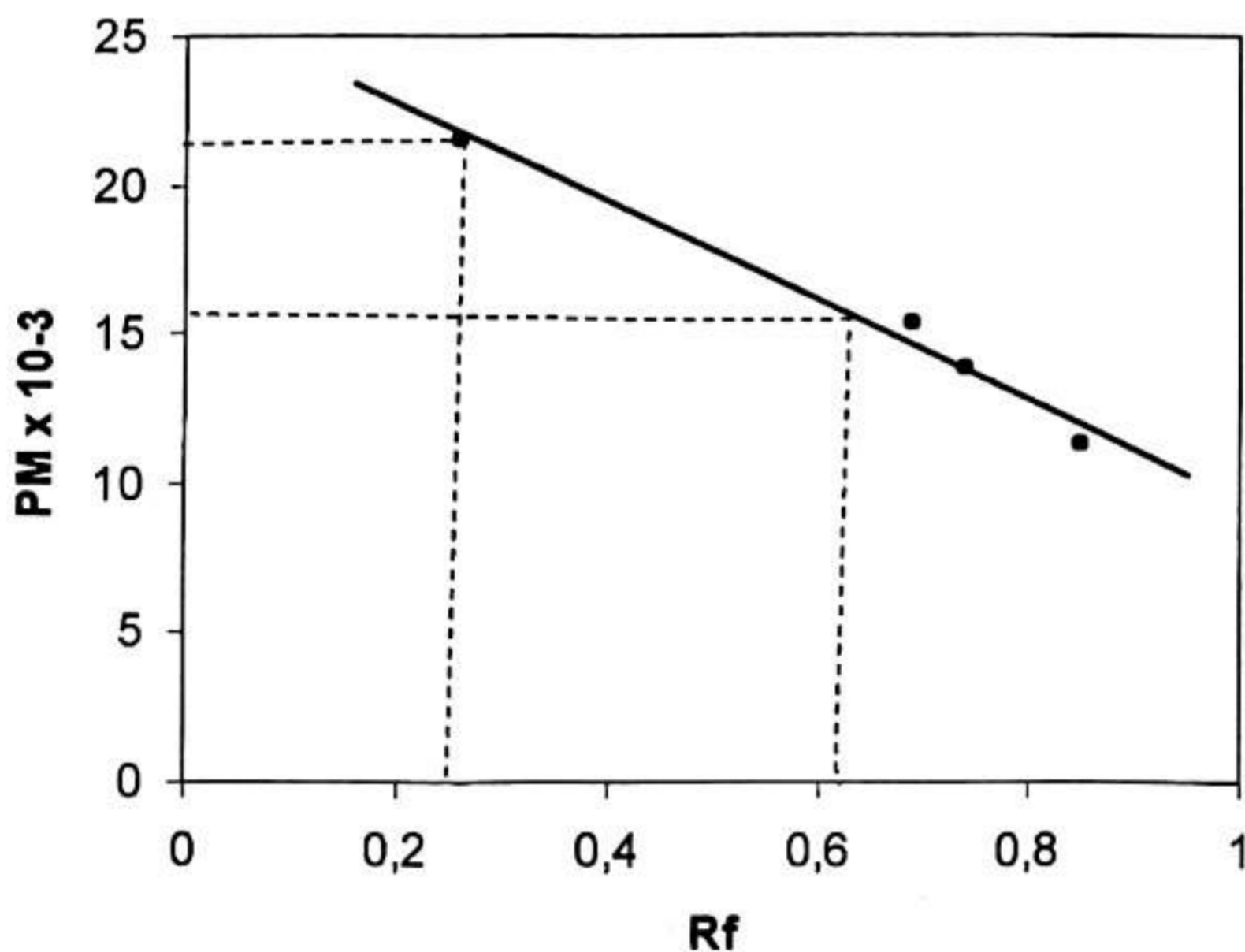


Figura 5: Determinación del Peso Molecular de las proteínas básicas espermioespecíficas de células espermáticas de *L. albus* en PAGE ácido acético-Urea al 15%.

ANEXO 2

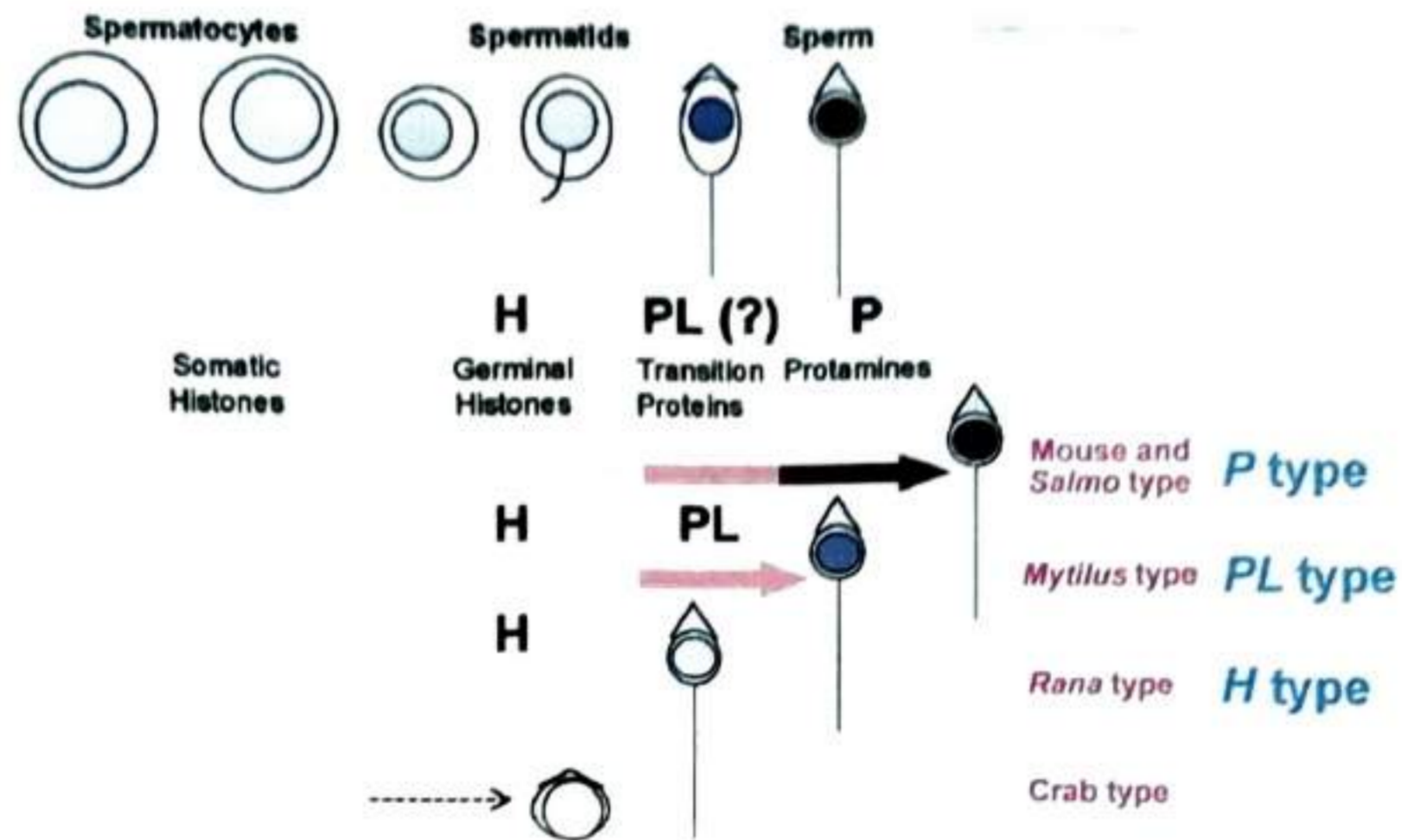


Figura 6: Principales tipos de SNBP y transiciones de PBNE durante la espermatogénesis en diferentes grupos de metazoos. Los patrones de desarrollo espermatogénico y las transiciones asociadas a PBNE se muestran a la izquierda. Las PBNE para cada transición en negro. La clasificación de los principales tipos de PBNE de acuerdo a Bloch y en verde de acuerdo a Ausió.

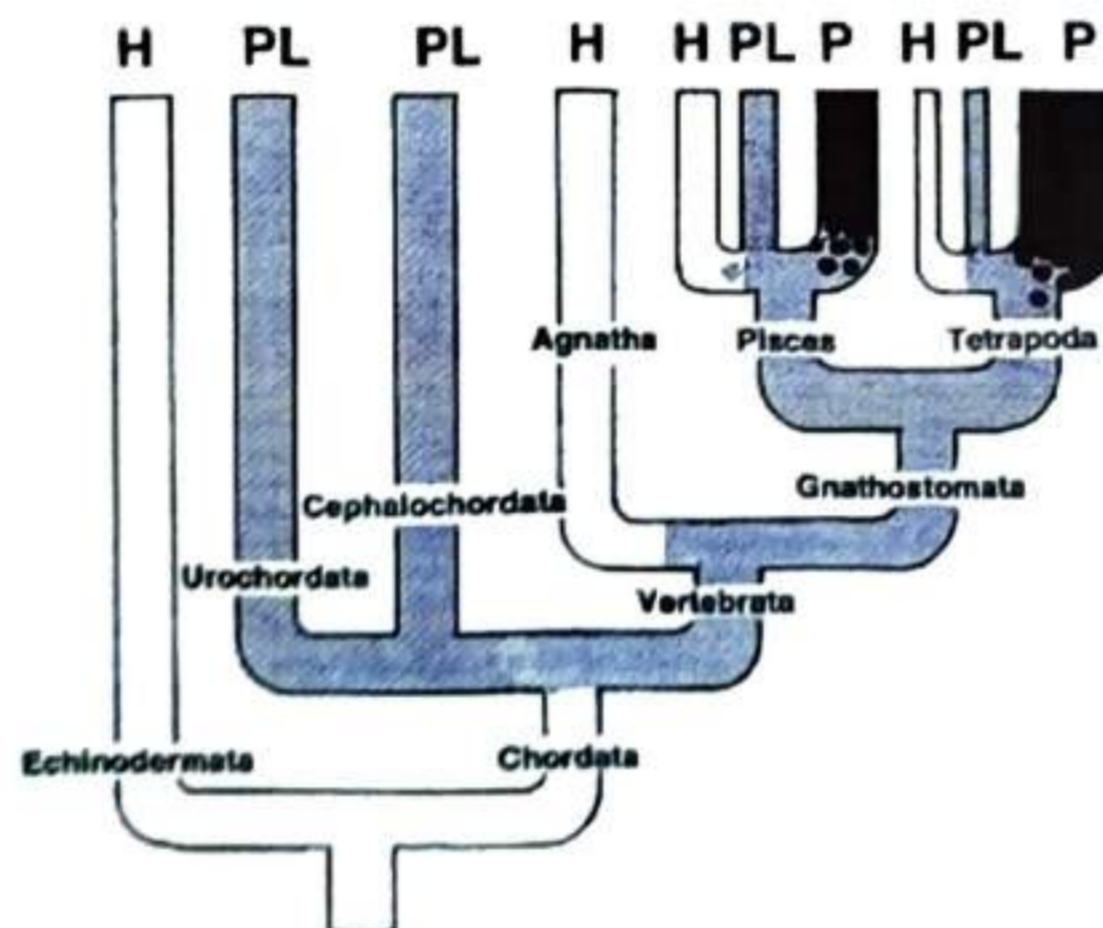


Figura 7: Representación esquemática de las relaciones filogenéticas de los grupos principales de deuterostomas (adaptado de Brusca y Brusca 1990; y Stock y Whitt 1992) describe los cambios que han ocurrido entre los diferentes tipos de PBNE. H, PL y P.

ANEXO 3

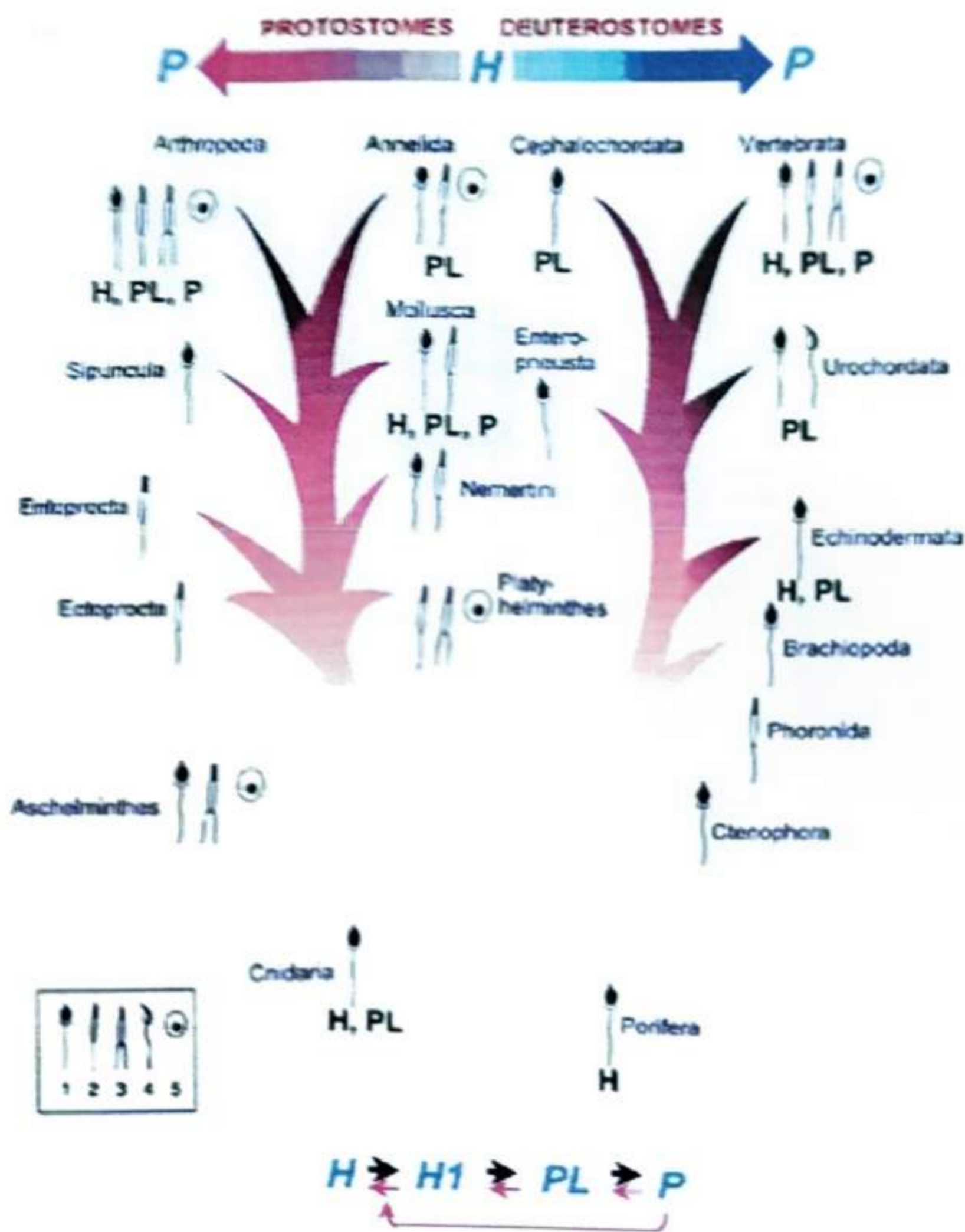


Figura 8: Representación esquemática de la evolución de los principales tipos de SNBP. Adaptado de Nielsen (1995) en una representación original por Franzén, 1987 (de la incidencia filogenética de diferentes tipos de espermatozoides). El modelo básico de la evolución entre los diferentes tipos de PBNE se muestra en la base del árbol con flechas negras. *H*, precursor de la primitiva proteína histona; *H1*, precursor de la primitiva histona H1 espermática; *P*, protamina. Las flechas rojas indican la existencia de reversiones. En negro las PBNE presentes en diferentes grupos taxonómicos. Las flechas coloreadas en rosa y azul indican la dirección de la tendencia evolucionista de la proteína primitiva histona a protamina en los protostomados y deuterostomados.

ANEXO 4

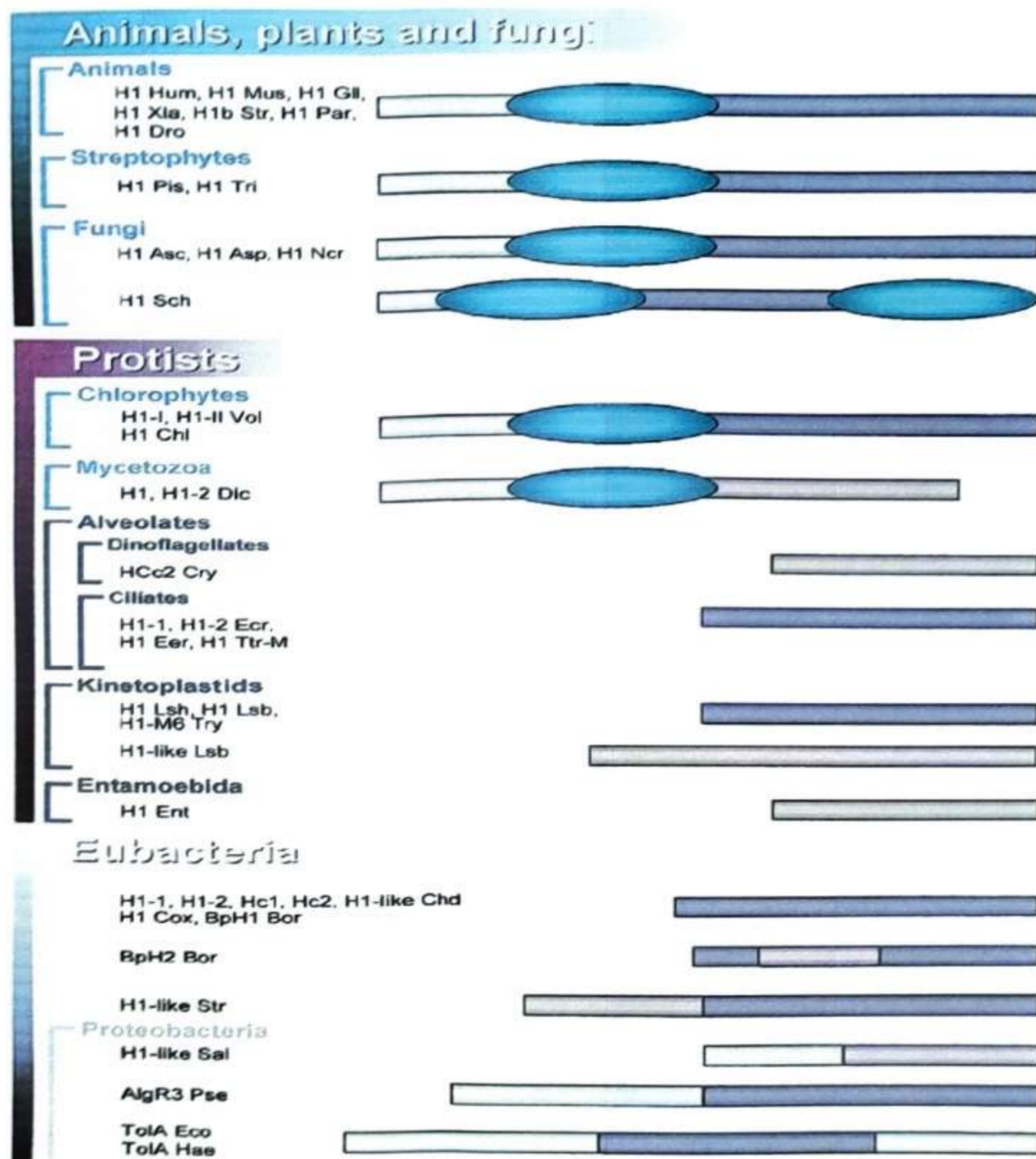


Figura 9: Diagrama esquemático de la evolución del motivo hélice-alado en la histona H1 linker de protistas. El ovalado verde denota el motivo hélice-alado y las barras púrpura oscuros el C-terminal rico en Lisina de las histonas linker similar a histone H1b en el erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*. Las sombras más ligeras de púrpura indican secuencias con la similaridad decreciente a la cola C-terminal de La histona H1b de *S. purpuratus*. Las barras amarilla para el N-terminal así como para otras secuencias que no son similares al C-terminal o al core globular de la histona H1b de *S. purpuratus*.

ANEXO 5

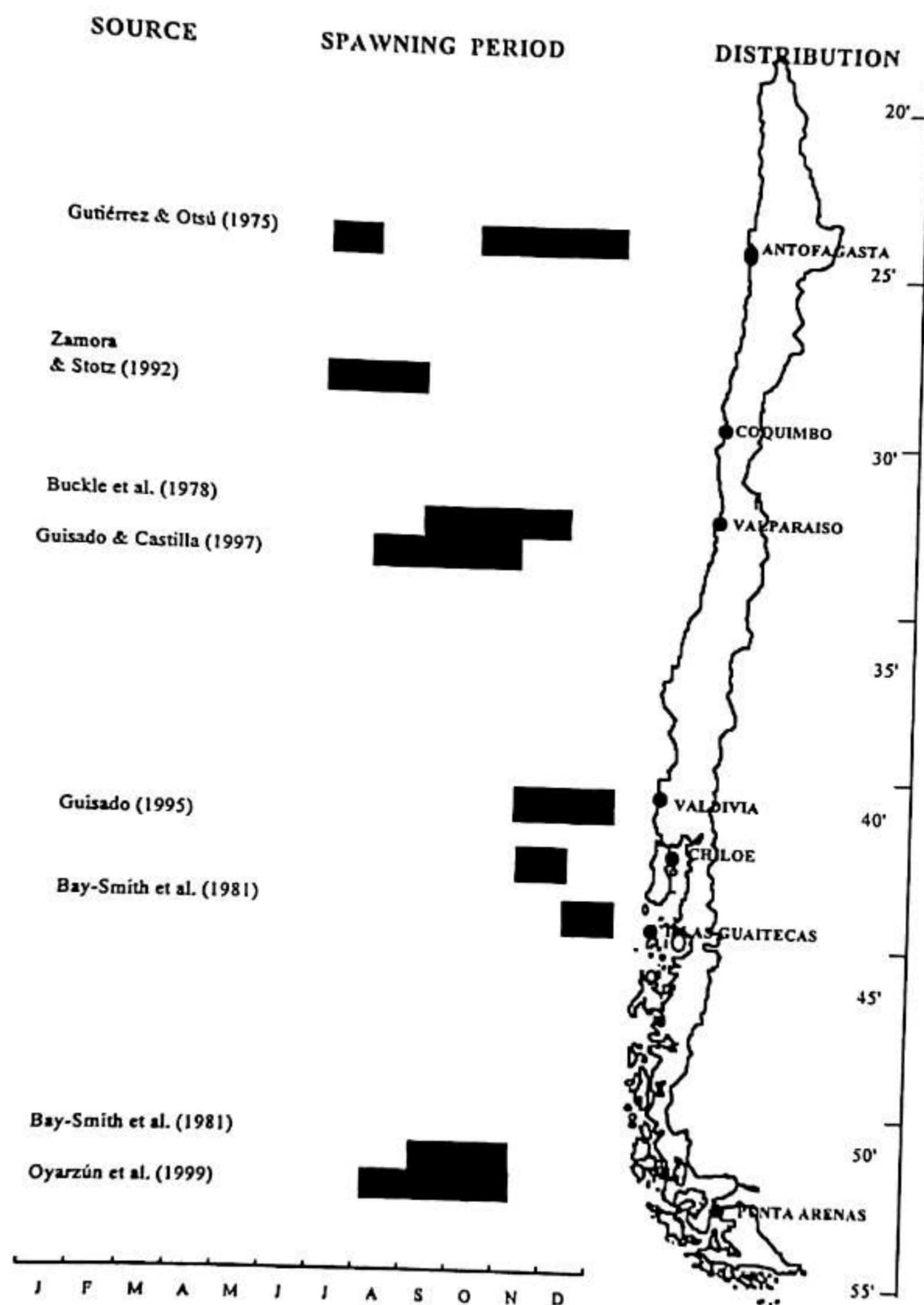


Figura 10: Variación geográfica del periodo de reproducción de *Loxechinus albus* a lo largo de la costa chilena (modificado de Zamora y Stotz 1992) por Vásquez (2001).

ANEXO 6

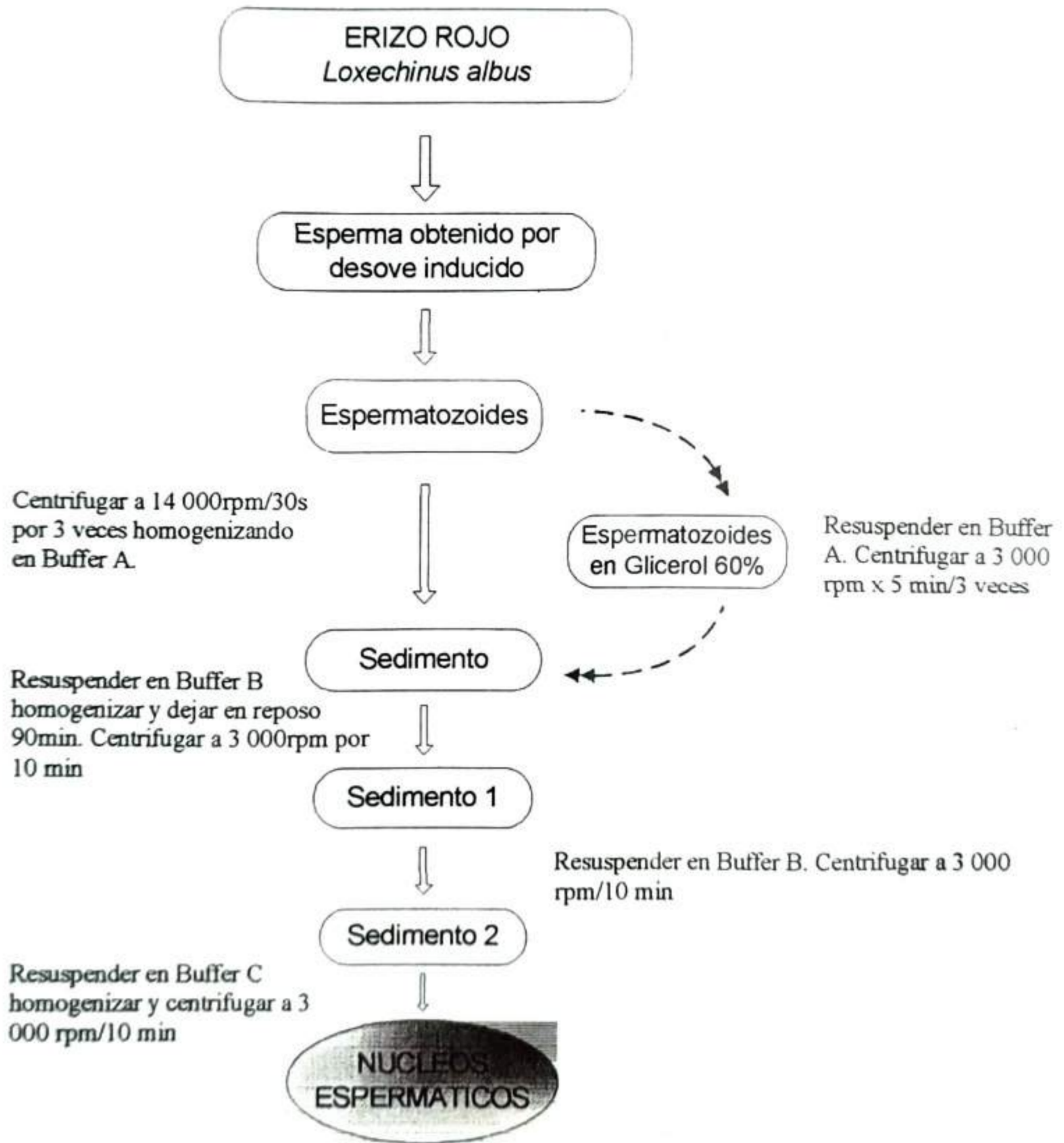


Figura 11: Aislamiento y Purificación de Núcleos Espermáticos de *Loxechinus albus*.

ANEXO 7

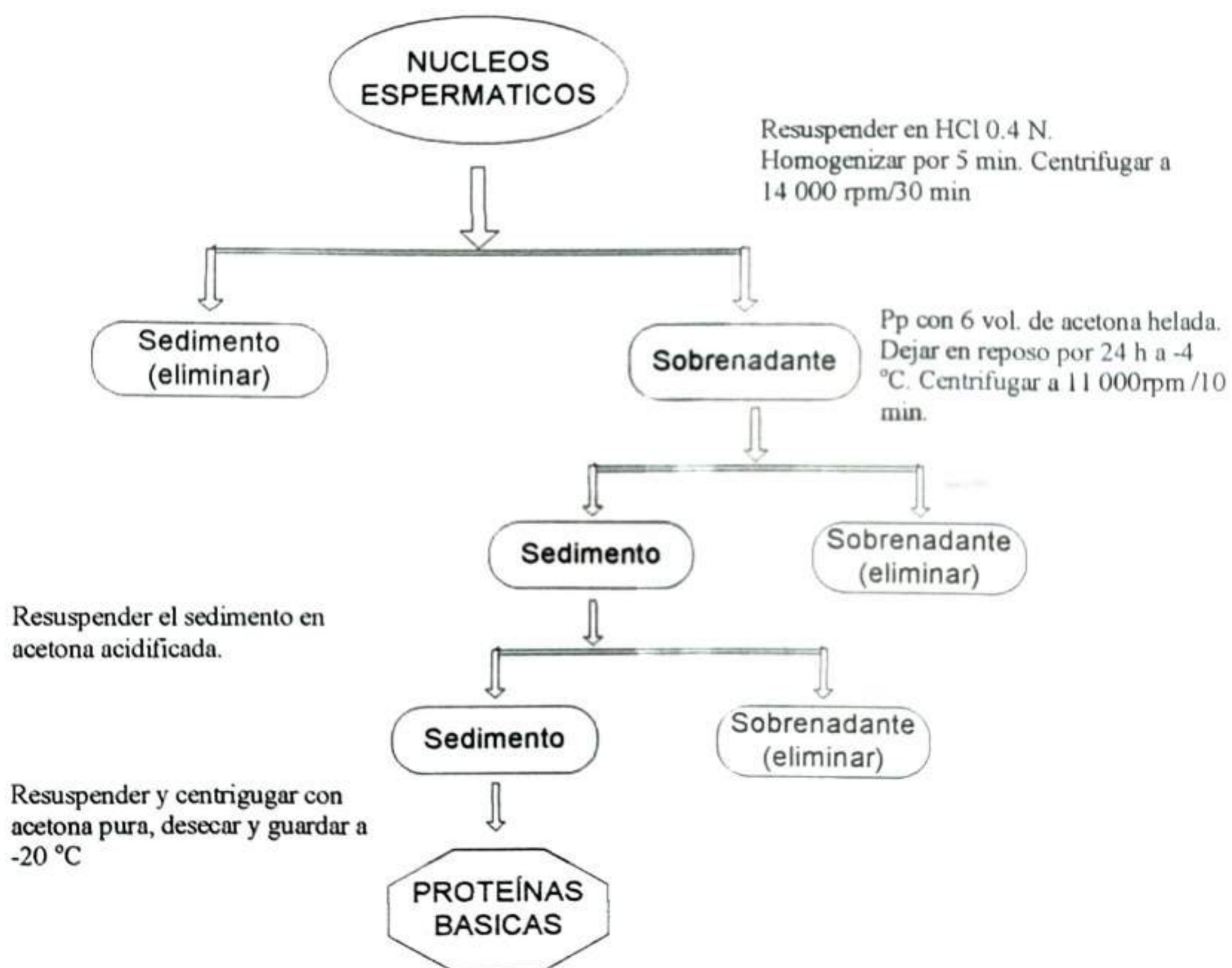


Figura 12: Extracción de Proteínas Básicas Nucleares espermioespecificas de *Loxechinus albus*.

ANEXO 8

Gel de electroforesis

Acrilamida	40 %
Bis-acrilamida	0.267 %
Ácido acético	7,5 M (43,1 %)
Persulfato de amonio	2 mg / ml
Urea	5 M
TEMED	5 μ l / ml

ANEXO 9

Buffer Muestra : 2X

Urea	10 M
Ácido acético glacial	10 %
2-mercaptoetanol	40 mM
Pyronina	1%.

ANEXO 10

Solución de tinción:

Comassie Brilliant Blue R-250 al 0,1% (w/v) en una solución de agua. metanol al 25 % (v/v), ácido acético al 5 % (v/v).de 5:5:1.

ANEXO 11

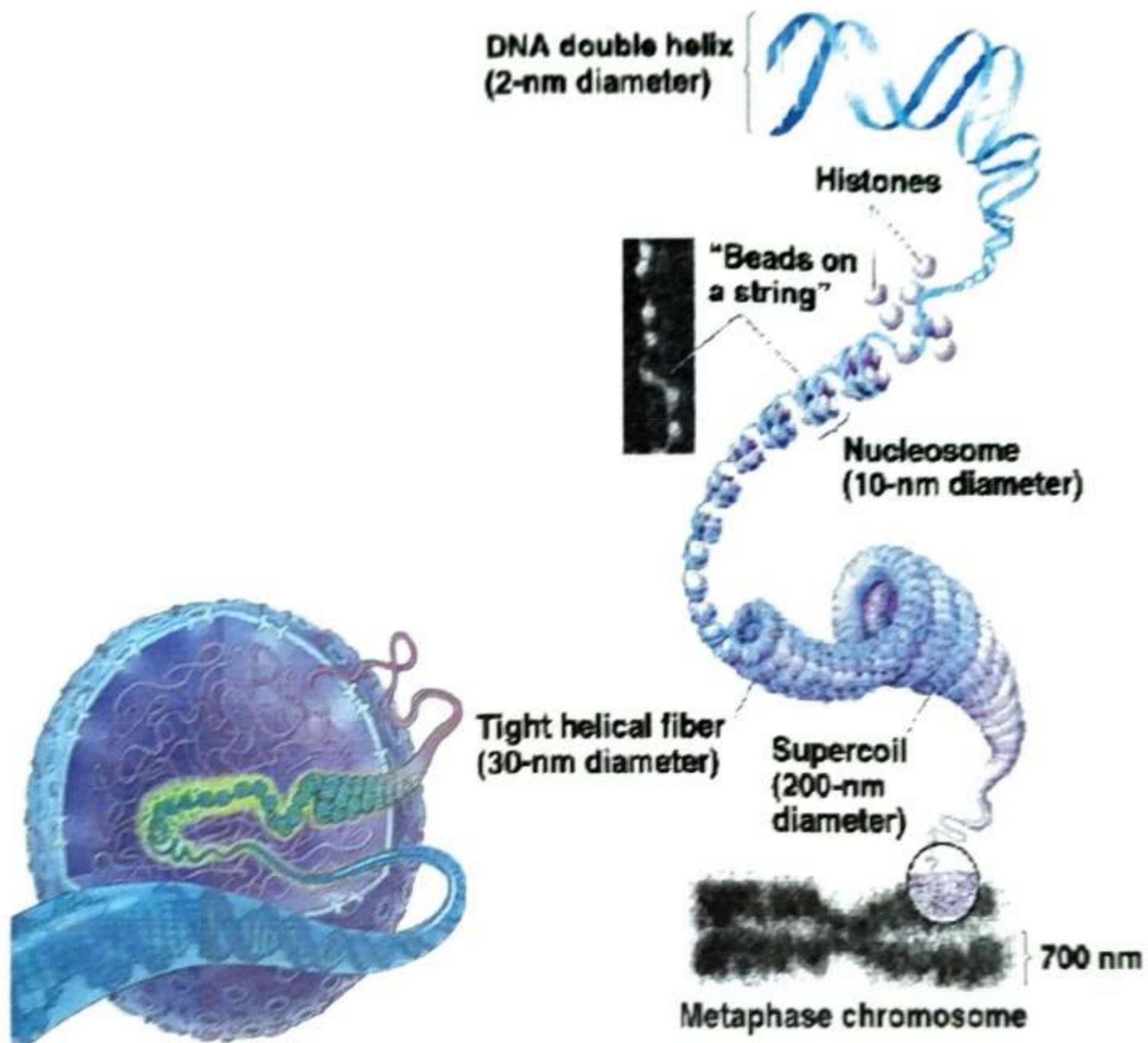
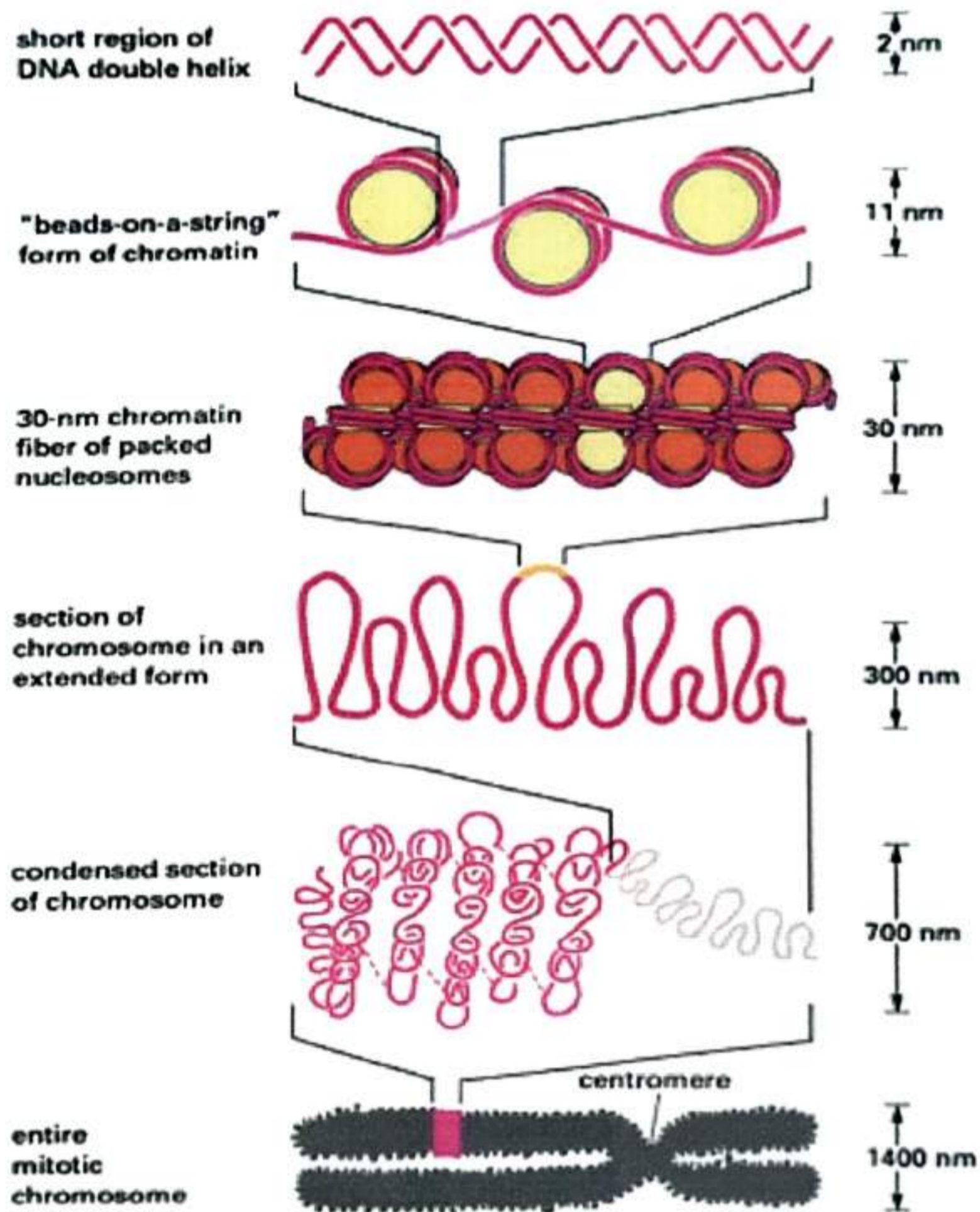


Figura 12: Localización de cromatina en célula somática.

Compactación del ADN en un núcleo de una célula humana. Hasta la fibra de 30 nm es llevado a cabo básicamente por histonas, y a partir de allí por el andamiaje cromosómico.

ANEXO 12



NET RESULT: EACH DNA MOLECULE HAS BEEN PACKAGED INTO A MITOTIC CHROMOSOME THAT IS 50,000x SHORTER THAN ITS EXTENDED LENGTH

Figura 13: Estructura de la cromatina en eucariotas. El nucleosoma es el ladrillo primario de la cromatina. Según Woodcock y Dimitrov (2001), la fibra de 10 nm o estructura de collar de perlas representaría la estructura primaria. La fibra de 30nm definiría la estructura secundaria. La estructura terciaria estaría asociada con el establecimiento de interacciones de la fibra de la cromatina de extensiones grandes.

ANEXO 13

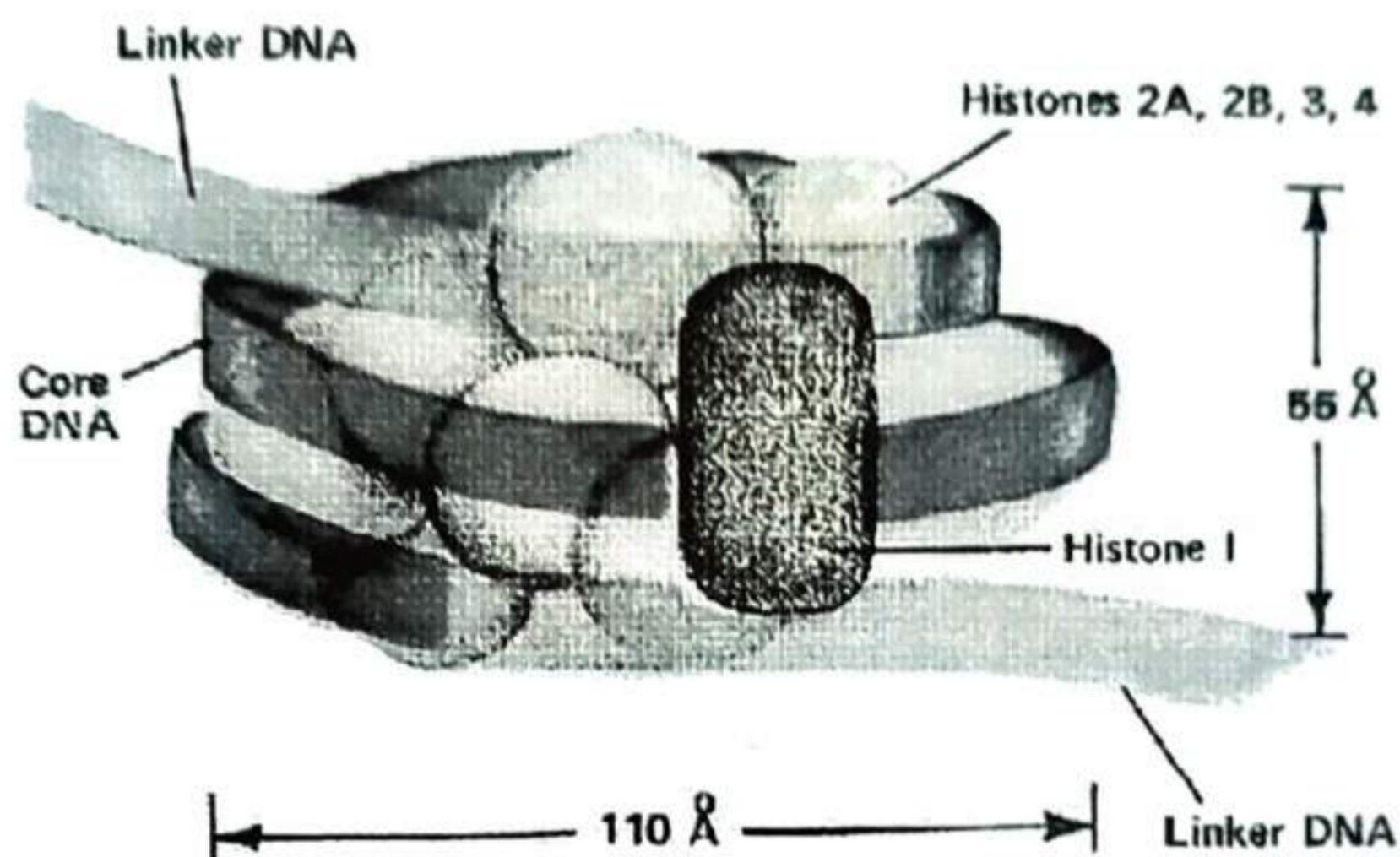


Figura 14: Estructura del nucleosoma. El octámero de histonas (H3, H4, H2A y H2B) constituyen el nucleosoma core y la histona linker por la H1. El ADN envuelto en el octámero de histonas se denomina DNA core (~ 146pb) y el ADN asociado a la H1 denominado ADN linker.

Características de las proteínas histónicas		
Tipo de Histona	Contenido Lisina - Arginina	Peso Molecular (Da)
H1	Rica en lisina	23.000
H2A	Moderadamente rica en lisina	14.000
H2B	Moderadamente rica en lisina	13.800
H3	Rica en arginina	15.300
H4	Rica en arginina	11.300

Cuadro 2: Características de las proteínas histónicas de Elguin y Weintraub (1975) admitida por la IUPAC.



MGR. ROBERTO CASTELLANOS CABRERA
ASESOR



BACH. ROSALIA CALLOHUARI QUISPE
TESISTA