

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Académico Profesional de Biología Microbiología

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA
HISTONA H1 EN ESPERMATOZOIDES DEL ERIZO ROJO**

Loxechinus albus MOLINA, 1782

Tesis presentada por

Bach. Richard Ponce Cusi

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo

TACNA – PERÚ

2012

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN
FACULTAD DE CIENCIAS**

TESIS N° 185 Título Profesional de Biólogo Microbiólogo

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 "AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA HISTONA H1 EN ESPERMATOZOIDES DEL ERIZO ROJO *Loxechinus albus* MOLINA, 1782".

El mismo que está conformado por:

Presidente	Mgr. Isabel Ancco Oliva
Secretario	Mgr. Raúl Paredes Medina
Vocal	Mgr. Soledad Bornás Acosta


Para examinar y calificar el trabajo de tesis sustentado en acto público el día 20 de diciembre del 2012. Presentado por el señor Bachiller RICHARD PONCE CUSI 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 bueno por unanimidad con 3 votos a favor con la nota de dieciséis (16).

Para ratificar lo detallado firman:


Mgr. Isabel Ancco Oliva
PRESIDENTE


Mgr. Raúl Paredes Medina
SECRETARIO


Mgr. Soledad Bornás Acosta
VOCAL

CONTENIDO

	Pág.
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Resumen	v
Abstract	vi
Abreviaturas	vii
INTRODUCCIÓN	1
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
1.1 Descripción del problema	6
1.2 Formulación del problema	6
1.3 Justificación e importancia	6
1.4 Objetivos	7
1.5 Hipótesis	7
II. MARCO TEÓRICO	10
2.1 Antecedentes	10
2.2 Bases teóricas	12
2.2.1 Organización y función de la cromatina	12
2.2.2 Histona H1	15
2.2.3 Diversidad y expresión de la histona H1	20
2.2.4 Histonas H1 somáticas	22
2.2.5 Interacción de la histona H1 con la cromatina y el DNA	26

2.2.6	Modificaciones post-traduccionales de la histona H1	27
2.2.7	La histona H1 en el núcleo celular	30
2.3	Definición de términos básicos	33
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	35
3.1	Materiales, reactivos y equipos	35
3.1.1	Material biológico	35
3.1.2	Material de laboratorio	38
3.1.3	Reactivos	39
3.1.4	Equipos	39
3.2	Métodos utilizados	40
3.2.1	Colección de esperma del erizo rojo <i>Loxechinus albus</i>	40
3.2.2	Aislamiento de núcleos espermáticos de <i>Loxechinus albus</i>	42
3.2.3	Extracción de histonas de los núcleos espermáticos	43
3.2.4	Obtención de núcleos de eritrocito de pollo <i>Gallus gallus</i>	47
3.2.5	Extracción de histonas totales de eritrocito de pollo	48
3.2.6	Análisis cuantitativo de las histonas	48
3.2.7	Caracterización de la histona H1 de <i>Loxechinus albus</i>	49
3.2.7.1	Electroforesis en PAGE-AU	49
3.2.7.2	Electroforesis en PAGE-SDS	51
3.2.7.3	Determinación del peso molecular	56
3.2.7.4	Análisis de aminoácidos de la histona H1	57
3.2.7.5	Composición de aminoácidos de la histona H1	59

IV.	RESULTADOS	63
	4.1 Aislamiento y purificación de la histona H1 de <i>L. albus</i>	63
	4.2 Caracterización de la histona H1 de <i>L. albus</i>	63
	4.2.1 Electroforesis de histonas en PAGE-AU	64
	4.2.2 Electroforesis de histonas en PAGE-SDS	68
	4.2.3 Composición de aminoácidos de la histona H1	72
V.	DISCUSIÓN	79
	5.1 Obtención de espermatozoides de <i>Loxechinus albus</i>	79
	5.2 Extracción de histonas totales e histona H1	79
	5.3 Purificación de la histona H1	80
	5.4 Caracterización de la histona H1	81
	CONCLUSIONES	84
	RECOMENDACIONES	85
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

DEDICATORIA

*Dedicado a **Dios**, que ilumina cada uno de mis días sin dejarme de lado, a mis padres **Rufino** y **Salustiana** que son quienes adornan mis días con su amor y cariño, los amo y a mi **Mamachuy**, mi abuelita querida que me está viendo desde el cielo.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco al profesor Roberto Castellanos Cabrera, quien siempre orientó cada una de mis ideas y me brindó un sabio consejo preciso para cada situación presentada sin permitir que de alguna u otra forma me desanimara respecto a la presente investigación, para mí será siempre aquella persona que impulsó la visión investigadora en mi vida por lo cual estoy eternamente agradecido con él y con su familia. También agradecer la ayuda de un gran amigo, investigador, asesor, el Dr. Manel Chiva Royo, de la Universidad de Barcelona, España, que se encuentra en la gloria de Dios y del cual guardo preciosos sentimientos de agradecimiento y cariño por todo el tiempo que me brindó al interactuar virtualmente todo el tiempo, el Dr. Manel Chiva fue una persona muy importante para mí, ya que siempre estuvo presto a dejar que su conocimiento fluya.

A mi amiga Rosalía Callohuari Quispe, bióloga, por su apoyo incondicional y conocimientos previos en la orientación y ayuda en la recolección y estudio de los erizos. Agradecer también al Dr. Luis Javier Del Valle, que mantuvo siempre en todo momento palabras exactas de ayuda para cada consulta hecha en su respectivo momento. Al Dr. Juan Antonio Subirana por su apoyo con los papers que personalmente me hizo llegar desde su laboratorio. Al Dr. Juan Ausió, por su asesoría para definir el tema y la orientación específica de la investigación. Al Dr. Julio Vásquez, por sus conocimientos respecto al ciclo reproductivo del erizo y también por su ayuda al enviarme sus papers de investigación.

A todos mis amigos que hicieron posible con su ánimo el desempeño de cada área de esta investigación.

RESUMEN

El aislamiento, purificación y caracterización de la histona H1 del espermatozoide del erizo rojo *Loxechinus albus* se describe en el presente trabajo, que consiste en la purificación y caracterización de la histona H1 de los espermatozoides del erizo rojo *Loxechinus albus*, Molina 1782.

Esta especie representa un recurso económico muy importante de la costa central y sur del Estado Peruano. Los pasos fundamentales del presente estudio fueron la obtención de células espermáticas maduras, extracción de las histonas totales y H1, cuantificación de de histonas y electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS y PAGE-AU), determinación del peso molecular de la histona H1, mediante el uso de software específicos (GelAnalyzer) y por último, la composición de aminoácidos de la histona H1, por cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

Se estimó que el peso molecular de la histona H1 es aproximadamente 22 kD y aproximadamente 200 residuos de aminoácidos. Se puede evidenciar que la histona H1, presenta una mayor variabilidad debido a que presenta un par de aminoácidos resaltantes dentro de su constitución: lisina y arginina, son éstos los que brindan variabilidad a nivel del nucleosoma de estas células, que también se puede evidenciar la movilidad electroforética de las demás histonas (histonas core), en ambos geles de electroforesis.

ABSTRACT

Isolation, purification and characterization of histone H1 red sea urchin sperm *Loxechinus albus* described in this paper, which consists in the purification and characterization of histone H1 in red sea urchin sperm *Loxechinus albus*, Molina 1782.

This species is a very important economic resource for the central coast and south of the Peruvian state. The fundamental steps of this study were to obtain mature sperm cells, total extract and histone H1, histone and quantification of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE-SDS-PAGE and AU), molecular weight determination of histone H1, by using specific software (GelAnalyzer) and finally the amino acid composition of histone H1, by high performance liquid chromatography (HPLC).

It was estimated that the molecular weight of histone H1 is approximately 22 kD and approximately 200 amino acid residues. It may show that histone H1, exhibits greater variability due to having a pair of amino acids within its constitution highlights: lysine and arginine, is these that provide the nucleosome level variability of these cells, which can also demonstrate the electrophoretic mobility of other histones (histone core) in both gel electrophoresis.

ABREVIATURAS

N-terminal	Amino-terminal
Proteína Sc	Proteína de la matriz celular
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
SAR	Región de unión a la matriz celular
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.
TE	Tampón tris-ácido etilendiaminotetra-acético
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamina
PSA	Persulfato de amonio
BSA	Seroalbúmina bovina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HAT	Histona acetiltransferasa
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
TSA	Tricostatina A
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
PAGE-AU	Electroforesis en gel de poliacrilamida con ácido acético-urea
PCA	Ácido perclórico
β -MOH	β -Mercaptoetanol
PITC	Fenilisotiocianato

INTRODUCCIÓN

El enrollado o plegado nucleosomal induce a la formación de una fibra de diámetro de aproximadamente 20-35 nm (Ris and Kubai, 1970; Finch and Klug, 1976; Suau *et al*, 1979), y en general se supone que la histona H1 es responsable de la formación y mantenimiento de esta estructura in vivo (Littau *et al*, 1965; Bradbury *et al*, 1973; Finch and Klug, 1976; Renz *et al*, 1977).

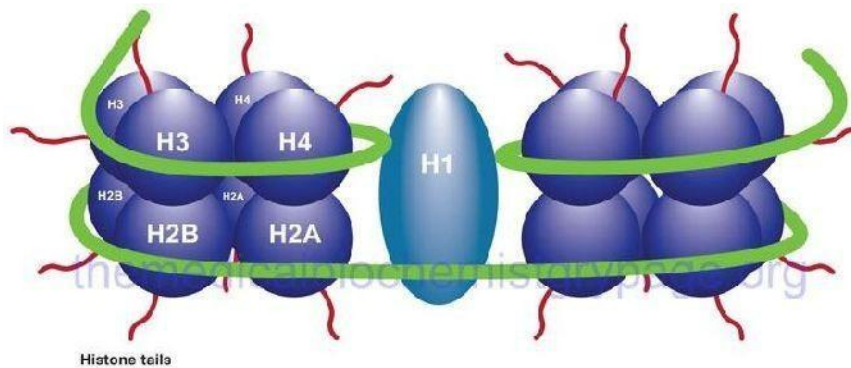


Figura 1. Esquema de dos nucleosomas ligados por una histona H1. Las histonas core son los pares de H2A, H2B, H3 y H4. Fuente: themedicalbiochemistrypage.org

La histona H1 se compone de tres dominios estructurales. El dominio central de aproximadamente de 80 residuos de aminoácidos es fuertemente conservado y sirve para localizar las moléculas, mientras que los dominios que la flanquean (colas) muestran mucho más baja secuencia de conservación (Allan *et al.*, 1980).



Figura 2. Esquema de la estructura de la histona H1 mostrando las colas con su centro globular y dos colas ricas en arginina y lisina cargadas positivamente.
Fuente: *themedicalbiochemistrypage.org*

El espermatozoide del erizo de mar contiene histonas asociadas al ADN en lugar de proteínas similares a protamina, y la molécula de la histona H1 en este tejido espermático difiere de histonas H1 convencionales (por ejemplo, de eritrocito de pollo) en tener un contenido de arginina, más residuos aromáticos y la histidina. La comparación secuencial de la molécula de histona H1 del espermatozoide del erizo de mar con la histona H1 del timo de ternera muestra la presencia de una considerable homología, pero indica que diferencias ocurren a través de toda la longitud de la molécula (Strickland *et al.*, 1980).

El espermatozoide es también un tejido diferenciado terminalmente, y su molécula de histona H1 muestra homología con la histona H5 también, particularmente con respecto al contenido y la posición de los residuos de arginina.

El presente trabajo describe la preparación y purificación de histona H1 desde el espermatozoide del erizo rojo *Loxechinus albus* que no se ha estudiado antes.

La molécula de la histona H1 muestra significativas diferencias composicionales. Las mediciones físicas se usan para buscar las similitudes y las diferencias con otras histonas H1 de erizo de mar y las histonas de timo de ternera. El

enfoque estructural para una comprensión del funcionamiento de las histonas H1 en la cromatina es importante en la ausencia de un ensayo funcional de la histona H1; es decir, se espera que, por el análisis detallado de la estructura en una amplia gama de tipos de histona H1, pistas significativas pueden obtenerse en cuanto a su función y modo de acción.

La partícula core del nucleosoma es reconocida como el bloque fundamental para el primer nivel de organización de la estructura núcleo proteica. En una amplia variedad de tejidos de numerosas especies la partícula core consiste de 145 pb de DNA agrupados alrededor de un octámero de 4 pequeñas histonas, 2 de cada una H2A, H2B, H3 y H4 (Simpson *et al*, 1978).

Las histonas core no se unen al azar al DNA, pues son posicionadas preferencialmente en ciertos lugares (Wolffe, 1994). Por ejemplo, regiones ricas en los pares de base A-T tienen surcos estrechos y surcos mayores en la hélice del DNA y son idealmente situados al contacto con el core del nucleosoma. Esto es porque la envoltura estrecha del DNA alrededor del core proteico requiere la compresión de surcos menores y esto a su vez, es facilitado por clusters de 2 ó 3 pares de base de A-T. (Wolffe, 1994).

La histona H1 es una proteína que une al DNA linker en fibras de cromatina. Actualmente se acepta que la histona H1 puede tener un rol regulatorio en la transcripción a través de la modulación estructural de la cromatina. Experimentos *in vitro* con cromatina reconstituida han mostrado que la histona H1 puede reprimir promotores que contienen RNA que comienza en el DNA linker, y que algunos

factores de secuencias de transcripción pueden contrarrestar la represión mediada por la histona H1.

La longitud del DNA linker y el campo de la hélice del DNA son determinantes importantes de la estructura de la cromatina que puede resultar del plegado nucleosomal. (Widom, 1992). Cuando una variación apropiada en la longitud del linker es tomada en consideración en simulaciones computarizadas del plegado de cromatina, los resultados son fibras irregulares (Woodcock *et al.*, 1993).

En células somáticas, las fibras nucleosomales de la cromatina en interfase (Vogelstein, 1980; Lebkowski and Laemmli, 1982) y de los cromosomas en metafase (Lewis y Laemmli, 1982) están organizados en bucles. Las proteínas no histonas de la matriz nuclear (Vogelstein *et al.*, 1980) y los dobles de la metafase (Lewis y Laemmli, 1982) confieren constricciones topológicas a cada bucle los cuales forman un dominio independiente de superenrollamiento (Cook y Brazell, 1975).

El DNA adjunto a la matriz parece ser secuencia específica y ocurre en sitios específicos. Estos sitios adjuntos relacionan la función genética y los genes activos. (Mirkovitch *et al.*, 1987). Hay dos circunstancias principales bajo las cuales las nucleohistonas se encuentran en los espermatozoides. En el primer caso, las histonas proteínas básicas exclusivas que interactúan con el DNA tal como en los núcleos de espermatozoide de equinodermos (Poccia y Green, 1992) y algunas especies de peces (Muñoz-Guerra *et al.*, 1982).

En el segundo grupo, las histonas comprenden un pequeño porcentaje de proteínas nucleares básicas, la consistencia mayoritaria de protaminas o proteínas

como-protaminas tal como en los espermatozoides de moluscos bivalvos (Ausió, 1986) y en algunos euterios (Gatewood *et al.*, 1990)

Las estructuras nucleohistonas de los espermatozoides maduros del erizo de mar *Arbacia lixula* han sido bien estudiadas en el pasado. Cada nucleosoma core, consiste de 146 pares de bases de DNA y un octámero de proteínas histonas (H2A-H2B-H3-H4) (Brandt *et al.*, 1979).

Hay, sin embargo, varias diferencias significantes en la cromatina de los espermatozoides de sus homólogos somáticos. Las estructuras espermáticas nucleosomales contienen de 100 – 110 pares de base de DNA linker, y estas “repeticiones” son más largas que las reportadas. Las histonas espermáticas de erizo de mar (SpH1 y SpH2B) están restringidas a la línea germinal masculina y son más largas que sus equivalentes somáticos. Las regiones amino-terminal de SpH1 y SpH2B contienen un set de repeticiones en tándem (Brandt *et al.*, 1979).

Las proteínas básicas nucleares exhiben un patrón evolutivo muy complejo de la combinación de un discreto número de motivos de proteínas que parecen repetirse dentro de diferentes taxones filogenéticos (Ausió, 1995).

Estos motivos de proteínas pueden ser básicamente representados por tres diferentes tipos: H (histona), P (protamina) y PL (semejante a protamina). El último tipo consiste en proteínas básicas nucleares espermáticas (SNBPs) con características intermedias entre los tipos H y P. (Ausió, 1995)

En los últimos años ha habido un aumento significativo de información acerca de estas proteínas, se reunieron a partir de varios grupos nuevos de deuterostomados que no se han estudiado previamente (Chiva, *et al.* 1995).

Dentro de los deuterostomados hay ahora información disponible sobre las SNBPs de los siguientes grupos: equinodermos, urocordados, cefalocordados, agnatos, condritos y tetrápodos. En equinodermos, los espermatozoides retienen tipos somáticos de histonas los cuales incluyen variantes de histonas SpH1 y SpH2B los cuales son espermio específicos muy especializados, que están presumiblemente envueltos en un estado muy compacto de cromatina en el espermatozoide (Poccia, 1995).

Los urocordados (tunicados) tienen SNBPs muy específicas, las cuales, al final de la espermiogénesis, casi completamente reemplazan las histonas somáticas de las células madre (Chiva *et al.*, 1989). Estas proteínas son principalmente del tipo PL, aunque en varias instancias una pequeña proteína adicional del tipo P está también presente (Saperas *et al.*, 1993). El camino evolutivo de las SNBPs de los equinodermos a tunicados parece que han envuelto la transición desde el tipo histona (H) al tipo PL y finalmente a la protamina muy especializada usualmente encontrada en formas más evolucionadas (Ausió, 1995).

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del problema

El problema radica en aislar, purificar y caracterizar la histona H1 en espermatozoides del erizo rojo *Loxechinus albus*, debido a la gran importancia que tiene este recurso hidrobiológico en la zona sur del Perú y norte de Chile, cuyos estudios biológicos moleculares aún no se inician.

1.2 Formulación del problema

¿Es posible aislar, purificar y caracterizar la histona H1 en espermatozoides del erizo rojo *Loxechinus albus* . Molina 1782?

1.3 Justificación e importancia

Se justifica aislar, purificar y caracterizar la histona H1 del espermatozoide del erizo rojo *Loxechinus albus* Molina, 1782 para dilucidar su estructura molecular, el número de aminoácidos, su cantidad porcentual molar, y su peso molecular. La importancia del presente estudio radica en la necesidad de estudiar, puesto que ahora, a pesar de su papel esencial en el núcleo, la histona H1 también tiene funciones fuera de la envoltura nuclear. En la última década se han acumulado evidencias de este hecho que sitúa a las histonas como componentes del sistema inmune innato y en el punto de mira de terapias contra el cáncer, infección microbiana o enfermedades autoinmunes.

El motivo primordial del desarrollo de la presente investigación, es la carencia de estudios tanto a nivel nacional como internacional, acerca de la investigación a nivel molecular de la histona H1 de las células espermáticas del “erizo rojo” *Loxechinus albus* , Molina 1782, esto debido a que la histona H1 presenta una alta variabilidad en su secuencia, por lo cual se podría predecir un posterior cambio genético a nivel nucleosomal de la especie en estudio, relacionándolo con su variabilidad genética.

Teniendo en consideración que la histona H1 cumple un papel muy importante en la formación de la estructura de orden superior de la cromatina y por lo tanto participa en los procesos dinámicos de replicación, transcripción y regulación de la expresión génica.

En la mayoría de equinodermos, tanto, estrellas de mar, pepinos de mar, etc., los polinucleosomas contienen en su conformación la histona H1 como enlace de unión entre mononucleosomas para formar polinucleosomas y así formar la cromatina.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Aislar, purificar y caracterizar la histona H1 en espermatozoides del “erizo rojo” *Loxechinus albus*, Molina 1782.

1.4.2 Objetivos específicos

- Extraer las histonas totales de espermatozoides de *Loxechinus albus* mediante extracción ácida.
- Purificar y caracterizar la histona H1 mediante PAGE – SDS y PAGE – AU.
- Cuantificar la cantidad de aminoácidos existentes en la histona H1 de espermatozoides maduros de *Loxechinus albus* mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

1.5 Hipótesis

Se espera aislar, purificar y caracterizar la histona H1 en espermatozoides del erizo rojo *Loxechinus albus* por ser constituyente estructural del cromosoma nuclear. Por lo tanto, es posible aislar, purificar y caracterizar la histona H1 en espermatozoides maduros del erizo rojo *Loxechinus albus*, Molina 1782.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

El erizo rojo *Loxechinus albus* (Molina, 1782), es un equinodermo que se distribuye a lo largo de la costa suroriental del océano Pacífico, desde el Perú (Isla Lobos de Afuera, 6°53'50''S), hasta el extremo austral de Chile (Cabo de Hornos, 55°52'S) y Tierra del Fuego en el sector argentino (Guisado y Castilla, 1987).

Esta especie habita en fondos duros y se distribuye desde la zona litoral hasta los 340 m de profundidad (Larraín, 1975); sin embargo su extracción se concentra entre los 0 y 40 m de profundidad. (Palma y Arana, 1996).

El erizo se caracteriza por su caparazón hemisférico de color verde, con tonalidades rojizas o moradas en ambulacros e interambulacros. Es una especie gonocórica, es decir, tiene los sexos separados, aunque no presenta dimorfismo sexual y tiene actividad gametogénica a partir de los 20 a 25 mm de diámetro máximo. No obstante, a nivel poblacional se estima que el tamaño de primera madurez en las hembras se produce a los 45 mm, mientras que los machos la alcanzan a los 55 mm. La época de reproducción se extiende entre noviembre y diciembre en la zona norte de Chile, mientras que en la zona central y sur ocurre entre julio y diciembre.

Dada la ausencia de dimorfismo sexual la separación de sexos es muy difícil de realizar sin un examen histológico. Más aún, las gónadas de machos y hembras tienen la misma estructura externa y coloración; aunque ésta última puede variar del

amarillo al café oscuro. La identificación sexual se puede lograr en forma aproximada sólo en el período de máxima actividad reproductiva, cuando de las gónadas de las hembras fluye un líquido de color anaranjado que contiene los óvulos; mientras que de los machos fluye un líquido blanco constituido por el equivalente al semen y espermatozoides.

A la actualidad, la separación de machos y hembras ha sido realizada mediante el estudio histológico de sus gónadas (Gutiérrez y Otsu, 1975). Sin embargo, esta técnica es demasiado lenta y no permite el análisis rápido de un número importante de ejemplares, como es el requerimiento de diversas metodologías biológico-pesqueras destinadas a analizar muestras de capturas comerciales.

En el trabajo publicado por Palma y Arana (1996) se describe una nueva metodología que permite determinar el sexo en forma rápida y a bajo costo, y además estimar la proporción sexual en muestras de gran tamaño. Así también, se entrega el procedimiento para separar distribuciones globales de frecuencias de tallas realizadas sin diferenciación sexual, en distribuciones separadas para machos y hembras, para su subsecuente utilización en estudios biológicos y pesqueros.

Con los estudios realizados por Callohuari (2005) se logró determinar las histonas totales del espermatozoide del erizo rojo *Loxechinus albus*, caracterizando las proteínas electroforéticamente. En este estudio se recomendó ampliar la investigación de cada una de las histonas constituyentes de esta especie, lo cual se da en el presente trabajo, en el aislamiento, purificación y caracterización de la histona H1.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Organización y función de la cromatina

En los organismos eucariotas el DNA se encuentra en el núcleo de la célula en forma de cromatina. La cromatina es una fibra formada por complejos de DNA y proteínas básicas denominadas histonas y otras proteínas no histonas. La unidad básica de la fibra de cromatina es el nucleosoma (Wolffe *et al*, 1997).

El conjunto formado por las histonas internas, el DNA enrollado sobre ellas y la H1 se conoce como nucleosoma (Figura 3). Dos copias de cada una de las histonas internas H2A, H2B, H3 y H4 forman el núcleo proteico que junto con 146 pb de DNA, se conoce con el nombre de partícula núcleo. La histona H1 se une a la partícula núcleo y al DNA de unión o “linker”, protegiendo 20 pb adicionales de la digestión con nucleasa micrococcal, formando el cromatosoma. El DNA linker más el cromatosoma forman el nucleosoma (Wolffe *et al*, 1997).

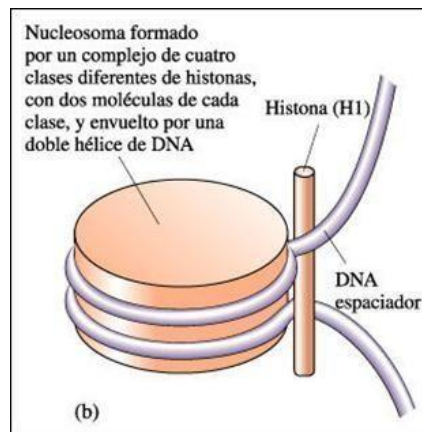


Figura 3. Estructura nucleosomal (Carpenter, 1999).

Los nucleosomas unidos por el DNA internucleosomal forman la fibra de cromatina de 10-12 nm. La histona H1, que se une a la partícula núcleo y al DNA internucleosomal, permite la compactación de la fibra de 10-12 nm en una fibra de 30 nm, que constituye el estado en que se encuentra la mayoría de la cromatina durante la interfase (Figura 4).

La fibra de 30 nm se organiza en grandes dominios conocidos como lazos que se encuentran anclados a un esqueleto de proteínas o scaffold (Figura 4). Su longitud varía entre 30 y 100 kb (kilobases) y se cree que podrían conformar grandes e importantes dominios transcripcionales dinámicos regulados topológicamente (Laemmli, 1992).

La estructura espacial de la cromatina brinda la condensación y organización que es necesaria para que el empaquetamiento del DNA dentro del núcleo sea compatible con la realización de procesos como la replicación, la transcripción y la regulación de la expresión génica (Wolffe, 1992).

DNA in the Cell

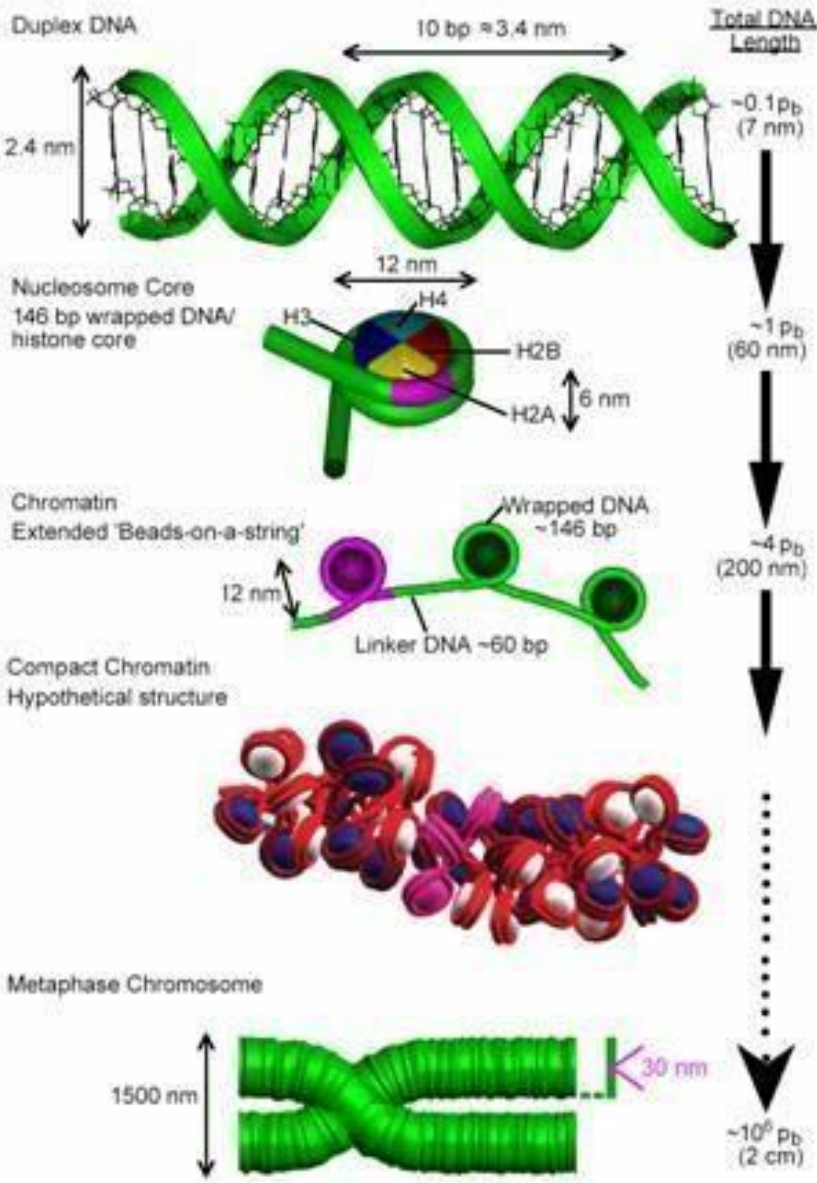


Figura 4. Empaquetamiento de la cromatina. (Schlick Group at the New York University)

En el núcleo de la célula eucariota encontramos dos tipos fundamentales de cromatina: eucromatina y heterocromatina. La eucromatina está compuesta por regiones más distendidas donde se localizan genes activamente transcritos. Por el contrario, la heterocromatina contiene regiones más compactas que se encuentran por lo general cercanas al centrómero y los telómeros. El mantenimiento de las regiones heterocromáticas es necesario para la estabilidad genómica y el control de la expresión génica (Maison, 2004).

El núcleo central proteico de los nucleosomas, alrededor del cual se enrolla el DNA contiene dos moléculas de cada una de las histonas internas o también llamadas histonas core, H2A, H2B, H3 y H4. Las histonas internas son proteínas de bajo peso molecular (11-16 kDa) con más de un 20 % de aminoácidos básicos. Las histonas H2A y H2B contienen más lisina mientras que las histonas H3 y H4 contienen más arginina (Van Holde, 1988).

Todas las histonas internas se encuentran muy conservadas en longitud y en secuencia aminoacídica a lo largo de la evolución. Las histonas H3 y H4 son las que se encuentran más altamente conservadas y juegan un papel central en el nucleosoma; estas restricciones funcionales y estructurales explican la alta conservación de su secuencia. Las histonas H2A y H2B están algo menos conservadas.

2.2.2 Histona H1

La histona H1 se define como aquella que agrupa a aquellas proteínas básicas y abundantes que interactúan con el DNA de unión entre los nucleosomas. En la Figura 5 se esquematiza la estructura en tres dominios: el dominio amino terminal

(20-35 aminoácidos), el dominio central de carácter globular (~80 aminoácidos), y el dominio carboxilo terminal (~100 aminoácidos) (Wolffe, 1997).

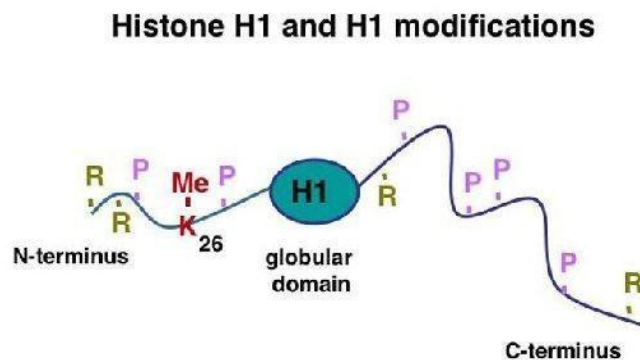


Figura 5. Dominios de la histona H1. (Max Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics)

Los dominios amino y carboxi terminal tienen carácter básico, especialmente el dominio C-terminal que puede contener hasta un 40% de lisinas. La longitud de los dominios terminales es más variable que la del dominio globular. Los dominios amino y carboxi terminal de la H1 son de baja complejidad de secuencia a nivel de nucleótidos y de aminoácidos, mientras que el dominio globular es de alta complejidad de secuencia. La estructura tripartita de la histona H1 sugiere que cada dominio tiene podría tener funciones específicas en la estructura de la cromatina. El dominio N-terminal sería capaz de estabilizar la unión del dominio globular, el dominio globular podría localizar la H1 en el nucleosoma, mientras que el dominio

C-terminal es la región que generalmente se asocia con la condensación de la cromatina mediante la unión y la neutralización de las cargas del DNA linker (Wolffe, 1997).

Dominio globular

El dominio globular central es el encargado de unirse al exterior de cada nucleosoma, casi cerca del punto donde entra y sale el DNA, la posición exacta aún no está esclarecida. El dominio globular posee aproximadamente 80 residuos y se une al nucleosoma cerca del punto de entrada y salida del DNA, protegiendo 20 pares de bases adicionales de la digestión con nucleasa micrococcal. Este dominio es el que se encuentra más evolutivamente conservado, hasta el punto de ser básicamente idéntico entre algunos subtipos y entre especies diferentes (Ponte *et al.*, 1998).

Los dominios amino y carboxi-terminales

Los dominios terminales son aquellos que contienen un porcentaje elevado de residuos básicos, especialmente el aminoácido lisina. Este dominio C-terminal presenta un promedio de un 40% de residuos de lisina y también bastantes residuos de alanina y prolina. Por ejemplo, de 97 residuos del C-terminal de la H1° de ratón, 40 son lisina, 16 alanina, 12 prolina, 9 valina, 7 serina y 5 treonina. La distribución de los residuos de lisina provoca una densidad de carga uniforme a lo largo de la mayor parte de esta región de la molécula. Los mencionados residuos de lisina tienden, efectivamente, a establecer dobles y en raras oportunidades se localizan tres residuos básicos juntos.

Tanto el dominio C-terminal así como también la región básica del dominio N-terminal tienen la capacidad de mantener unión respecto al DNA. Se ha llegado a creer que la cola C-terminal se une al DNA internucleosomal (Felsenfeld, 1992). Este dominio es el que probablemente contribuye a la torsión del DNA internucleosomal en el filamento de 30 nm (Butler, 1984; Clark *et al.*, 1988).

Dominio N-terminal

El dominio N-terminal de la histona H1 tiene alrededor de 30 aminoácidos y contiene dos regiones diferenciadas, ambas conservadas en la mayoría de subtipos conocidos (Böhm and Mitchell, 1985). La región distal es rica en alanina, prolina y de carácter hidrofóbico, mientras que la región adyacente al dominio globular tiene carácter básico y podría contribuir a la estabilidad de la interacción del dominio globular (Allan, 1986). La región N-terminal no contiene en su conformación residuos básicos y además posee un carácter apolar, debido a que está formada principalmente por residuos de alanina y prolina.

Dominio C-terminal

El dominio C-terminal de la histona H1 representa alrededor de la mitad de la proteína y tiene un alto contenido (~40%) de aminoácidos básicos, en su mayor parte lisina. El dominio C-terminal también es rico en serina, prolina y alanina. Este dominio es muy variable entre los diferentes subtipos de histonas, aunque la distribución de las cargas positivas es relativamente uniforme a pesar de las diferencias en la secuencia de aminoácidos (Subirana, 1990).

En general se acepta que el dominio C-terminal es el responsable de la condensación de la cromatina en la fibra de 30 nm así también de la agregación intermolecular (Allan, 1986).

El dominio C-terminal también tiene capacidad de condensar el DNA. Al parecer la condensación del DNA está mediada por la neutralización de las cargas negativas de los fosfatos del DNA linker por las lisinas del C-terminal.

En varios estudios recientes, se ha postulado la presencia de subdominios dentro del C-terminal que serían los responsables de la alteración del DNA linker y la estabilización de estructuras de cromatina condensada (Lu and Hansen, 2004).

El dominio C-terminal es también imprescindible para la unión a la cromatina *in vivo* con alta afinidad (Lever, 2000; Misteli, 2000). En estudios aún más recientes, se apunta además a la posibilidad de que esta unión este modulada por fosforilación (Hendzel, 2004).

Los dominios terminales de las histonas H1 son altamente repetitivos y, posiblemente, en su proceso de evolución han tenido lugar un alto número de duplicaciones. También, se considera que los dominios terminales en solución acuosa se encuentran totalmente desestructurados, con la excepción de una región del C-terminal de la H1 de esperma de erizo de mar (*Echinus esculentus*) que se estructura parcialmente en hélice α (Hill *et al.*, 1989).

2.2.3 Diversidad y expresión de la histona H1

En los organismos superiores, las histonas H1 poseen múltiples variantes no alélicas. Los subtipos de la H1 podrían estar diferenciados funcionalmente (Brown, 1997). En las aves, la acumulación de H5, la que es una variante de H1 típica de eritrocitos (glóbulos rojos), se asocia con el establecimiento de una estructura inerte de la cromatina (Sun, 1990).

En mamíferos se han podido encontrar al menos 7 variantes de H1. Los subtipos de H1 se diferencian en la extensión y el momento de la fosforilación, la conservación evolutiva (Lennox, 1984; Ponte, 2003), las tasas relativas de síntesis y degradación en células en proliferación o quiescentes (Lennox, 1983), y en su habilidad para condensar el DNA *in vitro* (Welsh, 1979).

Los efectos diferenciales de algunas variantes de histona H1 en procesos como la embriogénesis y la espermatogénesis se han atribuido a diferencias en la longitud y carga de los dominios amino y carboxi terminal (Khochbin, 2001).

Las diferencias existentes en los patrones de expresión así como también en las tasas relativas de degradación y síntesis en células en división y en células quiescentes permiten ciertos cambios en las proporciones relativas de las H1 durante el desarrollo y la maduración de los tejidos. La variante H1t es expresada en células espermatogénicas; y la secuencia codificante tiene algunas diferencias significativas con las demás histonas H1. Al comparar la secuencia de aminoácidos de la H1t con las histonas somáticas se puede observar en el dominio C-terminal el remplazo de las lisinas por argininas. La H1 tiene la capacidad de modular la estructura de la

cromatina para facilitar la recombinación y eventos de reparación génica (Wolffe, 1997).

La histona H5 se ha encontrado y ha sido caracterizada a nivel molecular solamente en eritrocitos de ave. Esta histona H5 contiene 190 aminoácidos y su secuencia está bastante relacionada con la secuencia de la H1, sin embargo su dominio C-terminal tiene una gran proporción de residuos de arginina. La mayoría de los sitios que son ocupados por estas argininas en la histona H5 contienen lisina en la secuencia de la H1. Se ha encontrado que el nivel de histona H5 aumenta durante la diferenciación de eritrocitos de pollo (Figura 6)

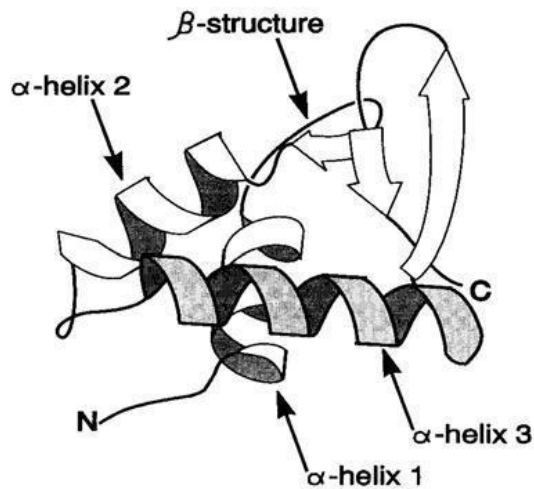


Figura 6. Estructura del dominio globular de la histona H5 (Wolffe, 1998).

2.2.4 Histonas H1 somáticas

Los niveles de H1a, H1b y H1d son los que decrecen rápidamente en células terminalmente diferenciadas o en el estado de G₀, mientras que la H1c y la H1e se continúan aun expresando. La histona H1a se expresa en todos los tejidos en niveles tan bajos que hace poco se consideraba específica de células de bazo, timo y testículos (Wisniewski, 2007). Su expresión se encuentra asociada a la división celular. La H1^o tiene una elevada homología con la H5 de eritrocitos de ave, aunque ésta última se une con mayor fuerza al nucleosoma, permitiendo una cromatina más estable y una disminución de la expresión más drástica (Bergman, 1990) (Figura 7)

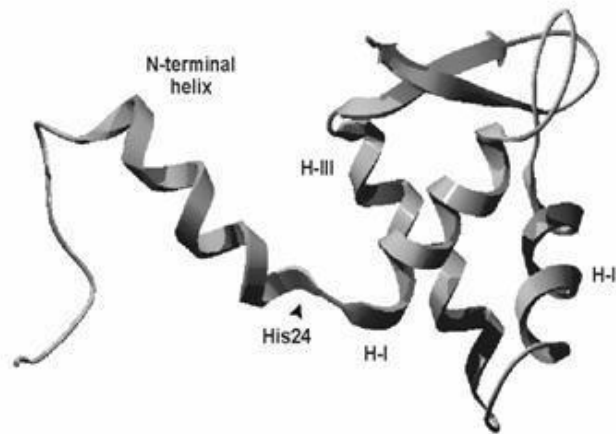


Figura 7. Modelo estructural para el dominio N-terminal de la H1^o conectado con el dominio globular de la H5 (Vila, 2001).

En el proceso de la espermatogénesis en mamíferos las espermatogonias diploides se diferencian en espermátocitos (primarios y secundarios) y luego de dos divisiones meióticas sucesivas en espermátidas haploides. Luego, durante la espermiogénesis, estas espermátidas pasan por una fase de elongación, para

posteriormente transformarse en espermatozoides maduros. Durante este proceso se dan cambios importantes a nivel bioquímico y la restructuración morfológica de las células de la línea germinal (Martianov, 2005).

La histona H1t es específica de testículos, se expresa en los espermatoцитos durante la profase de la meiosis, específicamente en el paquíteno (Grimes, 1990) (Figura 8) y constituye el 55 % de la histona linker presente en este tipo celular (Lin, 2000).

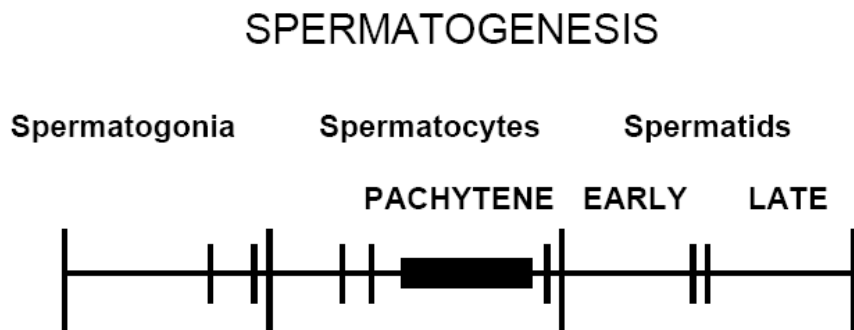


Figura 8. Etapas de la espermatogénesis (Grimes, 2004). Se muestran las tres etapas de la espermatogénesis. Las espermátidas tempranas (estadios 1-8), intermedias (estadios 9-12) y tardías (estadios 13-19). El rectángulo simboliza el período en que se sintetiza la H1t.

El mRNA de H1t existe en el paquíteno medio y tardío, pero la proteína se mantiene hasta las espermátidas redondas o alargadas (Drabent, 1996). La hipótesis, que goza de mayor aceptación es la que menciona, que el dominio globular de la histona H1 se encuentra unida directamente sobre el DNA en el eje binario de simetría (Simpson, 1978; Allan *et al.*, 1986).

Durante un tiempo existió la hipótesis de que podría tener lugar una interacción simétrica de la histona H1 con el DNA la cual entra y sale del nucleosoma, pero se encuentra separada de la vuelta central de DNA en el centro binario de simetría (Figura 9). Esta mencionada hipótesis simétrica alternativa, sin embargo, se enfrenta con resultados los cuales indican una posición de la histona H1 que se encuentra bastante próxima a la superficie del octámero central.

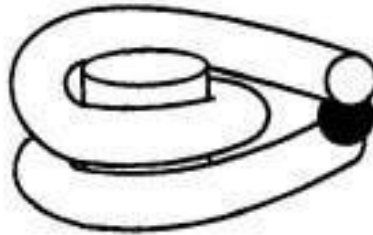


Figura 9. Hipótesis de la histona H1 situada simétricamente pero separada del octámero. (Wolffe, 1998).

Actualmente existen tres modelos principales para la unión de la H1 al nucleosoma (Figura 10). El modelo clásico, totalmente simétrico, ubica al dominio globular sobre el eje de simetría binario del nucleosoma. El modelo denominado “*bridging model*” (Zhou *et al.*, 1998) postula que el dominio globular de la H1 se mantiene unido entre dos vueltas superhelicoidales del DNA, concretamente entre un extremo del DNA nucleosomal y el centro de simetría. Según algunos autores, este modelo es capaz de explicar tanto la protección simétrica del DNA nucleosomal así también la asimétrica, si bien recurren a explicaciones que implican reordenaciones de las histonas internas. El tercer modelo es claramente asimétrico y propone que el dominio globular se sitúa al interior de una vuelta del DNA, a 65 pb del eje binario (Hayes y Wolffe, 1993).

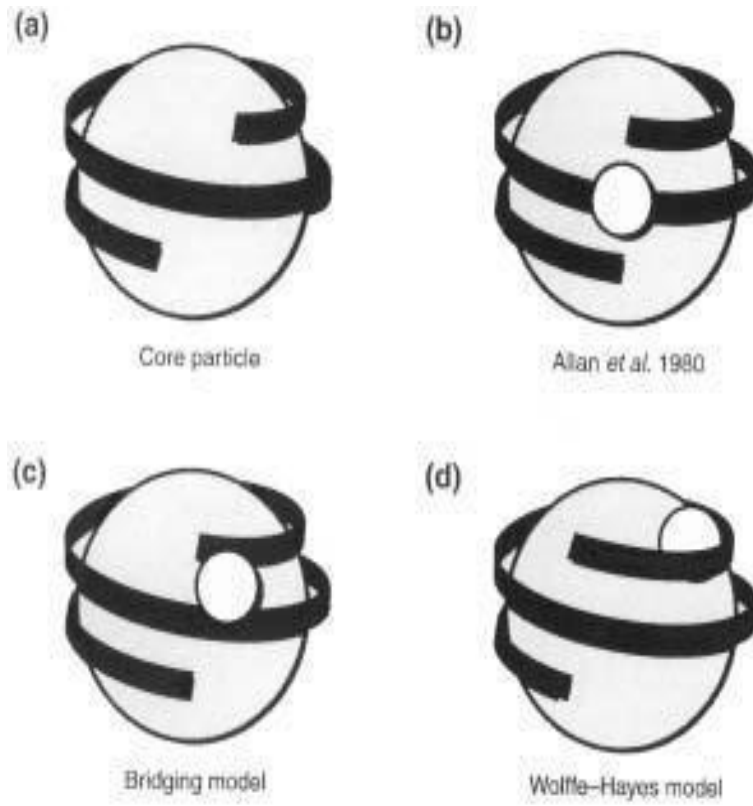


Figura 10. Las tres hipótesis principales sobre la posición de la histona H1 en el nucleosoma. (Travers, 1999).

2.2.5 Interacción de la histona H1 con la cromatina y el DNA

La unión de la histona H1 al DNA es cooperativa en presencia de sal (Clark, 1986; Clark, 1988). Posiblemente ocurre mediante el reclutamiento de moléculas sucesivas de H1 al complejo H1-DNA. A pesar de la baja especificidad de secuencia, algunas proteínas de este grupo muestran preferencias por algunos tipos de secuencia como la descrita para la histona H1 por el DNA metilado, las estructuras cruciformes y las secuencias ricas en A/T (Churchill and Suzuki, 1989), entre las que se encuentran las secuencias asociadas al "scaffold", secuencias SAR (scaffold associated regions), que pudieran tener una gran importancia biológica (Izaurralde, 1989).

La histona H1 tiene especial preferencia por el DNA metilado, la cual, además, parece que puede aumentar con el grado de metilación (Jost, 1992; McArthur, 1996). Esta especial preferencia tiene lugar en condiciones de unión cooperativa y parece estar determinada por el dominio globular.

Las variantes de H1 presentes en núcleos reprimidos transcripcionalmente como la histona H5 muestran una mayor preferencia por este tipo de DNA, lo cual sugiere que dicho fenómeno podría ser presentar relevancia en la estabilización de la superestructura de la cromatina y la represión transcripcional (McArthur, 1996).

2.2.6 Modificaciones postraduccionales de la histona H1

La histona H1, al igual que las histonas internas, sufre varios tipos de modificación postraduccional: acetilación, metilación, poliADP-ribosilación, formilación, deimidación, ubiquitinación y fosforilación (García, 2004; Rall, 1971; Talasz, 1996).

La acetilación y metilación de las histonas H1 ocurre fundamentalmente en células en rápida proliferación, como en las de las gónadas. La fosforilación se considera la modificación fundamental en la H1 ya que ocurre en múltiples sitios en la molécula y está asociada al ciclo celular. La diversidad de efectos estructurales y funcionales que podría provocar, la convierten en un tema muy importante a estudiar para entender el papel de la H1 en la cromatina.

Acetilación

La histona H1 es modificada mediante dos tipos diferentes de acetilación, la que ocurre en el N-terminal y la que tiene lugar en el grupo ϵ -amino de las lisinas. La mayoría de las proteínas eucariotas pierden la metionina N-terminal y el aminoácido que queda en su lugar al inicio de la cadena polipeptídica es acetilado. Esta modificación ocurre co-traduccionalmente y no tiene una secuencia específica, aunque el 95% de los residuos acetilados son: serina, alanina, metionina, glicina y treonina. La acetilación del grupo ϵ -amino de la lisina es muy común en las histonas internas.

Fosforilación

La fosforilación de proteínas es un mecanismo de regulación fundamental en las células eucariotas. Se estima que al menos un tercio de las proteínas son fosforiladas de forma reversible. La fosforilación modula la actividad de numerosas proteínas involucradas en la transducción de señales, regula la afinidad de unión de factores de transcripción a sus coactivadores y al DNA, alterando la expresión génica, el crecimiento celular y la diferenciación. La fosforilación de la histona H1 es dependiente del ciclo celular, alcanzando su grado máximo durante la mitosis y mínimo en la fase G1 (Talas, 1996).

Todos los grupos fosfato se han perdido al final de la telofase, de manera que al principio del nuevo ciclo la H1 no tiene fosfatos. Estudios realizados han señalado que la fosforilación de la H1 está más directamente relacionada con la descondensación de la cromatina que con su condensación. Green y col., 1993, han demostrado que la H1 hipofosforilada se une con mayor fuerza al DNA que la H1 hiperfosforilada. Esta fosforilación disminuye la afinidad de la H1 por el DNA, lo que permitiría la descondensación necesaria en las diferentes etapas del ciclo celular (Sarg, 2006). La fosforilación moderada durante la interfase podría propiciar la descondensación necesaria en la cromatina para la replicación del DNA y la transcripción (Halmer and Gruss, 1996; Sarg, 2006).

Metilación

La lisina y la arginina pueden metilarse en sus cadenas laterales. Inicialmente se han descrito dos sitios metilados en la H1 (Fischle, 2003; Graziano, 1994).

ADP-ribosilación

La ADP-ribosilación de la H1 puede involucrar la unión covalente de la ADP-ribosa, con 8 - 10 ADP-ribosas por H1 o la unión no covalente de polímeros ramificados de ADP-ribosa con hasta 100-200 unidades por proteína.

Es evidente que la presencia de polímeros de ADP-ribosa en la H1 cambia su carga y se espera que afecte la interacción H1-DNA y H1-H1. *In vitro* la poli-ADPribosilación conlleva a una relajación significativa de la cromatina, pero no desplaza la H1 del DNA linker

In vivo esta modificación podría tener un papel regulador en la protección del patrón de metilación del DNA (D'Erme, 1996; Poirier, 1982).

Ubiquitinación

La ubiquitinación *in vitro* de la H1 fue descrita por primera vez en *Drosophila*, aunque sin identificar el sitio concreto (Pham, 2000). En las histonas del core, esta modificación se asocia con el aumento de la expresión (Moore, 2002), pero también su presencia en las H1 tiene efectos aún indeterminados.

2.2.7 La histona H1 en el núcleo celular

Las histonas H1 poseen una gran variedad de funciones en la célula, entre las que se encuentran, la formación de la superestructura de la cromatina (Graziano, 1994; Thomas, 1979). La estabilización de hasta dos vueltas de DNA nucleosomal alrededor del octámero por la interacción con el DNA en la entrada y la salida del nucleosoma (Staynov, 1988), la regulación transcripcional y la participación en otros procesos celulares. Sin embargo, su posición exacta en el cromatosoma y su papel en la regulación transcripcional de la expresión génica, todavía no se han establecido.

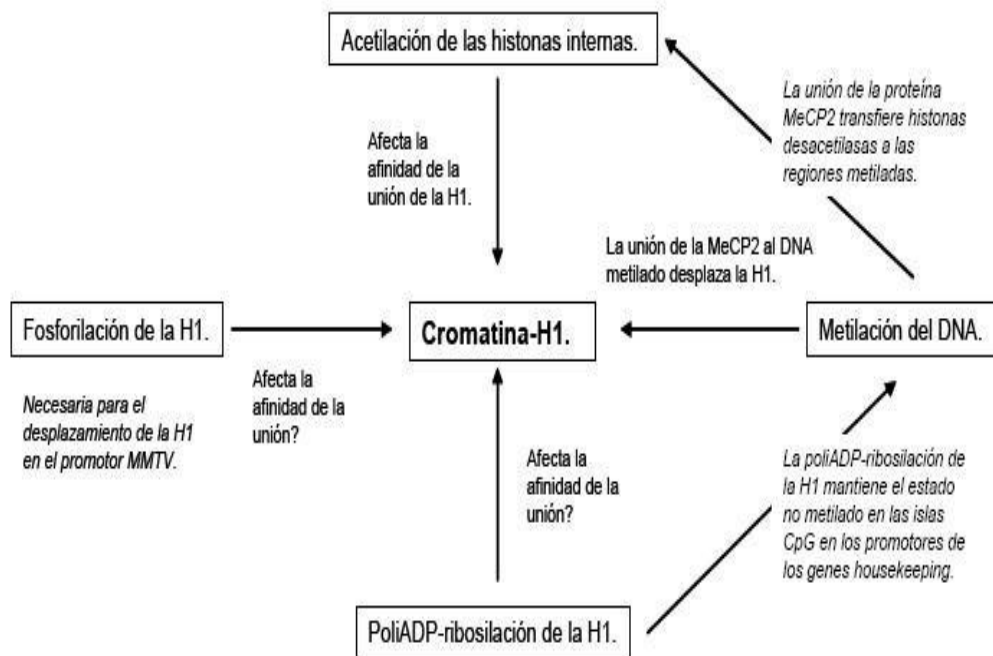


Figura 11. Interacciones que afectan la unión de la H1 a la cromatina. Adaptada de Zlatanova y col, 2000.

Inicialmente se pensaba que las H1 eran represores generales de la transcripción (Brown, 1997). Los estudios *in vitro* apuntaban a que H1 era un represor transcripcional y que algunos factores de transcripción actuaban como anti represores. En otros estudios se ha descrito una acción más específica de la H1 sobre determinados genes que pueden implicar tanto la represión como la activación de la transcripción, lo que sugiere un papel mucho más complejo para la H1.

La modificación de la estructura de orden superior de la cromatina ocasionada por la unión preferencial de la H1 a regiones SAR y su participación en el posicionamiento de los nucleosomas, podrían intervenir en la regulación de la transcripción (Izaurralde, 1989).

La modulación de la expresión por la H1 puede deberse también a la modificación de la accesibilidad de secuencias promotoras o de secuencias potenciadoras a los factores de transcripción. La estructura de la cromatina y su actividad transcripcional están estrechamente relacionadas. La compactación del DNA en la fibra de cromatina presenta una barrera para la maquinaria transcripcional. En muchos promotores los sitios de unión para los factores de transcripción se encuentran ocultos en la estructura nucleosomal.

Un mecanismo sencillo para permitir el acceso a la maquinaria de transcripción consiste en el desenrollamiento parcial del DNA alrededor del core nucleosomal. Este fenómeno parece ser espontáneo en la cromatina sin H1 (Yang, 1994).

Hay proteínas que se unen directamente a la H1 como es el caso de la nucleolina que es el responsable de inducir la descondensación de la cromatina al unirse a la H1 (Erard, 1999) o como también la protimosina α que es una proteína ácida nuclear al parecer involucrada en la proliferación celular (Karetsou, 1998). Por tanto, a partir de los datos anteriores se infiere la posición de la H1 en una red complicada de interacciones moleculares que modifican la expresión génica (Figura 11).

Las distintas modificaciones postraduccionales de las histonas internas actúan de forma secuencial o en combinación para regular la estructura de la cromatina, activando o reprimiendo la transcripción. Este conjunto de señales se conoce como el código de las histonas.

El papel de las modificaciones postraduccionales en la H1 y su acción coordinada con las histonas internas hace pensar que la H1 también podría incluirse en este mecanismo de regulación epigenética. La fosforilación de la histona H1 también se ha podido relacionar con algunos procesos nucleares tales como la remodelación de la cromatina dependiente de ATP, la ligazón (Kysela, 2005), la diferenciación celular (Yellajshyula, 2006), etc.

La defosforilación de la histona H1 puede ser relacionada con la diferenciación celular (Yellajshyula, 2006). Se ha encontrado que durante las fases S y M del ciclo celular, la histona H1 fosforilada es translocada al citoplasma (Bleher, 1999).

2.3 Definición de términos básicos

ADN: (Ácido desoxirribonucleico): molécula lineal muy larga que actúa como almacén de la información genética de todas las células.

Cromatina: Sustancia albuminoidea fosforada que, en forma de gránulos, filamentos, etc., se encuentra en el núcleo de las células y se tiñe intensamente por el carmín y los colorantes básicos de anilina; forman el conjunto de ADN, histonas y proteínas del núcleo de las células procariotas.

Cromosomas: Cada uno de los corpúsculos que se forman por condensación de la cromatina durante la mitosis y la meiosis.

Dominio de proteína: Parte globular compacta de estructura definida de una proteína.

Electroforesis: Proceso de separación de proteínas en gel en un medio eléctrico

Espermatocito: Célula primaria que antecede al espermatozoide, la cual puede ser diploide o haploide.

Espermatogénesis: Proceso biológico de maduración mediante el cual se forman los espermatozoides.

Espermatozoide: Célula reproductiva del sexo masculino.

Espermatogonia: Célula germinal masculina la cual antecede tanto al espermatocito y al espermatozoide.

Eritrocito: Célula sanguínea portadora de hemoglobina

Equinodermo: Phylum de animales deuteróstomos exclusivamente marinos y bentónicos

Fosforilación: Adición de un grupo fosfato (PO_4^{3-}) (fosforilo) a una molécula

Histonas: moléculas proteínicas que se encuentran en los cromosomas responsables de compactar el DNA para que quepa en el núcleo. Forman la cromatina junto con el ADN, sobre la base de unas unidades conocidas como nucleosomas.

Meiosis: Proceso de división celular propio de células sexuales.

Metilación: Adición de un grupo metilo (CH_3) a una molécula

Nucleosoma: Subunidad globular, en forma de cuenta de rosario, de cromatina formada por histona y ADN que aparece en la interfase.

SAR: Las SAR son regiones de varios cientos de pares de bases ricas en residuos de adenina y timina, abundantes en la heterocromatina.

Transcripción: Proceso de copiado de una hélice de ADN.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Materiales, reactivos y equipos

3.1.1 Material biológico

El material biológico utilizado para extraer la histona H1 fue esperma del erizo rojo, *Loxechinus albus*, miembro del Phylum Echinodermata, el cual comprende a más de 6 000 especies, entre las cuales se encuentran las estrellas de mar, pepinos de mar y los erizos. Las características más importantes de los erizos de mar son su simetría radial (pentarradial) y la presencia de un esqueleto formado por piezas calcáreas que forman un caparazón o “testa” rígido (Barnes, 1989).

El erizo rojo *Loxechinus albus* pertenece a la siguiente clasificación sistemática:

Reino	Animalia
Phylum	Echidermata. Brugiere, 1971
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

En la costa sur occidental del Océano Pacífico, el erizo rojo *Loxechinus albus* se distribuye desde la Isla Lobos de Afuera (6°53'50" S) en el Perú, hasta Cabo de Hornos (55° S) en Chile (Castilla, 1990).

El erizo rojo se encuentra desde la zona intermareal de 0 metros hasta 340 metros de profundidad, sobre fondos duros, utilizando sus pies ambulacrales como medio de locomoción y sus espinas como defensa y captura de algas a la deriva que utiliza como alimento. Presenta una conducta gregaria y aunque su alimentación se basa en algas, no es extraño que se alimenten de cualquier cosa que puedan romper sus dientes.

El erizo rojo, animal deuterostomado, posee un caparazón o “testa” globoso cubierto de espinas calcáreas quebradizas, conformado por 10 placas calcáreas (denominadas ambulacrales e interambulacrales), lo que se conoce como simetría pentaradial. Las placas ambulacrales están perforadas para permitir la acción de los pies ambulacrales, estructuras que permiten la movilización del erizo. La boca o placa bucal, posee un sistema dental denominado “linterna de Aristóteles” que está en contacto con el sustrato permanentemente, mientras que el ano se ubica en la región aboral del caparazón.

El erizo es detritívoro en sus etapas juveniles y herbívoro como adulto. Posee sexos separados (dioico), sin dimorfismo sexual externo. Posee 5 gónadas conocidas normalmente como “lenguas”, estructuras que han ocasionado la explotación comercial de este invertebrado, dado que el resto del animal no es utilizado por el ser humano (Contreras y Castilla, 1987).

Las diferencias en su época de desove a lo largo del país, serían atribuibles, según se postula, a la temperatura. Presenta fecundación externa, cuyos embriones se transforman en larvas pluteus que permanecen por dos o tres semanas en el plancton para luego metamorfosearse hacia un juvenil de erizo (Bustos y Olave, 2001) que se asienta al sustrato (roca o conchillas).

El crecimiento es lento (1 a 3 mm por mes en promedio), alcanzando tallas máximas de 120 a 130 mm. La talla mínima legal (70 mm) la alcanza entre los 4 y 5 años de edad. La talla crítica oscila cercana a los 60 a 80 mm y la talla de primera madurez sexual se alcanza entre los 40 a 50 mm. (Barahona et. al., 2003).

Habita como epifauna en fondos duros. Tiene un comportamiento gregario (forma grupos desde unos pocos individuos hasta millares) principalmente para protegerse de los depredadores (peces, estrellas de mar y jaibas) y para alimentarse de frondas de algas flotantes o ramonear sobre el sustrato. Posee mayor actividad nocturna y cuando queda expuesto al sol se cubre con trozos de alga y conchilla. Habita sobre sustrato rocoso en el intermareal y submareal somero, cercano a praderas de macroalgas (Contreras y Castilla, 1987).

La colecta de especímenes de *Loxechinus albus* se realizó en la localidad de Vila Vila (Tacna) durante el mes de julio y setiembre del año 2011. Los animales fueron transportados rápidamente hasta el laboratorio de Bioquímica y Nutrición en agua de mar a 4 °C, en el cual fueron sometidos a los procedimientos indicados más adelante.

En la presente investigación se tomaron muestras que se seleccionaron debidamente al azar, teniendo en cuenta la madurez sexual, primeramente en los meses referidos a la madurez sexual de los individuos y también mediante la madurez gonadal, esto último fue comprobado por métodos morfológicos estándares que caracterizan a individuos de edad adulta y madurez sexual lo que fue constatado después en el laboratorio la existencia de espermatozoides, mediante la visualización de espermatozoides al microscopio simple, por una preparación simple. Asimismo se ha utilizado como marcador de peso molecular las histonas totales de eritrocito de pollo, cuyo procedimiento de extracción se muestra a continuación del proceso de extracción de las histonas del erizo rojo.

3.1.2 Material de laboratorio

Además del material de uso común en un laboratorio de bioquímica se utilizaron los siguientes materiales adicionales:

- Vernier
- Hipodérmicas
- Puntas para las micropipetas de 5 – 40 μ L y 100 – 1000 μ L.
- Eppendorfs de 1,5 mL
- Eppendorfs de 2,0 mL
- Papel de filtro Whatmann # 1
- Peines modeladores de 0,75 mm de espesor
- Peines modeladores de 1,50 mm de espesor
- Separadores de geles de 0,75 mm de espesor
- Separadores de geles de 1,50 mm de espesor
- Placas de vidrio de 13 x 12 cm.

3.1.3 Reactivos

Los reactivos empleados en la realización del presente trabajo fueron aquéllos de uso común en el Laboratorio de Bioquímica y Nutrición, otros reactivos específicos para el desarrollo del presente estudio se tuvieron que adquirir, tales la acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, Trizma base, HCl, PSA, PCA, H₂SO₄, SDS, etanol, butanol, glicina, glicerol, β-mercaptoetanol, fenilisotiocianato (PITC), Coomassie Blue R-250 y G-250, PMSF, Cloruro de Benzamidina, urea de grado ultra pura, thiourea, peróxido de hidrógeno, norleucina, verde de metilo, acetonitrilo, acetona, Triton X-100, sucrosa, CaCl₂, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. Todas las soluciones se prepararon a temperatura ambiente con agua destilada y bidestilada los cuales pasaron a ser conservados para su posterior utilización a 4° C y a -20° C, debido a que estas soluciones son sensibles tanto a la luz del sol, como a la temperatura, en los cuales en ambos casos si no se tiene el cuidado adecuado éstas soluciones podrían originar resultados no adecuados en cualquiera de los pasos a seguir en la presente investigación.

3.1.4 Equipos

Entre los principales equipos utilizados en el presente estudio fueron:

- Espectrofotómetro UV-Visible UNICO 212
- Centrífuga de mesa Mann
- Micro centrífuga de mesa Eppendorf
- Balanza analítica Sartorius
- Cámara electroforética Sigma
- Fuente de poder de 250 V Sigma

- Autoanalizador Alpha Plus-2 (Pharmacia LKB Biotech.)
- Cámara fotográfica Canon
- Micro pipetas de 5-40 μ L Eppendorf
- Micro pipetas de 100-1000 μ L Brand
- Microscopio compuesto binocular con cámara Boeco
- Vortex Boeco
- Cámara Neubauer Boeco
- Homogeneizador de Potter Sigma
- SpeedVac Sigma
- Bomba de Vacío LKB-2150
- Detector Biosystem Modelo 100
- Aplicador de muestra Spark Holland

3.2 Métodos utilizados

3.2.1 Obtención de espermatozoides del erizo rojo *Loxechinus albus*

Organismos adultos de erizo rojo *Loxechinus albus* fueron colectados en forma regular en la costa rocosa de la caleta de Vila Vila, Tacna, durante los meses de julio a setiembre del 2011, que corresponden al periodo en que comienzan a desovar sus gametos. La obtención del espermatozoides fue realizado por el método del desove inducido, mediante la inyección de solución de KCl que estimula el desove de espermatozoides, por tal motivo solamente fueron seleccionados individuos de diámetro de testa entre 55–70 mm, posteriormente a esos individuos se procedió a realizar la inyección de 2,5 ml de la solución de KCl 0,55 M en la parte oral del erizo

introduciendo la aguja entre la mandíbula y la testa (Hinegardner 1975; Strathmann 1987).

Al comenzar el desove inducido aproximadamente a los 3 ó 4 minutos de aplicada la inyección de KCl a cada individuo, este desove se hizo notorio a la vista pudiendo diferenciar explícitamente los sexos, es decir, el color de la secreción tanto de la hembra como del macho eran completamente distintos; del individuo macho la secreción es un líquido lechoso de color cremoso, mientras que la secreción de la hembra es de un color rojo claro pronunciado, para corroborar completamente tal diferencia, se evaluó al microscopio a 450 aumentos, verificándose la diferenciación entre los individuos machos y hembras, teniendo en cuenta la morfología propia de los espermatozoides y de los óvulos.

El esperma obtenido de los especímenes machos fue recolectado en tubos eppendorf de 1,5 ml, y también fueron colectados en tubos de ensayo de tapa rosca que contenían una solución de alcohol de 96° para conservar el esperma y evitar proteólisis, y luego transportarlos al Laboratorio de Bioquímica, donde fueron puestos en congelación para su tratamiento al día siguiente. Las muestras fueron lavadas con agua de mar filtrada y hervida para crear un ambiente propio a la célula espermática, lo cual fue comprobada gracias a la visualización microscópica, evidenciando una morfología particular, es decir, la cabeza con acrosoma, cuello y cola, que además presentaban ligeras modificaciones propias de la especie.

Las concentraciones de espermatozoides se obtuvieron de la solución concentrada, con ayuda de una cámara Neubauer de 0,1 mm de profundidad y fueron colectados en tubos Eppendorf de 1,5 ml, y también colectados en tubos de ensayo

de tapa rosca, en el caso que se desee conservar por más tiempo en etanol al 90 %. Ambos recipientes son conservados en refrigeración a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la refrigeradora del Laboratorio de Bioquímica.

3.2.2 aislamiento de núcleos espermáticos de *Loxechinus albus*

Para la obtención de núcleos espermáticos de erizo rojo *Loxechinus albus* se procedió a resuspender el esperma con un tampón isotónico a pH fisiológico, y mediante una homogenización suave se realizó lavados sucesivos por centrifugación a baja fuerza centrífuga y por periodos de tiempo cortos (Cheveau *et al.*, 1956).

El protocolo seguido fue:

- 1) Mediante una preparación en una lámina portaobjetos, se controló por observación al microscopio, la motilidad de los espermatozoides.
- 2) Se resuspendió 200 μl de espermatozoides y se colocó en un eppendorf de 1,5 ml, inmediatamente colocar 1000 μl de la solución tampón A. Se colocó en el vortex para disgregar los espermatozoides.
- 3) Se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 4) Se repitió el lavado 2-3 veces, eliminando siempre el sobrenadante.
- 5) Se resuspendió los espermatozoides en 500 μl de solución tampón A y se homogenizó exhaustivamente con homogeneizador de Potter.
- 6) Se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se eliminó el sobrenadante.
- 7) Se resuspendió el sedimento en glicerol para conservarlos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 8) 100 μl de espermatozoides resuspendidos en glicerol fueron mezclados con tres volúmenes de solución Tampón A. Se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- 9) Se repitió el proceso 2-3 veces, de esa manera se retiró el glicerol de los espermatozoides.
- 10) Se resuspendió el sedimento de espermatozoides con solución Tampón A conteniendo Triton X-100 0,5%. La suspensión se incubó a 4 °C (hielo) durante 10 minutos.
- 11) Se centrifugó a 1500 g durante 10 minutos a 4 °C y se eliminó el sobrenadante.
- 12) Se resuspendió el sedimento con solución Tampón A mediante pipeteo.
- 13) Luego de centrifugar a 1500 g durante 10 minutos a 4 °C se eliminó el sobrenadante.
- 14) Se resuspendió con 200 µL de solución Tampón A y luego se añadió 2 volúmenes de glicerol para conservarlos a -20 °C.
- 15) Se estimó la concentración de núcleos espermáticos por recuento en una cámara de Newbauer.

3.2.3 Extracción y purificación de histonas de los núcleos espermáticos

Las proteínas del núcleo espermático por su naturaleza básica son extraídas con ácidos (débiles y fuertes). Las histonas pueden ser extraídas con ácido acético al 35 % (Subirana *et al.*, 1973), y las proteínas más básicas como las protaminas pueden ser extraídas con HCl 0,4 N (Subirana *et al.*, 1973) o H₂SO₄ 0,4 N (Hoffmann & Chalkley, 1978). Algunas de estas proteínas como en el caso de la histona H1 y familia muestran solubilidad diferencial en ácido perclórico (PCA) al 5 % (Goodwin *et al.*, 1978).

Método I: Extracción de histonas totales (H1, H2a, H2b, H3 y H4) de *L. albus*

1. Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones de frío (4 °C), este ambiente es necesario para minimizar en lo posible la proteólisis de las proteínas contenidas en los núcleos espermáticos.
2. La muestra de inicio estuvo constituida por espermatozoides de erizo rojo *Loxechinus albus* conservados cuidadosamente en etanol 90 % o como alternativa el glicerol.
3. Se realizó la primera centrifugación llevada a cabo con las condiciones de 14 000 rpm, por 5 minutos.
4. Se obtuvo un sedimento y un sobrenadante, el sobrenadante fue desechado, y el sedimento fue resuspendido en 5 volúmenes de Tris/HCl 10 mM, pH 7,4 / cloruro de benzamidina 25 mM (un inhibidor de la proteólisis). La resuspensión (y los lavados posteriores) se hacen en un homogeneizador de Potter suavemente.
5. La centrifugación nuevamente fue realizada a 14 000 rpm x 5 minutos.
6. Se obtuvo nuevamente un sobrenadante y un sedimento, se desecha el sobrenadante y se procede con el sedimento la extracción de proteínas básicas con 5 volúmenes de HCl 0,4 N, durante 10 minutos en condiciones de frío mientras se va homogenizando con cierta intensidad en un intervalo de tiempo de cada tres minutos.
7. Se procedió a centrifugar a 13000 rpm x 5 minutos, de lo cual se obtuvo nuevamente un sedimento, el cual en esta oportunidad fue descartado y el sobrenadante obtenido, el cual contiene todas las histonas, incluida la histona H1, luego de esto se obtuvieron dos alícuotas A y B.

Alícuota A: Extracción de histonas totales (H1, H2a, H2b, H3 y H4) de L. albus.

- i. Se realizó una precipitación con 6 volúmenes de acetona a -20 °C (siempre conservando las condiciones de frío para minimizar la proteólisis).
- ii. Se mantuvo alrededor de una hora a -20 °C.
- iii. Después de la hora transcurrida, nuevamente se procedió a la centrifugación respectiva a la velocidad y tiempo mencionados.
- iv. Se recogió el sedimento, el cual contenía todas las histonas H1 y las histonas core, y se descartó el sobrenadante.
- v. Se lavó con acetona (-20 °C) y se procedió a la homogenización con el homogenizador de Potter para luego ser sometido nuevamente a centrifugación a las mismas condiciones antes mencionadas y nuevamente el sobrenadante obtenido es descartado y el sedimento es secado en SpeedVac.
- vi. El polvo seco obtenido corresponde a las **histonas totales** que se observa en la electroforesis.

Alícuota B: Extracción y purificación de la histona H1 de L. albus.

- i. Se adicionó PCA (ácido perclórico) concentrado a la alícuota hasta lograr el 5 % del mismo.
- ii. Se dejó en hielo (condiciones de frío) 10-15 minutos donde se formó un precipitado, se somete a centrifugación en las mismas condiciones, luego se obtuvo un sedimento (P1) y un sobrenadante (S1).
- iii. El sedimento P1, se lavó con acetona como en los pasos anteriores y luego se procedió a centrifugación en las mismas condiciones y luego se vuelve a lavar

y a centrifugar en las mismas condiciones luego se obtuvo el sobrenadante que es descartado y el sedimento secado en SpeedVac.

- iv. Este sedimento corresponde a las **histonas core** sin la H1.
- v. Al sobrenadante (S1): Se añadió 6 volúmenes de acetona a -20 °C y se mantuvo 1 hora a esta temperatura, luego se formó un precipitado el cual se pasó a centrifugar, a las mismas condiciones anteriormente descritas.
- vi. El sobrenadante es descartado y el sedimento se volvió a lavar con acetona y secado en el SpeedVac.
- vii. Este sedimento corresponde a la **H1 específica** del espermatozoide de *Loxechinus albus*.
- viii. Para el caso del análisis de la composición aminoacídica de la histona H1 (se hace primero una hidrólisis al vacío a 110 °C con HCl 6 N y luego se analiza la concentración de cada residuo aminoacídica en HLPC).

Método II: Extracción y purificación de histonas H1 de *L. albus*

Los pasos anteriormente descritos desde 1 hasta el paso 6 siguen de la misma forma anteriormente descrita, a partir del paso 6:

- vii. Se precipitaron las histonas (el sobrenadante) con 6 volúmenes de acetona (-20 °C)
- viii. Lavamos con acetona y secamos en SpeedVac (como antes)
- ix. Cuando tenemos el polvo de proteínas, se redisolvió con HCl 0,1 N.
- x. Se añadió PCA concentrado hasta que la solución quede al 5 % de PCA
- xi. Se forma un precipitado (histonas core)

- xii. Centrifugamos (como fue descrito anteriormente)
- xiii. Sedimento: lavado y secado como siempre corresponde a las **histonas core sin H1**
- xiv. Sobrenadante: precipitamos con 6 volúmenes de acetona (-20 °C, se lavó y secó como fue descrito) y se centrifugó como siempre.
- xv. Sedimento: lavado y secado como siempre: Corresponde a la **H1 específica**.
- xvi. Por este método la H1 sale pura, pero las histonas restantes tienen cierta contaminación de la H1.

Nota: Con los protocolos realizados se ha logrado aislar las histonas H1 del erizo rojo *Loxechinus albus* y también las histonas totales de dicha especie.

3.2.4 Obtención de núcleos de eritrocito de pollo (*Gallus gallus domesticus*)

Los núcleos de eritrocito de pollo se obtuvieron según el procedimiento descrito por Weintraub *et al.* (1975). Se recoge sangre de pollos recién sacrificados sobre un volumen de buffer isotónico (Tris-HCl 10 mM, pH 7,1, citrato de sodio 25 mM, NaCl 0,14 M) en un baño de hielo. La sangre diluida se centrifuga a $500 \times g$ durante 10 min para recoger las células sanguíneas, y éstas se lavan dos veces con el mismo buffer. El sedimento final se resuspende en cuatro volúmenes de buffer de lisis celular [Tris_HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, Triton X-100 0,5 % (v/v)] y se agita suavemente durante 90 min a 4°C. Los núcleos se recogen por centrifugación a $1000 \times g$ durante 10 min y se lavan con buffer de lisis hasta conseguir un sobrenadante claro.

3.2.5 Extracción y purificación de histonas totales de eritrocito de pollo

A partir de los núcleos de eritrocito de pollo se extraen tanto histonas internas como histonas totales (histonas internas más H1 y H5). Para obtener histonas totales, los núcleos se resuspendieron en HCl 0,25 M y se agitaron enérgicamente durante 12 h a 4 °C. Tras recuperar el sobrenadante por centrifugación a $14\ 000 \times g$ durante 15 min, el sedimento se reextrae de igual forma con HCl 0,25 M, durante 4 h más. Se reúnen los dos sobrenadantes y, una vez filtrados a través de una placa de vidrio poroso número 4, se precipitan las histonas por adición de ocho volúmenes de acetona, dejando la mezcla a -20 °C durante una noche. Las histonas se recogen por centrifugación a $14\ 000 \times g$ durante 15 min y, después de dos lavados con acetona anhidra, se secan a vacío. La calidad de las histonas se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, como se describió posteriormente.

3.2.6 Análisis cuantitativos de las histonas

Con el objeto de obtener concentraciones cuantitativas de las histonas H1 y totales para la electroforesis en gel de poliacrilamida, la determinación de la concentración de proteínas se realizó por medio del método espectrofotométrico de Bradford. Dicha metodología se basa en la diferencia de cambio de color de un colorante como respuesta a la concentración de proteínas. El colorante utilizado fue el Coomassie Blue G-250 en solución ácida, y que además posee un máximo de absorbancia a 465 nm, éste máximo cambia a 595 nm cuando se une a la proteína. Alternativamente, el método puede ser utilizado bajo dos procedimientos dependientes de la concentración de proteínas a determinar. La curva estándar tiene un rango lineal (donde se cumple la Ley de Beer) entre 200–1400 $\mu\text{g/mL}$. El

procedimiento del micro ensayo tiene su linealidad para concentraciones de proteínas entre 1 µg/ml a ≤ 25 µg/mL.

3.2.7 Caracterización de la histona H1 de *Loxechinus albus*

El método de separación electroforética se basa en la migración diferencial de las moléculas en solución a través de un campo eléctrico. Este método es de amplia aplicación en la biología molecular, especialmente en la purificación y caracterización de proteínas y estudios de ácidos nucleicos. En breve, la velocidad de migración o movilidad electroforética de las moléculas en el campo eléctrico depende de su intensidad, del tamaño, forma y carga neta de las moléculas, y también de la fuerza iónica y temperatura del medio que se desplazan.

Actualmente, el soporte más frecuentemente utilizado para separar electroforéticamente proteínas, es el gel de poliacrilamida. Estos geles se forman por la polimerización de largas cadenas de monómeros de acrilamida unidas covalentemente en presencia de bisacrilamida que actúa como agente entrecruzador. La polimerización se inicia por la presencia de radicales libres que se forman al reaccionar el persulfato de amonio con el catalizador TEMED.

3.2.7.1 Electroforesis en PAGE-AU

La electroforesis en geles de poliacrilamida-ácido acético-urea (PAGE-AU) fue desarrollada por Panyim & Chalkley (1969) para el análisis de las histonas y proteínas con un alto contenido de aminoácidos básicos. Se fundamenta en la separación de las proteínas por su carga eléctrica, de tal forma que se pueden separar

proteínas de similar tamaño pero de diferente carga eléctrica. Este sistema de electroforesis también permite la separación de proteínas extremadamente básicas. Inicialmente, este tipo de geles se preparaba con PSA como activador y TEMED como catalizador, luego estos fueron reemplazados por la tiourea y agua oxigenada, respectivamente (Hurley, 1977). Estas modificaciones evitan la pre-electroforesis y reducen considerablemente el tiempo de polimerización.

Protocolo

Se preparan las placas de vidrio limpiando con alcohol así como otros materiales para preparar la cámara electroforética.

Preparación del gel:

Solución	Concentración final
Urea	2,5 M
Tiourea	0,09 %
Acrilamida 30 %/Bisacrilamida 0,2 %	15 % - 0,1 %
Ácido acético 43 %	5,4 %
Agua	Hasta completar el volumen
H ₂ O ₂ 30 %	0,2 – 0,5 %

Fuente: Panyim & Chalkley (1969)

La urea y tiourea se pesan solamente al momento de preparar el gel. Las soluciones de acrilamida, ácido acético y peróxido son conservadas a 4 °C. El peróxido se mantiene en un frasco oscuro o recubierto con papel aluminio para evitar la luz y su descomposición. Cuando se prepara el gel se mezclan todos los componentes, sin el peróxido, en este momento la solución del gel puede ser desgaseada, luego se añade peróxido y rápidamente se mezcla en forma suave y se vierte entre las placas de vidrio que forman el sistema de la cámara de electroforesis.

Se coloca el peine y se espera la polimerización (10-15 minutos) a temperatura ambiente.

Cuando el gel polimeriza, se retira el peine e inmediatamente, los pozos deben ser lavados exhaustivamente con una pipeta o una jeringa usando agua o tampón de electroforesis. Luego el gel es montado en forma vertical en la cubeta y se vierte el tampón de corrida. El tampón de electroforesis es una solución de ácido acético al 5 % donde no se necesita ajustar el pH de la solución (3,2 aproximadamente). Las muestras son preparadas con el siguiente tampón 2X: β -mercaptoetanol 20 mM; urea 8 M; ácido acético 5 %; verde de metilo 1% (azul de bromofenol); glicerol 20%. La electroforesis se desarrolla a 20 mA (I constante) y 100–150 voltios (dependiendo del grosor del gel). Evitar el sobrecalentamiento.

3.2.7.2 Electroforesis en PAGE-SDS

Inicialmente, el sistema fue desarrollado por Laemmli (1970) y modificado por Thomas y Komberg (1978). En este tipo de electroforesis tanto el soporte (gel) como el buffer de corrida tienen entre otros componentes SDS como agente tensioactivo. Por otro lado, las proteínas se mezclan con un buffer de muestra, uniéndose al detergente aniónico SDS.

Finalmente, todas las proteínas desnaturalizadas se encuentran solubilizadas y cargadas negativamente por la unión del SDS, la cantidad de SDS que se asocia a una proteína es aproximadamente proporcional a su peso molecular. Así, este método electroforético permite estimar el peso molecular aparente (MW_{ap}) de una proteína en forma relativa al peso molecular y movilidad electroforética de proteínas estándar.

En general, este método permite separar una amplia variedad de proteínas ácidas y básicas; exceptuando las protaminas debido a que éstas forman agregados insolubles y no penetran el gel.

a) Preparación de los geles de poliacrilamida

Los geles se prepararon en lámina para electroforesis vertical de tipo discontinuo (gel apilador y gel separador). El tamaño del gel fue variable dependiendo de los requerimientos experimentales; habitualmente, se utilizó placas de 13 x 12 cm y espesores de 0,75 ó 1,5 mm. Las placas, peines y espaciadores fueron lavados en agua, secados y desengrasados con etanol y luego secados al aire. Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

GEL APILADOR	
Soluciones	Concentración final
Acrilamida 30 %/Bisacrilamida 0,8 %	5 % -0,13 %
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	0,125 M
SDS 10 %	0,1 %
Agua bidestilada	Completar volumen
PSA 10 %	0,1 %
TEMED	0,1 %

GEL SEPARADOR	
Soluciones	Concentración final
Acrilamida 30 %/Bisacrilamida 0,8 %	15 % -0,4 %
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	0,75 M
SDS 10 %	0,1 %
Agua bidestilada	Completar volumen
PSA 10 %	0,1 %
TEMED	0,05 %

Fuente: Thomas y Komberg (1978)

Primero se prepara el gel separador y se vierte entre las placas de vidrio, se deja reposar en posición vertical hasta que polimerice. El oxígeno es un inhibidor de la polimerización, por esta razón se añade suavemente butanol saturado en agua, lo suficiente para cubrir el gel.

Cuando el gel polimeriza (35 minutos aproximadamente) se elimina el butanol y se lava el gel con agua 2-3 veces durante 20 segundos cada vez. Luego se añade el gel apilador y se inserta el peine para formar los pozos, cuidando que no queden burbujas de aire atrapadas, se deja polimerizar durante 30 minutos. Se retira el peine y se lavan los pozos con buffer de corrida.

El tampón de electroforesis fue una solución de: Tris 0,6 % (0,05 M), Glicina 2,88 % (0,38 M), y SDS 0,1 %. Esta solución tiene un pH aproximado de 8,3 y no requiere ser ajustado con HCl. Las muestras se preparan con: Tris 0,0625 M, SDS 2 %, glicerol 10 %, β -mercaptoetanol 5 %.

Se añade Azul de bromofenol 0,1 % para obtener el buffer con una coloración azulada, y ser utilizado como una señal en la corrida electroforética. El pH de la solución sin ajustar es aproximadamente de 6,8.

El buffer de muestra tiene dos funciones, por un lado desnaturaliza las proteínas, y por otro apantalla las proteínas cargándolas negativamente, en realidad el SDS se une a los dominios hidrofóbicos y forma verdaderas micelas aniónicas. Finalmente, las proteínas se terminan de desnaturalizar en la presencia de β -mercaptoetanol en baño maría a 100 °C durante 5 minutos, de esta forma las proteínas oligoméricas son desmontadas en subunidades monoméricas.

b) Condiciones del desarrollo electroforético

La polaridad de este sistema electroforético es de polo negativo (-, parte superior) a polo positivo (+, polo inferior). A pH 8,3 del buffer de electroforesis la glicina tiene carga neta negativa, y migra rápidamente formando el frente de la electroforesis. La mejor condición de electroforesis es fijando el voltaje constante, porque de esta forma se controla mejor la temperatura evitando su incremento, y sobrecalentamiento del gel. Esto último puede ser evitado usando un sistema de recirculación de agua para enfriar el gel o desarrollando la electroforesis a 4 °C. La electroforesis puede ser desarrollada a voltaje constante o amperaje constante.

c) Efecto apilador del sistema discontinuo

Las proteínas se apilan en el gel apilador permitiendo que toda la muestra ingrese en forma simultánea al gel separador. Este efecto se produce a consecuencia de la diferencia de potencial local entre el buffer de electroforesis (pH 8,3) y el gel apilador (pH 6,8), en esta situación las proteínas que se encuentran delante del frente (interfase) se aceleran y las que son adelantadas por el frente se retrasan, y finalmente la mezcla de proteínas se concentra para ingresar al gel separador donde la diferencia de potencia es anulada, y la movilidad es por la carga neta electronegativa.

d) Tinción de geles con azul de Coomassie

El colorante Azul de Coomassie R-250 es generalmente el más aceptado para la tinción de los geles. El Coomassie R-250 se une a las proteínas, y la intensidad de la coloración es relativamente y hasta cierto punto independiente de la concentración

y de la naturaleza química de las proteínas; de esta forma, cuando se tiene que cuantificar una proteína es el colorante más recomendado.

La solución de tinción del gel tiene entre sus constituyentes metanol y ácido acético, lo cual permite que las proteínas se fijen en el gel y no eluyan durante el proceso de tinción y desteñido del gel; además, el metanol es el solvente adecuado para disolver el Coomassie Blue. El tiempo de tinción del gel depende de varios factores; entre ellos, el espesor y tamaño del gel, vejez del colorante, coloración en agitación, etc. La tinción se efectúa entre 30 minutos a toda la noche. Seguidamente a la tinción, el gel debe ser desteñido por difusión del Coomassie que no se ha unido a proteína, a fin de contrastar las bandas de proteínas del fondo del gel.

La solución de Azul Brillante de Coomassie R-250 (0,25 %) contenidos para un litro de solución se prepara con 2,5 g de Azul Brillante de Coomassie R-250, 100 ml de ácido acético concentrado, 400 ml de metanol y agua destilada, enrasar hasta 1 litro. Se recomienda disolver el colorante con un poco de metanol. Filtrar la solución antes de utilizar por primera vez. La solución desteñidora se prepara con 400 ml de metanol, 100 ml de ácido acético glacial y 500 ml de agua destilada o desionizada.

Terminada la electroforesis, remover y marcar un punto de referencia para identificar los carriles. Sumergir el gel en un recipiente que contenga la solución de tinción. El colorante debe ser suficiente para cubrir el gel. Dejar el recipiente en agitación suave durante 20-30 minutos. Los gels con espesor <1 mm son muy delicados, la agitación debe ser muy suave o dejarlos sin agitar. Retirar la solución de tinción (verter o aspirar). Añadir la solución desteñidora. Dejar el recipiente a temperatura ambiente y en agitación suave. Cambiar la solución desteñidora. Este

proceso puede durar desde varias horas hasta toda la noche. El desteñido es satisfactorio cuando el color de fondo es claro y las bandas de las proteínas contrastan adecuadamente del fondo del gel.

La solución de tinción puede ser filtrada en papel Whatman # 1. Frecuentemente, el colorante es reusado y si la tinción no es satisfactoria, el gel puede ser teñido nuevamente con solución fresca. Rutinariamente, 30 minutos son suficientes para teñir el gel, pero tiempos mayores pueden ser necesarios dependiendo del tamaño y espesor del gel, etc.

La solución desteñidora puede ser reusada varias veces luego de ser reciclada por filtración a través de carbón activo en un filtro Whatman #1. Un criterio para considerar envejecidas la solución de tinción y/o desteñido es el hinchamiento del gel a consecuencia de la hidratación de las soluciones (en realidad, se debe a la evaporación del metano). La sensibilidad de la tinción con Coomassie R-250 puede variar desde 0,5-5,0 µg/banda en un minigel de 10 pozos. Desteñido el gel puede ser fotografiado en blanco y negro, se puede mejorar el contraste del gel usando un filtro amarillo, o en caso contrario fotografiar con una cámara moderna a colores.

3.2.7.3 Determinación del peso molecular

El proceso para la determinación del peso molecular de la histona H1 consistió en el diseño de una curva estándar utilizando el peso molecular de proteínas conocidas, en éste caso las histonas de eritrocitos de pollo para luego poder así proyectar valores de Rf de las histonas H1 e histonas core de *Loxechinus albus* y encontrar así sus pesos moleculares.

El software de análisis de imagen de electroforesis fue el Gel Analyzer. El proceso de análisis de imágenes de gel cubre todos los aspectos principales de la evaluación de la detección automática de carril a cálculos precisos de peso molecular. Esta herramienta ayuda a mejorar la exactitud de la evaluación de gel, como métodos de sustracción de fondo y calibración de Rf para poder obtener el peso molecular de las histonas en comparación con las histonas de eritrocitos de pollo (peso molecular conocido).

Gel Analyzer no necesitó ser un sistema de documentación para evaluación de imagen simple. Se pudo obtener la imagen del gel con una cámara digital común. Gel Analyzer está desarrollado en lenguaje Java, por lo tanto funciona en cualquier sistema operativo que tiene instalado Java. Necesita Java Runtime Environment (JRE) versión 1.6 o posterior para ejecutar Gel Analyzer.

3.2.7.4 lisis de aminoácidos de la histona H1

Para realizar el análisis composicional de las proteínas se realizaron hidrólisis ácidas. El HCl es ampliamente utilizado para hidrolizar proteínas, en un procedimiento simple que involucra la hidrólisis de la proteína en sus aminoácidos constituyentes con exceso de HCl, luego el exceso de HCl es removido al vacío (Moore and Stein, 1963). Los materiales que se utilizaron fueron: Tubos de hidrólisis (Pyrex) 13 x 200 mm, HCl 6 N ó 12 N, mechero de acetileno, bomba de vacío, rotavapor, hielo seco y acetona.

Una cantidad adecuada de proteína para hidrolizar es de 0,05 – 0,2 mg. La proteína liofilizada es resuspendida en HCl 6 N (1-2 ml), si esta en solución, se le añade 1 volumen de HCl 12 N, y luego se completa hasta 1-2 ml con HCl 6 N. La proteína en solución HCl 6 N se deposita en el tubo de hidrólisis, luego se congela usando hielo seco y acetona.

Con la muestra congelada se hace vacío en el tubo, y paulatinamente se va descongelando la muestra aplicando calor, cuando es evidente que el vacío del tubo es total, se sella el tubo en su constricción.

Luego, se hidroliza la proteína incubando el tubo a 110 °C durante 24 horas. Al cabo de la incubación, el tubo es abierto y el HCl residual en exceso es evaporado en un rotavapor a 45 °C.

La hidrólisis puede ser conservada en congelación hasta su análisis, para lo cual se resuspende en un tampón adecuado. Los tubos deben de estar totalmente limpios, pueden ser lavados con solución sulfocrómica, luego aclarados con agua destilada en forma exhaustiva para retirar trazas de metales y oxidantes.

El sellado al vacío debe realizarse con mucha atención, puesto que el oxígeno es un agente inhibidor de la hidrólisis. Los hidrolizados fueron analizados en un autoanalizador Alpha Plus-2 (Pharmacia LKB Biotech.) en el Serveis Científico-Técnicos de la Universitat de Barcelona, Barcelona-España.

3.2.7.5 Composición de aminoácidos de la histona H1

Realizado el procedimiento del aislamiento de la histona H1 en estado purificado, se procede a determinar la composición molar de la misma. El procedimiento de caracterizar la histona H1 consta de 3 pasos: Hidrólisis de la histona H1, derivatización de aminoácidos con PITC y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

i. Hidrólisis de la histona H1

En la hidrólisis de la histona H1, la muestra de aproximadamente 20 nanomoles, se hidrolizó al vacío a 110 °C en HCl 6 N durante 24 horas al cabo del cual, es secada por evaporación rotatoria y al vacío. Cada fracción proteica se sometió a una hidrólisis en HCl 6 N, colocándose en ampulas de vidrio, extrayendo el aire con una bomba de vacío y sellando las ampollas por calentamiento en llama de oxidación de un mechero de gas propano. La hidrólisis se tuvo que llevar a cabo en ausencia de oxígeno para asegurar una buena hidrólisis.

La hidrólisis que posibilita la rotura de enlaces peptídicos proteicos se llevó a cabo por calentamiento en estufa a 110 °C al vacío durante 24 horas. Después, la mezcla de la hidrólisis denominado hidrolizado, pasa a un procedimiento en HPLC, durante el cual cada uno de los aminoácidos se separa y cuantifica, este proceso es conocido como análisis de aminoácidos (Moore y Stein, 1951; Spackman 1958, Heinrickson y Meredith, 1984).

ii. Derivatización de aminoácidos con PITC

Luego de la hidrólisis proteica, los aminoácidos se derivatizan con PITC para producir PTC-aminoácidos. El procedimiento consiste en una reacción de derivatización, secado al vacío y disolución en la fase móvil. Las muestras hidrolizadas y secadas al vacío, 25 μ l de muestra ó 50 μ M (2 μ M de aminoácidos), se colocan en los tubitos de derivatización y se le agrega 10 μ l de la solución desecadora y 25 μ l de la solución derivatizadora MeOH:TEA:H₂O:PITC (7:1:1:1, v/v) más 25 μ l de norleucina (NLE) y se agita; se deja en reposo por espacio de 30 minutos a temperatura ambiente, luego se deseca al vacío mínimo durante 5 horas (siendo mejor toda la noche). Luego se disuelve nuevamente en 100 μ l de buffer acetato de amonio, el mismo que servirá para el HPLC.

Finalmente se inyecta el volumen necesario a la columna (aproximadamente 10 μ l). La sensibilidad de este proceso en el rango de los picomoles requiere de un buen manejo de la técnica, y también de la pureza de los reactivos para minimizar la contaminación y evitar falsas interpretaciones al analizar los picos del cromatograma. Todo el proceso se realiza con guantes de plástico.

Los tubos de hidrólisis se lavan con HCl 6 N y en una mezcla de etanol-agua en forma alternada y hasta 3 veces cuando se requiera analizar muestras en un rango de 10⁻¹ nmol. Cuando se requiera analizar muestras en un rango de 100⁻¹ pmol, poniendo los tubos a 500 °C será suficiente. El PITC así como los solventes de derivatización deben ser preparados en el momento que va a analizarse en el HPLC.

iii. *Cromatografía líquida de alta resolución*

Las muestras secadas y disueltas en el buffer inicial se colocan en el aplicador de la muestra regulado a temperatura. La determinación de los tiempos de retención y la integración de los picos se realizaron en un sistema de datos del cromatograma. Usamos como estándar interno a norleucina (NLeu). El solvente A se constituye por 8 g. de acetato de amonio disueltos en 2 litros de agua desionizada y su pH ajustado con ácido fosfórico 4 M (1 ml aproximadamente) y filtrado en Milipore.

El solvente B estuvo constituido por 16 gramos de acetato de amonio disueltos en 920 ml de agua desionizada, ajustando el pH con H₃PO₄ y agregando 880 ml de acetonitrilo y 200 ml de metanol. Utilizamos para superar los aminoácidos obtenidos el método de cromatografía por HPLC en fase reversa. La colección de las muestras se hizo a pulso. Se emplearon dos buffers: buffer A (TEA al 0,05 %) y el buffer B (Acetonitrilo 50 % en TEA al 0,05 %). Las condiciones de trabajo fueron:

- Flujo : 1 ml/min
- Absorbancia : 220 nm
- Gradiente :

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
5	100	0
60	50	50
75	0	100
90	100	0

La muestra se diluye en agua destilada y se inyecta 100 μ L. El progreso de la cromatografía se visualiza en una pequeña pantalla y se recogen las alícuotas correspondientes a los picos de proteínas.

El método de análisis de aminoácidos utilizado comprende el tratamiento del hidrolizado de proteínas con fenilisotiocianato (PITC) a pH 9 que luego dan lugar a derivados feniltiocarbamil (PTC)-aminoácidos. La mezcla de PTC-aminoácidos se somete entonces a HPLC en una columna de sílice finamente dividida, a la cual se han adosado cadenas cortas de hidrocarburo.

Los aminoácidos se separan aprovechando las propiedades hidrofóbicas de sus cadenas laterales. A medida que es eluido cada derivado de PTC-aminoácido, se detecta y determina su concentración por medición de la absorbancia del eluido a 254 nm (la absorbancia pico de la mitad PTC).

La cromatografía se realizó en una columna de Spherisorb ODS de 15 cm x 0,4 de 5 μ m. El equipo de HPLC es un modelo en el que se combinan el detector Biosystem Modelo 1000, con aplicador de muestra Spark Holland y una bomba LKB-2150.

El registro de los valores de los tiempos de retención y la integración del área de los picos se hicieron usando el programa de computación Beckmann. Se utilizaron para la derivatización de la muestra. Tubos pequeños de 4 x 40 mm. La mezcla de calibración estuvo compuesta por 23 aminoácidos puros en el orden de elución del sistema.

IV. RESULTADOS

4.1 Aislamiento y purificación de la histona H1 de *Loxechinus albus*

Se aisló y purificó la histona H1 del erizo rojo *Loxechinus albus* (Molina, 1782) a través del aislamiento y purificación de núcleos espermáticos y su tratamiento con ácido clorhídrico 0,4 N para extraer las histonas totales (H1, H2a, H2b, H3 y H4) y posteriormente con una alícuota de ésta, tratada con ácido perclórico al 5 %, se obtuvo la histona H1 específica del erizo rojo.

El procedimiento de extracción de histona H1 como de histonas totales se llevó a cabo a partir de la obtención de los núcleos espermáticos, dado que la histona H1 muestra solubilidad al ácido perclórico al 5 % y las histonas totales al HCl 0,4 N.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo a 4 °C, debido a que las histonas son termolábiles y pierden sus estructuras características.

La purificación de la histona H1 fue realizada mediante los dos métodos explicados en Material y Métodos. La purificación de la histona H1 es más limpia en el segundo método.

4.2 Caracterización de la histona H1 de *Loxechinus albus*

Los resultados obtenidos muestran que se hicieron dos tipos de electroforesis, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) y electroforesis en gel de poliacrilamida con ácido acético y urea (PAGE-AU),

observando preferentemente que PAGE–AU, es especial para la separación de histonas, debido a la neutralización de las proteínas básicas generada por el medio ácido que presenta este gel.

4.2.1 Electroforesis de histonas en PAGE-AU

En la electroforesis en gel de poliacrilamida con ácido acético y urea (PAGE-AU), de las histonas totales extraídas con HCl 0,4 N y las histonas H1 extraídas con ácido perclórico 5 %, realizadas conjuntamente, tal como se aprecia en la Figura 13 podemos observar en el carril St las histonas totales de los eritrocitos de pollo, que en esta oportunidad lo estamos utilizando como un marcador de pesos moleculares en Daltons (D) o en Kilodaltons (kD) y cuyos pesos moleculares son en el orden de **H5** (22,000 kD), **H1** (18,400 kD), **H2a** (15,324 kD), **H2b** (14,500 kD), **H3** (13,774 kD), **H4** (11,282 kD) y la comparación de la histona H1 del erizo rojo *Loxechinus albus* se ha realizado específicamente con las histonas H1 de otras especies de erizos de mar .

En la figura 12 podemos observar el gel coloreado que muestra las histonas totales separadas del eritrocito de pollo. Asimismo, se puede observar histonas totales e histonas H1 de erizo rojo, aisladas y purificadas.

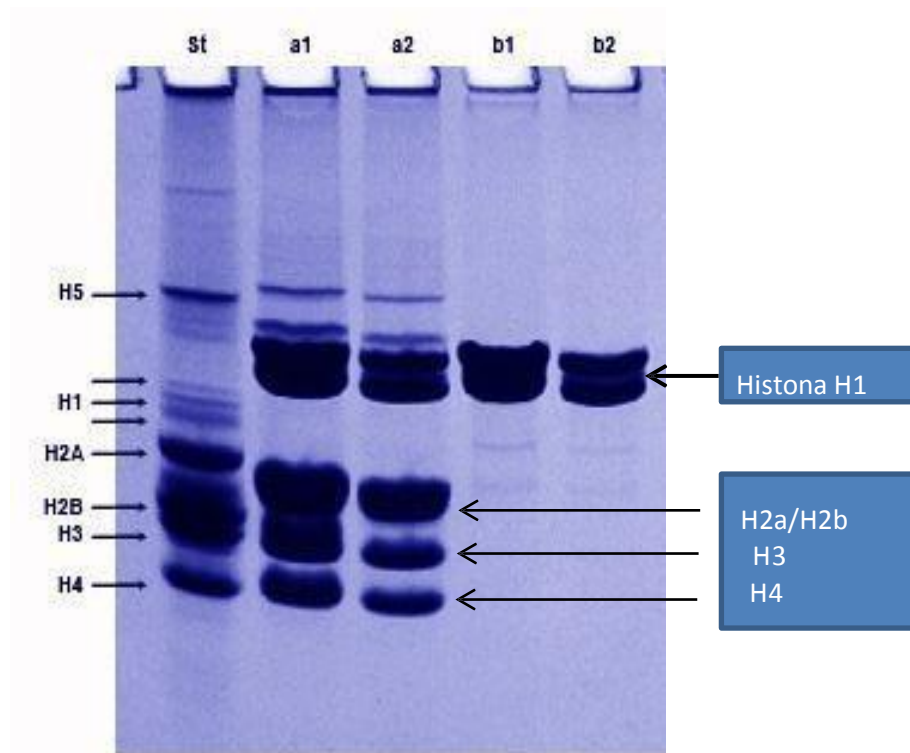


Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE-AU de las histonas totales de eritrocito de pollo y Histonas H1 de *Loxechinus albus*.

Leyenda:

Carril # 1 (st): Histonas totales de eritrocito de pollo (15 μ L) (HCl 0,4 N)

Carril # 2 (a1): Histonas totales de erizo rojo *L. albus* (15 μ L) (HCl 0.4N)

Carril # 3 (a2): Histonas totales de erizo rojo *L. albus* (10 μ L) (HCl 0.4N)

Carril # 4 (b1): Histonas H1 de erizo rojo *L. albus* (5 μ L) (HClO₄ 5%)

Carril # 5 (b2): Histonas H1 de erizo rojo *L. albus* (5 μ L) (HClO₄ 5%)

Tabla 1. Pesos moleculares en kD de las histonas totales del eritrocito de pollo.

Histonas	Rf	M (kD)	Log Mr	Log Mc	Mc (kD)
H5	0.2220	22.000	1.3424	1.3500	22.3872
H1	0.3220	18.400	1.2648	1.2596	18.1803
H2A	0.4000	15.324	1.1854	1.1891	15.4561
H2B	0.4440	14.500	1.1614	1.1493	14.1026
H3	0.4670	13.774	1.1391	1.1285	13.4431
H4	0.5330	11.282	1.0524	1.0689	11.7193

Mr: Masa real Mc: Masa calculada

$$\text{Log M} = 1.5507 - 0.9040 \text{ Rf}$$

$$r^2 = -0.9939$$

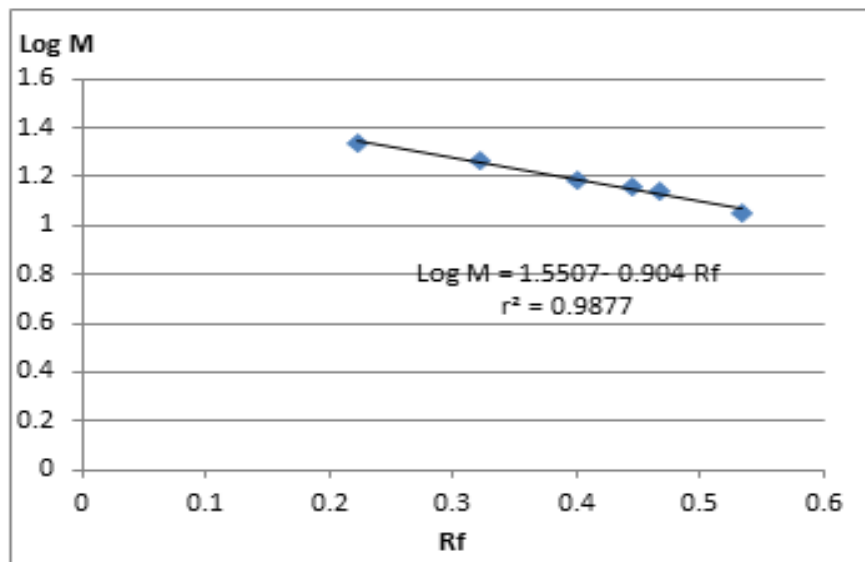


Figura 13. Regresión lineal Rf vs Log M del eritrocito de pollo

Tabla 2. Pesos moleculares en kD de las histonas de *Loxechinus albus* calculados a partir de la fórmula $\text{Log M} = 1,5507 - 0,9040 \text{ Rf}$ del eritrocito de pollo.

Rf	Log Mc	Mc (kD)	Histonas
0,230	1,3428	22,0191	H1
0,405	1,1846	15,2968	H2a
0,433	1,1593	14,4311	H2b
0,478	1,1186	13,1401	H3
0,533	1,0689	11,7193	H4

Como se puede observar, los patrones de bandas obtenidos son diferentes, debido a que se realizaron diferentes tratamientos denotados por los símbolos St, a y b, esto con el fin de demarcar el aislamiento diferencial de las proteínas histonas y además corroborar una buena realización de la técnica.

Los gels obtenidos fueron analizados mediante el software Gel analyzer, el cual se basa en el cálculo del peso molecular mediante la proyección del Rf.

La electroforesis en gel de la histona H1 de *Loxechinus albus* junto con las histonas de eritrocito de pollo empleado como estándares indica un peso molecular de 22,0191 kilodaltons, es decir, una molécula de aproximadamente 200 residuos de aminoácidos.

Las funciones de los diversos ámbitos de la histona H1 de espermatozoide de *Loxechinus albus* se discuten.

4.2.2 Electroforesis de histonas en PAGE- SDS

En la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), de las histonas totales extraídas con HCl 0,4 N y las histonas H1 extraídas con ácido perclórico 5 %, realizadas conjuntamente, tal como se aprecia en la Fig. 4.2 podemos observar en el carril St las histonas totales de los eritrocitos de pollo, que en esta oportunidad también lo estamos utilizando como un marcador de pesos moleculares en Daltons (D) o en Kilodaltons (kD) y cuyos pesos moleculares son en el orden de **H5** (22,000 kD), **H1** (18,400 kD), **H2a** (15,324 kD), **H2b** (14,500 kD), **H3** (13,774 kD), **H4** (11,282 kD) y la comparación de la histona H1 del erizo rojo *Loxechinus albus* se ha realizado específicamente con las histonas H1 de otras especies de erizos de mar .

En la Figura 15 podemos observar el gel coloreado que muestra las histonas totales separadas del eritrocito de pollo. Asimismo, se pueden observar las histonas totales e histonas H1 del erizo rojo, aisladas y purificadas.

Como se puede observar, los patrones de bandas obtenidos son diferentes, debido a que se realizaron diferentes tratamientos denotados por los símbolos St, a y b, esto con el fin de demarcar el aislamiento diferencial de las proteínas histonas y además corroborar una buena realización de la técnica. Los gels obtenidos fueron analizados mediante el software Gel analyzer, el cual se basa en el cálculo del peso molecular mediante la proyección del Rf

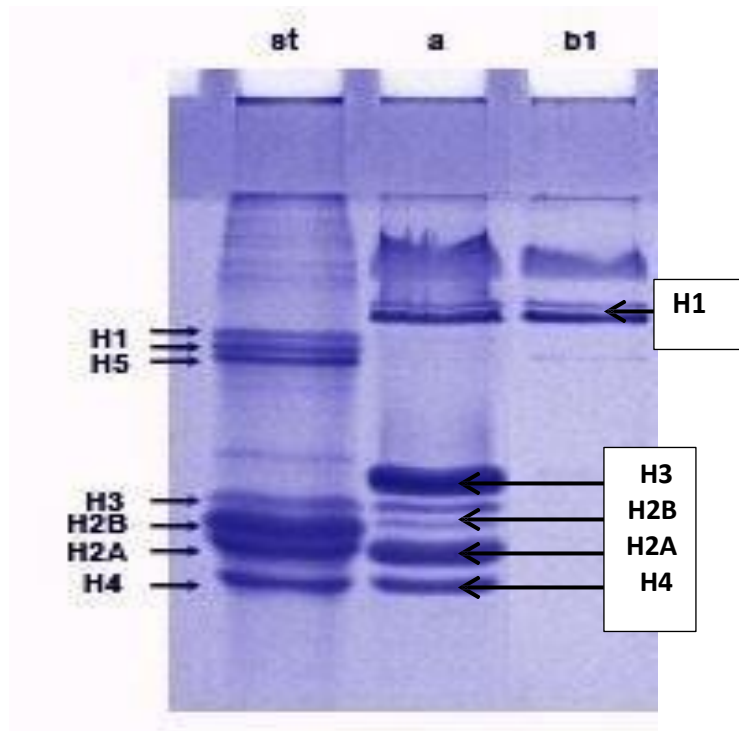


Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE-SDS de las histonas de eritrocito de pollo y *Loxechinus albus*.

Leyenda:

Carril st: Histonas totales de eritrocito de pollo (10 μ L)

Carril a: Histonas totales de *Loxechinus albus* (10 μ L)

Carril b1: Histonas H1 de *Loxechinus albus* (10 μ L)

Tabla 3. Pesos moleculares en kD de las histonas totales del eritrocito de pollo.

Histonas	Rf	M (kD)	Log Mr	Log Mc	Mc (kD)
H5	0,2780	22,000	1,3424	1,3190	20,8449
H1	0,3110	18,400	1,2648	1,3030	20,0909
H3	0,5890	15,324	1,1854	1,1684	14,7367
H2B	0,6440	14,500	1,1614	1,1418	13,8612
H2A	0,6890	13,774	1,1391	1,1200	13,1826
H4	0,7440	11,282	1,0524	1,0933	12,3965

Mr: Masa real Mc: Masa calculada

$$\text{Log M} = 1,4536 - 0,4843 \text{ Rf}$$

$$r^2 = -0,9077$$

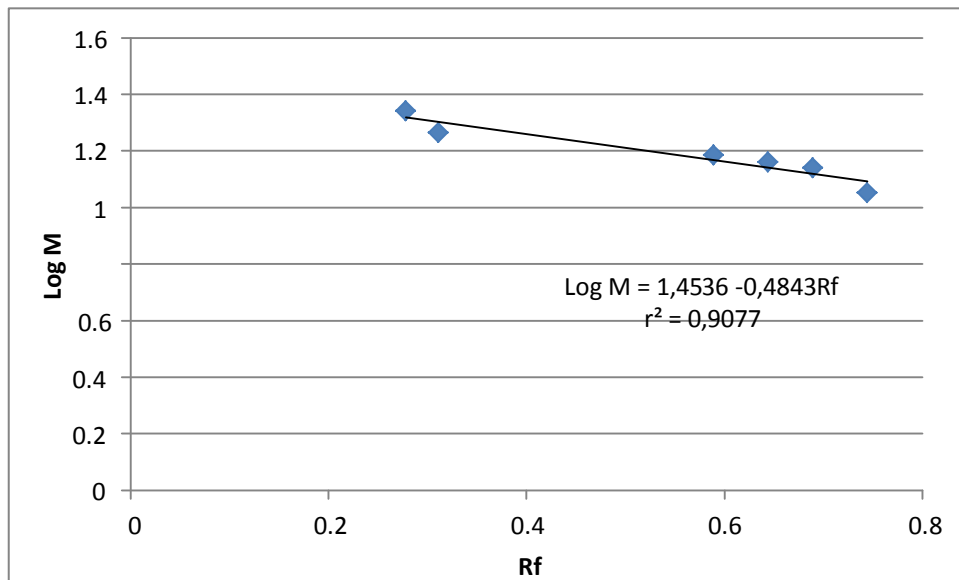


Figura 15. Regresión lineal Rf vs Log M del eritrocito de pollo

Tabla 4. Pesos moleculares en kD de las histonas de *Loxechinus albus* calculados a partir de la fórmula $\text{Log } M = 1,5507 - 0,9040 \text{ Rf}$ del eritrocito de pollo.

Rf	Log Mc	Mc (kD)	Histonas
0,233	1,3408	21,9180	H1
0,544	1,1902	15,4950	H3
0,611	1,1577	14,3781	H2b
0,678	1,1253	13,3444	H2a
0,789	1,0933	11,7896	H4

Fuente: Elaboración propia

La estructura primaria de la histona H1 del espermatozoide de *Loxechinus albus* ha sido determinada. La histona H1 de *Loxechinus albus* consta de una cadena polipeptídica de aproximadamente 220 residuos de aminoácidos.

La proteína se compone de tres dominios. En comparación con otras histonas H1 y H5, existe un dominio hidrofóbico central y un dominio carboxilo-terminal muy rico en lisina y alanina.

La histona H1 de *Loxechinus albus* es similar a las histonas H5 en que el dominio carboxilo-terminal también contiene muchos residuos de arginina. Una vez más los dominios hidrófobos centrales son similares mientras que los dominios amino terminales son muy diferentes.

Las funciones de los diversos ámbitos de la histona H1 de espermatozoide de *Loxechinus albus* se discuten.

4.2.3 Composición de aminoácidos de la histona H1

La composición de aminoácidos de las histonas H1 de distintas especies de erizos de mar, incluyendo la histona H5 del eritrocito de pollo, se muestran en la Tabla 1. Las características distintivas de esta composición son las cantidades relativamente altas de lisina, arginina, serina y residuos de alanina y la ausencia de residuos de cisteína y triptófano.

El peso molecular mínimo, calculado a partir de la composición de aminoácidos, es de aproximadamente 18 400 daltons. La acetilación (Phillips, 1963), la metilación (Murray, 1964) y la fosforilación (Ord y Stocken, 1966a, b), de ciertos aminoácidos se ha detectado en las fracciones de histonas.

La estructura primaria de la histona H1 del espermatozoide de *Loxechinus albus* ha sido determinada. La histona H1 de *Loxechinus albus* consta de una cadena polipeptídica de aproximadamente 220 residuos de aminoácidos. La proteína se compone de tres dominios.

En comparación con otras histonas H1 y H5, existe un dominio hidrofóbico central y un dominio carboxilo-terminal muy rico en lisina y alanina. La histona H1 de *Loxechinus albus* es similar a las histonas H5 en que el dominio carboxilo-terminal también contiene muchos residuos de arginina.

Una vez más los dominios hidrófobos centrales son similares mientras que los dominios amino terminales son muy diferentes.

Tabla 5. Análisis de aminoácidos de histonas H1 y H5 (Moles%)

Residuos de Aminoácidos	Histonas H1 de erizos de mar (Moles %)				
	<i>Chicken erythrocyte histone H5 (Greenaway & Murray, 1971)</i>	<i>Arbacia lixula (Puigdomenech et al., 1975)</i>	<i>Parechinus angulosus (Strickland et al., 1976)</i>	<i>Sphaerechinus granularis (Giancotti et al., 1981)</i>	<i>Loxechinus albus (presente trabajo, 2012)</i>
Asp (A)	1,8	2,2	1,8	1,5	1,3
Thr	3,3	2,5	1,9	4,0	2,9
Ser	13,0	6,7	6,0	7,6	9,1
Glu (A)	4,4	2,0	2,3	3,6	1,7
Pro	7,1	9,0	7,3	7,8	9,7
Gly	4,8	4,6	4,2	4,1	4,8
Ala	15,8	23,6	24,9	23,8	18,8
Val	3,9	2,8	3,7	3,1	3,2
Met	0,6	1,8	1,8	1,2	1,7
Ile	3,0	2,8	1,0	2,0	1,6
Leu	4,6	1,4	2,2	1,5	1,9
Tyr	1,7	0,8	0,9	0,8	0,9
Phe	0,6	0,4	0,4	0,5	0,5
Lys (B)	24,1	27,4	29,5	21,6	21,1
His (B)	1,4	1,2	1,0	0,9	0,4
Arg (B)	10,9	11,2	11,0	16,2	20,2
Acidic (A)	6,2	4,2	4,1	5,1	3,0
Basic (B)	36,4	39,8	41,5	38,7	41,7
B/A ratio	5,9	9,5	10,1	7,6	13,9
Lys/Arg ratio	2,2	2,4	2,7	1,3	1,4
Residuos de AAs	189	183	248	220	200

A: Aminoácidos ácidos B: Aminoácidos básicos

Fuente: (Giancotti *et al.*, 1981; Greenaway & Murray, 1971; Puigdomenech *et al.*, 1975; Strickland *et al.*, 1976 y Ponce, 2012)

La composición de aminoácidos de la histona H1 del erizo rojo *Loxechinus albus* (Tabla 5) permite observar claramente que la proporción de basicidad/acidez muy elevada en la histona H1 de *Loxechinus albus* que en las demás especies de erizos de mar, incluso es mucho mayor que en el eritrocito de pollo, que lo estamos empleando como estándar porque tiene varios estudios que establecen su estructura de histonas como marcadores moleculares.

La tabla 5 muestra el análisis de aminoácidos de la histona de *Loxechinus albus* junto con los de otras tres moléculas de histonas H1 de erizos de mar, y la histona H5 a partir de eritrocito de pollo. Es de destacar que el contenido de arginina de la histona H1 de *L. albus* es incluso mayor que las otras tres histonas H1 de erizo de mar dado. Hay una disminución correspondiente en el contenido de lisina de la histona H1 de *L. albus* tal que la proporción total de residuos básicos permanece aproximadamente constante.

Los genes de las cinco histonas se organizan formando un quinteto en tándem repetitivo; sin embargo, en *Loxechinus albus*, las histonas tienen diferente comportamiento en las dos clases de electroforesis utilizados para caracterizar las histonas totales.

La electroforesis en gel de poliacrilamida usando SDS, permite observar en las histonas cores un comportamiento en la formación de las bandas similar a la resolución de la electroforesis en gel de poliacrilamida usando ácido acético y urea (PAGE-AU).

Evaluándose de estudios realizados, la histona H1 de *Loxechinus albus* se caracteriza por presentar cierto grado de heterogeneidad, tanto de las fracciones solubles en ácido acético y que son aquellas tipo histonas, como las proteínas solubles en HCl 0,4 N y que se les ha denominado proteínas parecidas a protaminas por su contenido especial de aminoácidos, que presentan un porcentaje mayoritario de los aminoácidos lisina, arginina, serina y alanina. Las proteínas extraídas con HCl 0,4 N representa la mayor población de proteínas básicas en el núcleo de espermatozoides de esta especie. La histona H1 se obtiene en forma bastante pura al extraerla con ácido perclórico al 5 %. Purificadas las proteínas se determinó la composición de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se sabe que en espermatozoides y en gónadas de varias especies de equinodermos y moluscos existen proteínas parecidas a las histonas somáticas que son específicas de espermatozoides (Subirana y col, 1981; Colm y Subirana, 1979, 1981).

El sistema utilizado consiste en electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS y AU) al 15 %, con los cuales se separan las 5 bandas correspondientes a las histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4, no se visualiza productos de degradación parcial de alguna de ellas. Se observan las bandas de histonas extraídas del núcleo espermático. La presencia de la histona H1 es notoria como una doble a triple banda de menor velocidad de migración debido a su peso molecular elevado en comparación con los demás.

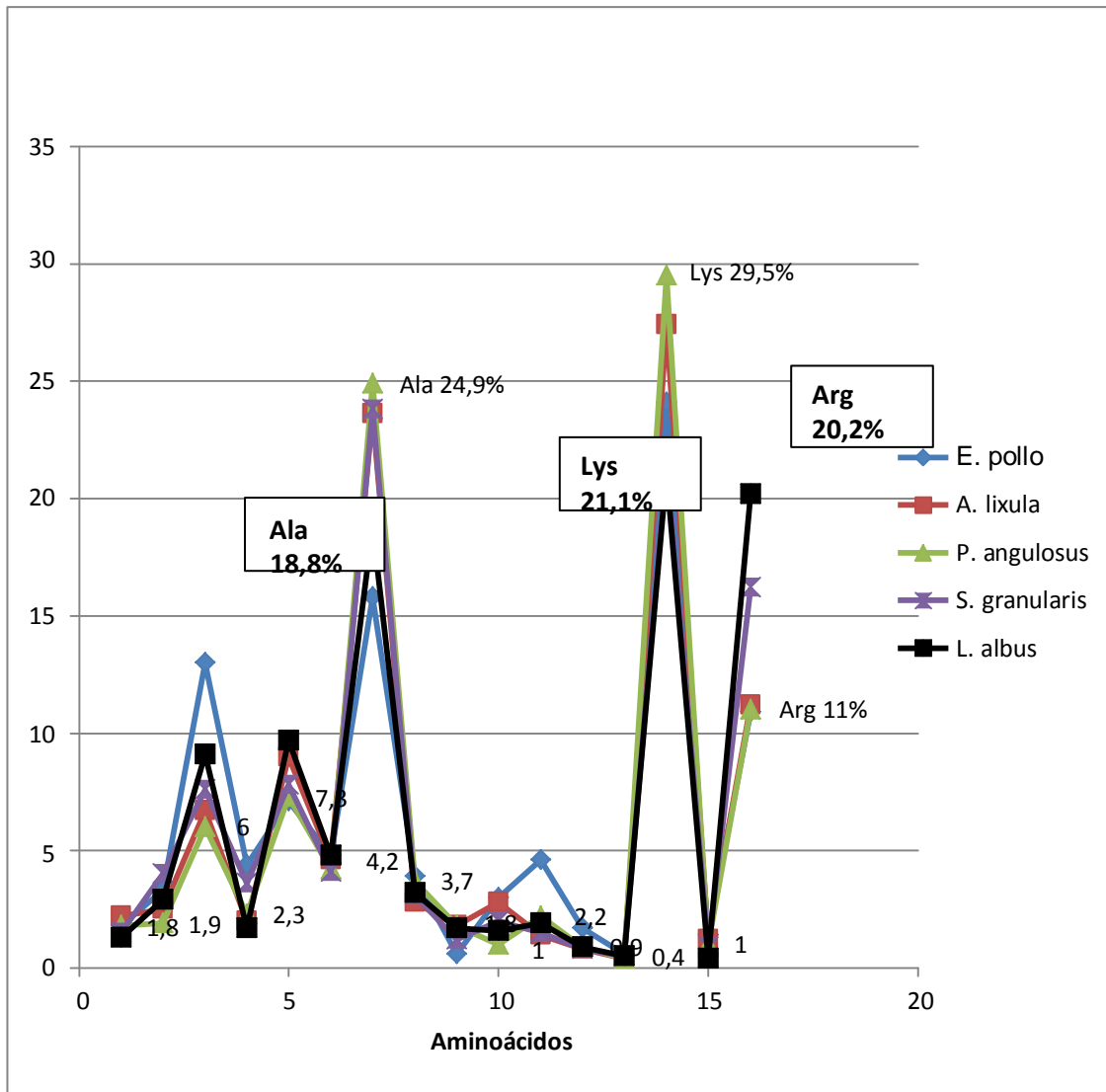


Figura 16. Análisis de aminoácidos de histona H1 de diferentes erizos de mar.

Fuente: (Giancotti *et al*, 1981; Greenaway & Murray, 1971; Puigdomenech *et al*, 1975; Strickland *et al*, 1976 y Ponce, 2012)

En los cromatogramas se presentan una gráfica que muestra la absorbancia del eluato de una columna de HPLC como función del tiempo. Los picos correspondientes a cada aminoácido se han identificado utilizando las abreviaturas

estándar de una letra. Como se eluyen diferentes derivados PTC-aminoácidos a velocidades distintas, la cronometría de los picos permiten la identificación de los aminoácidos.

La cantidad de cada aminoácido que se encuentra presente en la alícuota del hidrolizado que es sometido a HPLC es proporcional al área bajo su pico. Bajo esta metodología el análisis de aminoácidos puede ser llevado a cabo sobre muestras tan pequeñas como un picomol de una proteína que contiene aproximadamente 200 residuos. A pesar de su utilidad, la hidrólisis ácida, bajo un conjunto de condiciones hidrolíticas, no puede dar un análisis completo de aminoácidos. Debido a que la cadena lateral de la asparagina y la glutamina contienen enlaces amida, el ácido que se usa para romper los enlaces peptídicos de la proteína convierte también la asparagina en ácido más ión amonio.

Cuando se emplea la hidrólisis ácida, los totales combinados de (glutamato + glutamina) se designan con las abreviaturas Glx o Z y los combinados totales (aspartato + asparagina) se designan como Asx o B, como se evidencia en el cromatograma. A temperaturas elevadas, la cadena lateral del triptófano es en particular sensible a la oxidación por el aire.

Durante la hidrólisis ácida de las proteínas, la cual por lo general utiliza temperaturas cercanas a 110 °C, la cadena lateral del aminoácido triptófano es destruida casi en su totalidad, hasta en tubos evacuados sellados. Así, el contenido del triptófano en una proteína con frecuencia se estima sobre la base de su espectro ultravioleta. Como alternativa se puede analizar después de una hidrólisis alcalina, o con más frecuencia, incluyendo un antioxidante en la hidrólisis ácida.

También se experimentan pérdidas pequeñas de serina (promediando 10 % por 20 horas) y de treonina y tirosina (5 % por 20 horas) durante la hidrólisis ácida convencional. Inversamente, los enlaces peptídicos de la valina y la isoleucina, los cuales están protegidos estéricamente por la ramificación de hidrocarburo en sus carbonos B, son más lentos para hidrolizarse que otros enlaces peptídicos. Por estas razones se someten a hidrólisis ácida varias muestras de una proteína purificada durante periodos que varían de 16 a 72 horas, y es común interpretar los resultados de análisis de aminoácidos por la extrapolación de los datos que se obtienen.

Es conocido que la cantidad de serina, prolina, alanina y lisina es una característica de proteínas relacionadas a las histonas H1 ricas en lisina. Sin embargo la composición de aminoácidos de *Loxechinus albus* nos da la idea de que son proteínas no complejas.

V. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1. Obtención de espermatozoides de *Loxechinus albus*

En el presente trabajo se realizó la recolección del material biológico, el mismo que consistió en esperma de erizo de mar. La época de desove para el litoral sur peruano y el norte chileno difieren un poco a lo reportado por la bibliografía (Vásquez, 2000), debido a que según ésta, los meses en los cuales se produciría una abundante obtención de esperma y por lo tanto el desove, sería entre los meses de junio a noviembre; pero se ha encontrado que para el trabajo realizado, se pudo comprobar que existió una alta producción de esperma maduro, hasta finales del mes de febrero, evidenciado mediante la observación al microscopio.

Además se comprobó el dimorfismo sexual al momento de aplicar la solución de KCl 0,5 M, debido a que la secreción emitida es distinta en cuando al color para los especímenes recolectados, verificándose por microscopía, que para los individuos hembras, la secreción presentó un color anaranjado rojizo (dentro de los cuales se pudo observar la presencia de gran cantidad de óvulos), mientras que los individuos machos presentaron un color blanco lechoso.

5.2 Extracción de histonas totales e histona H1

Se utilizaron espermatozoides conservados en etanol al 90 % para obtener las histonas por extracción global en HCl 0,4 N. Se han reportado trabajos anteriores (Subirana, 1973; Chiva, 1990), que bajo estas condiciones se obtienen proteínas básicas ricas en lisina y arginina. Los patrones electroforéticos de las proteínas

básicas específicas del núcleo de las células espermáticas de *Loxechinus albus* fueron obtenidas por solubilización secuencial. Existen grupos de proteínas básicas que pueden ser diferencialmente extraídas del núcleo tomando en cuenta su solubilidad en diversos solventes ácidos, así, las histonas H1, denominadas histonas muy ricas en lisina, tanto en vertebrados como en invertebrados, son solubles en ácido perclórico al 5 %.

Para la cuantificación de proteínas en el análisis electroforético se utilizó el método de Bradford a una longitud de onda de 550 nm. Aunque en las células somáticas o espermatogénicas específicas están presentes siempre los componentes denominados histonas, no es posible afirmar que los datos obtenidos en el presente trabajo sean exactos, pero podría ser notado que ellos están siempre presentes en su total complemento (H2A, H2B, H3, H4 y H1).

Es de notar que el análisis electroforético y de la composición realizado en este trabajo puede servirnos de mucha ayuda en los análisis de taxonomía, pues es un hecho que existen diferencias inter e intra específicas y éstos análisis introducirían un parámetro de comparación más claro, observando las diferencias de proteínas básicas nucleares específicas del espermatozoide, estudiando las diferencias en sub-especies y observando algún nivel de variación local o geográfica dentro de la misma especie.

5.3. Purificación de la histona H1

Después de haber extraído las proteínas básicas espermio-específicas, debe establecerse su homogeneidad. 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 mucha mayor

capacidad de resolución y pueden detectar fácilmente la presencia de impurezas proteicas de menor cuantía.

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 presentarán 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 medio de soporte (fibras de acrilamida con puentes de bisacrilamida); la urea es un agente desnaturador que elimina las interacciones entre proteínas, el ácido acético crea un medio ácido impidiendo que las proteínas permanezcan neutras. El TEMED y H_2O_2 actúan como catalizadores de la polimerización.

El método de Hurley (1977) constituye una variante que permite eliminar la pre-electroforesis y disminuir el tiempo de polimerización sustituyendo el TEMED y PSA por thiourea hasta 0,09 % y agua oxigenada hasta 0,002 %. Las muestras se disuelven a una concentración de 1 mg/ml en el tampón muestra. El buffer muestra está constituido por 2-mercaptoetanol 20 mM, urea 8M, ácido acético 5 % y verde de metilo 1 %.

5.4. Caracterización de la histona H1

La organización in vivo de la cromatina del espermio, que involucra la interacción entre los componentes proteicos parecida a protaminas y el DNA aún están en un plano especulativo, a pesar de los estudios realizados por Ausió (1980), Ausió y Subirana (1981).

Experimentos de reconstrucción in vivo realizados por Ausió y Suau (1983) sugieren una cercanía entre las diferentes clases de complejos nucleoproteicos y la organización nucleo-protamínica típica.

Es de notar también que el análisis electroforético y la composición realizado en este trabajo puede servirnos de mucha ayuda en los análisis de taxonomía, pues es un hecho que existen diferencias inter e intraespecíficas y éstos análisis introducirían un parámetro de comparación más claro, observando las diferencias de proteínas básicas nucleares específicas del espermatozoide estudiando las diferencias en subespecies y observando algún nivel de variación local o geográfico dentro de la misma especie.

En la presente investigación se utilizaron los métodos de análisis cualitativo de la migración de proteínas por electroforesis para la determinación del peso molecular de la proteína purificada H1 y por HPLC su composición cualitativa y cuantitativa de aminoácidos. El sistema utilizado consiste en geles de poliacrilamida al 15 % con los que se separan las histonas observadas en resultados con los cuales se separan las histonas. Como se muestra resultados se evidencian la presencia de bandas de proteínas histónicas extraídas del núcleo espermático. La presencia de la histona H1 es notoria como una doble (hasta triple) banda de menor velocidad de migración.

La determinación del peso molecular de la proteína H1 por electroforesis ha llegado a ser un procedimiento de rutina en un laboratorio de investigación. La electroforesis en gel en gel de poliacrilamida proporciona un método de fácil ejecución, económico y poderoso para la caracterización. El peso molecular de una

proteína bajo investigación es determinado por comparación de su movilidad electroforética con aquellas de proteínas estándares de peso molecular conocido. Existen kits de calibración para electroforesis provistos de alta pureza, bien caracterizados estándares en una conveniente mezcla liofilizada lista para usar para la determinación de pesos moleculares de proteína por electroforesis.

La proteína con una alta carga positiva se vuelve insoluble en detergentes cargados negativamente como el SDS, por ello Colm 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-úrea utilizando un polímero de iridina como estándar. Aunque existe una singular coincidencia en los estándares y se obtiene una curva de calibración adecuada, sin embargo éste método podría considerarse como indicativo de un peso molecular aparente debido a las variaciones que se presentan en la proporción carga/masa de las proteínas espermio-específicas básicas. Se esquematiza las curvas de calibración en base a las cuales se determinarán los pesos moleculares y número de aminoácidos de las proteínas básicas en estudio.

CONCLUSIONES

1. Se ha logrado aislar, purificar y caracterizar molecularmente la histona H1 del espermatozoide del erizo rojo *Loxechinus albus*, Molina 1782 de la zona sur del Perú (Tacna).
2. Se ha logrado extraer las histonas totales de espermatozoides de *Loxechinus albus* mediante extracción ácida.
3. Se ha logrado purificar y caracterizar la histona H1 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, estableciéndose su peso molecular en aproximadamente 22 kDaltons, con un número aproximado de 200 aminoácidos y conteniendo una predominancia de los aminoácidos lisina (21,1 %) y arginina (20,2 %).
4. Se ha logrado cuantificar la cantidad de aminoácidos existentes en la histona H1 de espermatozoides maduros de *Loxechinus albus* mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda ampliar estudios en el área de modificaciones transcripcionales de la histona H1 y de las demás histonas, para poder así entender mejor las vías encargadas de la transcripción en éstas especies.
2. Se recomienda realizar estudios de espectroscopía de masas con HPLC para determinar la existencia de proteínas isoformicas que constituyen esta histona H1.
3. Se recomienda también obtener anticuerpos anti-histona H1 para utilizarlo y aplicarlo en investigaciones posteriores. Es importante dilucidar sobre el origen y función de ésta histona.
4. Se recomienda establecer un estudio molecular de la histona H1 para la obtención del gen que produce la proteína mencionada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allan, J., Hartman, P.G., Crane-Robinson, C. and Aviles, F.X. (1980). *The structure of histone H1 and its location in chromatin*. Nature. 288: 675–679.

Allan, J., Mitchell, T., Harborne, N., Bohm, L., Crane-Robinson, C. (1986). *Roles of H1 domains in determining higher order chromatin structure and H1 location*. J. Mol. Biol. 187(4): 591-601.

Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.W., Love, W.E. and Moudrianakis, E.N. (1991). *The nucleosomal core histone octamer at 3.1Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix*. Proc. Natl Acad. Sci. 1991;88:10148-10152.

Ausió, J. and Subirana, J.A. (1982). *A High Molecular Weight Nuclear Basic Protein from the Bivalve Mollusc Spisula solidissima*. J. Biol. Chem. 257, 6, 2802-2805.

Ausió, J. (1995). *Histone H1 and the evolution of the nuclear sperm-specific proteins*. In: *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*. B.G.M. Jamieson; J. Ausió and J.L. Justine (Eds.). Mém. Mus. natn. Hist. nat., París, 166: 447-462.

Ausió J., Dong F., and van Holde KE.(1989). *Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of the histone tails in the stabilization of the nucleosome*. J. Mol. Biol. 206:451-463.

Barnes, R.O. (1980). *Invertebrate Zoology*. 4th Edition. Saunders College, Philadelphia, USA.

Bergman, M. and Ringertz, N. (1990). *Gene expression pattern of chicken erythrocyte nuclei in heterokaryons*. J. Cell. Sci 97 (Pt 1): 167-175.

Bleher R., Martin R. *Nucleo-cytoplasmic translocation of histone H1 during the HeLa cell cycle*. Chromosoma. 1999;108(5):308-16.

Bradbury, J. H. (1973). *The structure and chemistry of keratin fibers*. Adv. Protein Chem. 27: 111-211.

Brand, J.M., Young, J.C., and Silverstein, R.M. (1979). *Insect pheromones: a critical review of recent advances in their chemistry, biology, and application*. Chem. Org. Naturst. 37: 1-190.

Brown, D.T., Gunjan, A., Alexander, B.T., Sitman, D.B. (1997). *Differential effect of H1 variant overproduction on gene expression is due to differences in the central globular domain*. Nucl. Acid. Res. 25(24): 5003-5009.

Butler, P.J.G. (1984). *A defined structure of the 30 nm chromatin fibre which accommodates different nucleosomal repeat lengths*. EMBO J. 3, 2599-2604.

Calbhuari, R. y Castellanos, R. (2004). *Caracterización electroforética de proteínas básicas de la cromatina del espermatozoide del "erizo rojo" Loxechinus albus Molina, 1782*. Tesis. Escuela Académico Profesional de Biología Microbiología. Facultad de Ciencias. Univ. Nac. Jorge Basadre Grohmann. Tacna-Perú.

Castilla, J.C. (1990). *El erizo chileno Loxechinus albus: Importancia pesquera, historia de vida, cultivo en laboratorio y repoblacion natural*. Cultivos de moluscos en América Latina: 83–98.

Chaeveau, J., Moule, Y. and Roviller (1956). Isolation of pure and unaltered liver nuclei morphology and biochemical composition. *Exp. Cell. Res.* 11:317-321.

Chiva, M., Saperas, N., Cáceres, C., and Ausió, J. (1995) in *Advances in Spermatozoal Taxonomy and Phylogeny* (Jamieson, B. G. M., Ausió, J., and Justine, J. L., eds) Vol. 166, pp. 501–514, *Memoires du Museum National d’Histoire Naturelle, Paris*

Churchill, M.E. and Suzuki, M. (1989). 'SPKK' motifs prefer to bind to DNA at A/T-rich sites. *EMBO J.* 8(13):4189-95.

Clark, D.J., Thomas, J.O. (1988). *Differences in the binding of H1 variants to DNA. Cooperativity and linker-length related distribution.* *Eur. J. Biochem.* 178(1): 225-33.

Clark, D.J., Thomas, J.O. (1986). *Salt-dependent co-operative interaction of histone H1 with linear DNA.* *J. Mol. Biol.* 187(4):569-580.

Contreras, S y Castilla, J.C. (1987). *Feeding behavior and morphological adaptations in two sympatric urchin species in central Chile.* *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 38: 217- 224.

D'erme, M., Zardo, G., Reale, A. and Caiafa, P. (1996). *Cooperative interactions of oligonucleosomal DNA with the H1e histone variant and its poly(ADP-ribosyl)ated isoform.* *Biochem. J.* 316, 475-480.

Drabent, B., Bode, C., Miosge, N., Herken, R., Doenecke, D. (1998). *Expression of the mouse histone gene H1t begins at premeiotic stages of spermatogenesis.* *Cell. Tissue Res.* 291:127-132.

Erard, M.S., Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Pantalón, A. and Almaric, F. (1999). *A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1.* *Eur. J. Biochem.* 175:525-530.

Finch, J.T., and Klug, A. (1976). *Solenoidal model for superstructure in chromatin.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1897-1901.

Fischle, W., Wang, Y. and Allis, C.D. (2003). *Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond.* *Nature* 425(6957): 475-479.

García, B.A., Busby, S.A., Barber, C.M., Shabanowitz, J., Allis, C.D., Hunt, D.F. (2004). *Characterization of phosphorylation sites on histone H1 isoforms by tandem mass spectrometry.* *J. Proteome Res.* 3(6):1219-1227.

Gatewood, J.M., Cook, G.R., Balhorn, R., Schmid, C.W., Bradbury, E.M. (1990). *Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones.* *J. Biol. Chem.* 265 (33): 20662-20666.

Giancotti, V., Cosimi, S., Cary, P.D.T., Crane-Robinson, C. and Geracit, G. (1981). *Preparation and characterization of histone HI from the sperm of the sea-urchin Sphaerechinus granularis*. Biochem. J. 195, 171-176.

Goodwin, G.H., Walker, J.M. and Johns, E.W. (1978). The high movility group (HMG) non-histone chromosomal proteins. In: The Cell Nucleus. Vol. VI, Chromatin, part C. Ed. H. Busch. Academic Press, New York, USA.

Graziano, V., Gerchman S.E., Schneider D.K., Ramakrishnan, V. (1994). *Histone HI is located in the interior of the chromatin 30-nm filament*. Nature 368(6469): 351-354.

Greenaway, P. J. & Murray, K. (1971) Nature (London) New Biol 229, 233-238

Grimes, S.R., Wolfe, S.A., Anderson, J.V., Stein, G.S., Stein, J.L. (1990). *Structural and functional analysis of the rat testis-specific histone H1t gene*. J. Cell. Biochem. 44(1): 1-17.

Guisado, C. and Castilla, J. (1987). *Historia de vida, reproducción y avances en el cultivo del erizo comestible chileno Loxechinus albus (Molina, 1782) (Echinoidea: Echinidae)*. En: Arana P (ed). Manejo y desarrollo pesquero, pp. 59-68. Editorial Universitaria, Valparaíso

Gutiérrez, J., y Otsu, M. (1975). *Periodicidad en las variaciones biométricas de Loxechinus albus Molina. 1782* Rev. Biol. Mar., Valparaíso, 15:179-199.

Halmer, L. and Gruss, C. (1996). *Effects of cell cycle dependent histone H1 phosphorylation on chromatin structure and chromatin replication*. Nucleic Acids Res. 24(8): 1420-1427.

Hayes, J.J., Bashkin, J., Tullius, T.D., and Wolffe, A.P. (1991). *The histone core exerts a dominant constraint on the DNA in a nucleosome*. Biochemistry 30:8434-8440.

Henrikson, R.; Meredith, S. (1984). *Amino acid analysis by reverse-phase high performance liquid chromatography in differentiating mouse astrocytes in primary culture*. Dev. Neurosci. 1: 226-267.

Hendzel, M.J., Lever, M.A., Crawford, E., Th'ng, J.P. (2004). *The C-terminal domain is the primary determinant of histone H1 binding to chromatin in vivo*. J. Biol. Chem. 279 (19): 20028-34.

Hill, C.S., Martin, S.R. and Thomas, J.O. (1989). *A stable α -helical element in the histone H1 and the histone octamer*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 77,127-131.

Hoffmann, P. and Chalkley, R. (1978). *Procedures for minimizing protease activity during isolation of nuclei, chromatin and the histones*. In: *Methods in Cell Biology, Vol. XVII, Chromatin and chromosomal proteins research*. Ed. G. Stein; J. Stein, and L.J. Kleinsmith. Academic Press, New York, USA, pp1-12.

Izaurralde, E., Kas, E., Laemmli, U.K. (1989). *Highly preferential nucleation of histone H1 assembly on scaffold associated regions*. J. Mol. Biol. 210(3): 573-585.

Jost, J.P., Hofsteenge, J. (1992). *The repressor MDBP-2 is a member of the histone H1 family that binds preferentially in vitro and in vivo to methylated nonspecific DNA sequences.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89(20):9499-9503.

Karetsou, Z., Sandaltzopoulos, R., Frangou-Lazaridis, M., Lai, C.Y., Tsolas, O., Becker, P.B., Papamarcaki, T. *Prothymosin alpha modulates the interaction of histone H1 with chromatin.* Nucleic Acids Res. 1998;26(13):3111-3118.

Khochbin, S. (2001). *Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function.* Gene. 271(1): 1-12.

Kysela B., Chovanec M., Jeggo PA. *Phosphorylation of linker histones by DNA-dependent protein kinase is required for DNA ligase IV-dependent ligation in the presence of histone H1.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(6):1877-82.

Laemmli, U.K.(1970). *Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4.* Nature, 227: 680 – 685.

Laemmli, U.K., Kas, E., Poljak, L., Adachi, Y. (1992). *Scaffold associated regions: cis actin determinants of chromatin structural loops and functional domains.* Curr. Opin. Genet. Dev. 2: 275-285.

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(1): 669-672.

Lever, M.A., Th'ng, J.P., Sun, X., Hendzel, M.J. (2000). *Rapid exchange of histone H1.1 on chromatin in living human cells*. Nature. 408 (6814): 873-876.

Lin, Q., Sirotkin, A., Skoultchi, A.I. (2000). *Normal spermatogenesis in mice lacking the testis-specific linker histone H1t*. Mol. Cell. Biol. 20(6): 2122-2128.

Lu, X. and Hansen, J.C. (2004). *Identification of specific functional subdomains within the linker histone H10 Cterminal domain*. J. Biol. Chem. 279 (10): 8701-8707.

Littau, U.C., Burdick, C.L., Allfrey, U.G. and Mirsky, A.E. (1965). *The role of histones in the maintenance of chromatin structure*. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA). 54: 1204 – 1214.

Maison, C., Almouzni, G. (2004). *HPI and the dynamics of heterochromatin maintenance*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 5(4):296-304.

Martianov, I., Brancorsini, S., Catena, R., Gansmuller, A., Kotaja, N., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., Davidson, I. (2005). *Polar nuclear localization of HIT2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102(8): 2808-2813.

McArthur, M., Thomas, J.O. (1996). *A preference of histone H1 for methylated DNA*. EMBO J. 15(7):1705- 1714.

Misteli, T., Gunjan, A., Hock, R., Bustin, M., Brown, D.T. (2000). *Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells*. Nature. 408 (6814): 877-881.

Moore, S. and Stein, W.H. (1963). *Chromatographic determination of aminoacids by the use automatic recording equipment*. Methods Enzymol., 6: 819- 831.

Moore, S.C., Jason, L., Ausio J. (2002). *The elusive structural role of ubiquitinated histones*. Biochem Cell Biol. 80 (3):311-319.

Muñoz-Guerra, S., Azorín, F., Casas, M.T., Marcet, X., Maristany, M.A., Roca, J. and Subirana, J.A. (1982). *Structural organization of sperm chromatin from the fish Carassius auratus*. Exp. Cell Res., **137**: 47-53.

Palma, S., Arana, P. (1996). *Método rápido de determinación del sexo en el erizo comestible Loxechinus albus (Molina, 1782) y su aplicación en estudios biológico-pesqueros*. Invest. Mar., Valparaíso, 24: 123-130.

Pham, A.D., Sauer, F. (2000). *Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in Drosophila*. Science. 289(5488):2357-2360.

Panyim, S. and Chalkley, R. (1969). Arch. Biochem Biophys. 130, 337-346.

Poccia, D. (1995). *Male germ line specific histones of sea urchin and sea stars*. In: Jamieson, B.G.M.; Ausió, J and Justine, J-L. (eds). Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mém. Mus. Natn. Histo. Nat. 166: 475- 489

Poirier, G.G., de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Niedergang, C., Mandel, P. (1982) *Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79(11): 3423-3427.

Ponte, I., Vidal-Taboada, J.M., Suau, P. (1998). *Evolution of the vertebrate H1 histone class: evidence for the functional differentiation of the subtypes.* Mol. Biol. Evol. 15(6): 702-708.

Ponte, I., Vila, R., Suau, P. (2003). *Sequence complexity of histone H1 subtypes.* Mol. Biol. Evol. 20(3): 371-380.

Rall SC., Cole RD. *Amino acid sequence and sequence variability of the amino-terminal regions of lysine-rich histones.* J Biol Chem. 1971;246(23):7175-7190.

Sarg, B., Helliger, W., Talasz, H., Forg, B., Lindner, H.H. (2006). *Histone H1 phosphorylation occurs site-specifically during interphase and mitosis: identification of a novel phosphorylation site on histone H1.* J. Biol. Chem. 281(10): 6573-6580.

Renz, M., Nehls, P. & Hozier, J. (1977). *Involvement of histone H1 in the organization of the chromosome fibre.* Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. 74, 1879-1883.

Ris, H. and Kubai, D.F. (1970). *Chromosome structure.* Annu Rev Genet. 4:263-294.

Saperas, N., Ribes, E., Buesa, C., García-Hegart, F. and Chiva, M. (1993). *Differences in chromatin condensation during spermiogenesis in two species of fish with distinct protamines. J. Exp. Zool.* 265: 185–194.

Simpson, R.T. (1978). *Structure of the chromatosome, a chromatin core particle sperm.* EMBO J. 8, 2591-2599.

Simpson, R. T. (1978). *Structure of the chromatosome, a chromatin core particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones.* Biochemistry. 17, 5524-5531.

Staynov, D.Z., Crane-Robinson, C. (1988). *Footprinting of linker histones H5 and H1 on the nucleosome.* EMBO J. 7(12):3685-3691.

Strickland, W.N.; Strickland, M.; Brandt, W.F.; von Holt, C.; Lehmann, A.; Wittmann-Liebold, B. 1980. *The primary structure of histone H1 from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*. 2. Sequence of the C-terminal CNBr peptide and the entire primary structure.* Eur. J. Biochem. 104:567-578.

Strickland, W.N., Strickland, M., de Groot, P.C., von Holt, C., Wittmann-Liebold, B. (1980). *The primary structure of histone H1 from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*. 1. Chemical and enzymatic fragmentation of the protein and the sequence of amino acids in the four N-terminal cyanogen bromide peptides.* Eur. J. Biochem. 104:559-566.

Suau, P., Bradbury, E.M., and Baldwin, J.P. (1979). *Higher order structures of chromatin in solution.* Eur. J. Biochem. 97, 593-602.

Subirana, J.A., Cozcolluela, C., Palau, J. and Unzeta, M. (1973). *Biochim. Biophys Acta* 317, 364-379.

Subirana, J.A. (1990). *Analysis of the charge distribution in the C-terminal region of histone H1 as related to its interaction with DNA*. *Biopolymers*. 29(10-11):1351-1357.

Sun, J.M., Wiaderkeiwicz, R., Ruiz-Carrillo, A. (1990). *Histone H5 in the control of DNA synthesis and cell proliferation*. *Science*. 245: 68-71.

Talasz H., Helliger W., Puschendorf B., Lindner H. *In vivo phosphorylation of histone H1 variants during the cell cycle*. *Biochemistry*. 1996;35(6):1761-1767.

Thoma F., Koller T. and Klug A. (1979). *Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin*. *J. Cell. Biol.* 83:403-427.

Thomas, J. O. and Komberg, R.O. (1978). *The study of histone association*. In: *Methods in Cell Biology*. G. Stein, J. Stein, L.K. Stein (Eds). Academic Press, New York, Vol 18: 429-440.

van Holde, K.E. (1988). In *Chromatin*. (Rich, A., ed). pp 69-148. Springer-Verlag, New York.

Welsh, S.L., Cole, R.D. (1979). *Differences between subfractions of H1 histone in their interaction with DNA*. J. Biol. Chem. 254: 662-665.

Widom, J.A. (1992). *Relationship between the helical twist of DNA and the ordered positioning of nucleosomes in all eukaryotic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 89(3):1095-1099.

Wolffe, A.P. and Press, D. (1996). *Deviant nucleosomes the functional specialization of chromatin*. Trends in Genetics (TIG), 12: 58 – 62.

Woodcock, C. L., Grigoryev, S. A., Horowitz, R. A. and Whitaker, N. (1993). *A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **90**, 9021-9025.

Yang, G., Leuba, S.H., Bustamante, C., Zlatanova, J., van Holde, K. (1994). *Role of linker histones in extended chromatin fibre structure*. Nat Struct Biol. 1(11):761-763.

Yellajoshyula, D., Brown, D.T. (2006). *Global modulation of chromatin dynamics mediated by dephosphorylation of linker histone H1 is necessary for erythroid differentiation*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103(49):18568-18573.

Zamora, S. y Stotz, W. (1992). *Ciclo reproductivo de Loxechinus albus (Molina 1782) (Echinodermata: Echinoidea) en Punta Lagunillas, IV Región, Coquimbo, Chile*. Revista Chilena de Historia Natural 65: 121-133.

Zhou, Y.B., Gerchman, S.E., Ramakrishnan, V., Travers, A., Muyldermans, S. (1998). *Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome*. Nature. 395, 402-405.



Bach. Richard Ponce Cusi
TESISTA



Mgr. Roberto Castellanos Cabrera
ASESOR