

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

Estudio de las Proteinas Asociadas a
la Cromatina del Espermatozoide
Humano

T E S I S
Que Para Obtener el Título de:
Q U I M I C O
P r e s e n t a

José Domingo Méndez Francisco

México, D. F.

1978



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS 1978
CLAS. M. T. 282
ADG. 282
FECHA _____
PREC. _____



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE

SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE	Guadalupe Vélez Pratt.
VOCAL	Paulina Castro Ardón.
SECRETARIO	Omar Hernández Pérez.
1er. SUPLENTE	Guillermo Rendón Padilla.
2° SUPLENTE	Homero Hernández Montes.

Sitio donde se desarrolló el tema: Sección de Bioquímica de la Reproducción, Departamento de Investigación Científica, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Sustentante: José Domingo Méndez Francisco.

Asesor del tema: Omar Hernández Pérez.

CONTENIDO

- I. INTRODUCCION
- II. GENERALIDADES
- III. MATERIAL Y METODOS
- IV. RESULTADOS
- V. DISCUSION Y CONCLUSIONES
- VI. BIBLIOGRAFIA

I N T R O D U C C I O N

Los estudios de las proteínas nucleares de una gran variedad de tipos celulares se han llevado a cabo con la idea de que estas proteínas son de alguna manera responsables de la definición fenotípica de las células, para la iniciación, continuación y cesación del crecimiento y división celular. En este fenómeno participan tanto proteínas estructurales, como proteínas reguladoras y enzimas.

Las proteínas nucleares juegan un papel esencial en la organización de la cromatina durante la interfase, de los cromosomas en la metafase, de los elementos nucleolares y de la membrana nuclear (1). Las proteínas reguladoras aseguran solamente la disponibilidad de aquellas unidades de la información genética requerida para la función propia de cada tipo celular (2). La existencia de estas proteínas reguladoras específicas, responsables del control genético en células eucarióticas fue confirmada por trabajos recientes de Bonner et al (3). Las enzimas nucleares catalizan reacciones tales como replicación, transcripción, las modificaciones físicas y químicas de los ácidos nucleicos y posiblemente la síntesis de proteínas específicas del núcleo (4).

Los eventos moleculares en el núcleo, deben de involucrar además a un gran número de proteínas diferentes.

GENERALIDADES

Cromatina.- La cromatina es una estructura compleja desde el punto de vista de su naturaleza química, y bioquímicamente es uno de los constituyentes macromoleculares más interesantes de la célula, ya que contiene las estructuras denominadas genes, los cuales, como es bien sabido, regulan la herencia, la diferenciación celular, e indirectamente el metabolismo de los organismos eucarióticos.

De acuerdo a Mirsky (5), el término cromatina fue ideado por Fleming (6), para indicar el material del núcleo de la célula que toma coloraciones básicas. Sin embargo esta definición de cromatina limitaría el uso del término más o menos al DNA. La definición de cromatina de Bonner et al (3), que considera a la cromatina como la forma extendida de los cromosomas encontrada en el núcleo entre las divisiones mitóticas de la célula, describe razonablemente bien el material que comunmente se llama cromatina. Los cromosomas durante la interfase aislados en forma extendida se denominan cromatina, pero como los cromosomas de la interfase pueden estar también en la forma condensada (7) y no hay razón para no considerar a todos estos cromosomas colectivamente como cromatina.

Heitz (8) ha hecho una nueva distinción entre estos dos tipos de cromatina, describiendo como heterocromatina a la porción de cromatina nuclear que se mantiene en forma condensada durante la interfase, y eucromatina, el resto de la cromatina nuclear que se encuentra en forma extendida.

Cooper (9) ha sugerido que la heterocromatina y la eucromatina difieren en sus conformaciones biofísicas y en las expresiones metabólicas de sus genes, pero no en la estructura básica del DNA ordenado en los cromosomas. A este respecto se han realizado estudios genéticos detallados sobre los cromosomas X heterocromáticos de células de hembras de mamíferos (10) así como de regiones de cromosomas Y heterocromáticos en Drosophila (11) los cuales han revelado que los genes en la heterocromatina están reprimidos pero que pueden ser expresados cuando la región de heterocromatina sufre una transición a eucromatina. De manera similar algunos estudios citológicos han revelado que la heterocromatina presenta una replicación tardía de su DNA, sin observarse fijación de ligandos del DNA como es el anaranjado de acridina (12) y presenta una escasa o nula síntesis de RNA, efecto que se invierte cuando la heterocromatina se transforma en eucromatina.

Estos y otros estudios apoyan fuertemente la idea de que la heterocromatina representa segmentos reprimidos de DNA cromosómico, mientras que la eucromatina representa seg-

mentos activos y que estas dos conformaciones del DNA pueden ser interconvertibles, y son una expresión del grado de diferenciación nuclear dentro de las células individualmente diferenciadas (13).

FUNCIONES DE LA HETEROCROMATINA Y DE LA EUCROMATINA.

A. SINTESIS DE RNA.

Frenster et al (14) han separado la heterocromatina de la eucromatina pudiendo así realizar una amplia variedad de estudios bioquímicos y biofísicos que han delineado tanto la composición, como las funciones de la heterocromatina y de la eucromatina.

Experimentalmente, ha sido posible observar que cuando se incuban núcleos con precursores de RNA sin la separación previa de la heterocromatina y de la eucromatina, esta última es la que contiene la mayor parte del RNA sintetizado (14). Estos hallazgos han sido confirmados por técnicas de autorradiografía (15). El análisis de la composición de estos dos tipos de cromatina reveló un contenido igual de histonas en relación al DNA, y que existe una proporción mayor de polianiones nucleares tales como RNA, proteínas residuales y fosfoproteínas en la eucromatina (16). Estos mismos autores observaron que cuando se adicionaron polianiones nucleares a la heterocromatina aislada, se produjo una desrepre

si3n de la s3ntesis de RNA en la heterocromatina sugiriendo un papel fisiol3gico normal en el control de la transcripci3n para estos polianiones nucleares.

B. SINTESIS DE DNA

Estudios similares a los descritos anteriormente se han llevado a cabo incubando n3cleos aislados durante la interfase con precursores de DNA sin la separaci3n de la heterocromatina y de la eucromatina, los resultados mostraron tambi3n que la eucromatina es la que contiene la mayor parte del DNA sintetizado (14). Posteriormente se ha demostrado que los segmentos cromos3micos que se transcriben para la s3ntesis de RNA en la fase "G₁" de la interfase son los mismos segmentos que sirven para la s3ntesis de DNA en la fase "S" de la interfase (17), sugiriendo esto, que el patr3n de DNA que permite la s3ntesis de RNA es igualmente propicio para la s3ntesis del DNA.

COMPOSICION DE LA CROMATINA.

Los principales constituyentes de la cromatina son: 3cido desoxirribonucleico, prote3nas nucleares, ciertas enzimas unidas como las polimerasas de los 3cidos nucleicos, una peque1a cantidad de 3cido ribonucleico y generalmente, una peque1a cantidad de l3pidos (18).

Las prote3nas nucleares se han clasificado en dos grupos:

I. Histonas.

II. Proteínas No-Histónicas ó Acídicas (las cuales incluyen a las enzimas nucleares).

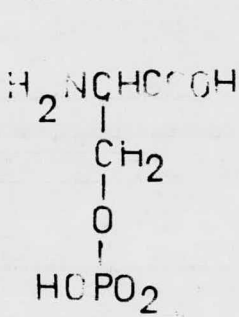
En años recientes se ha logrado un progreso notable en la química de las proteínas nucleares, particularmente de las histonas y esto ha servido como una base para posteriores consideraciones de su interrelación con el DNA.

I. HISTONAS

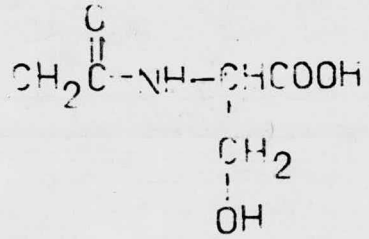
Las histonas son proteínas básicas que están asociadas al DNA de las células somáticas de todos los organismos eucarióticos, pero no han sido reportadas en los procariotes (19). Se les ha considerado como proteínas estructurales debido a que reúnen ciertas características comunes, tales como un contenido de más del 20% de aminoácidos básicos, no contienen triptofano y sólo contienen pequeñas cantidades de cisteína o cistina, aunque no se puede descartar que tengan funciones reguladoras especiales, tal como lo han propuesto Stedman y Stedman (20).

El uso de técnicas como la electroforésis en gel de acrilamida (21), ha favorecido el análisis de las histonas, permitiendo una clasificación según su contenido de aminoácidos en: a) histonas ricas en arginina y glicina, b) histonas ricas en serina y lisina, dos tipos intermedios, uno que contiene arginina y lisina c) y otro rico en arginina d) y e) un grupo de proteínas que está constituido de histonas

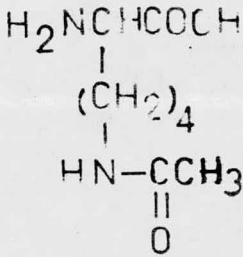
MODIFICACIONES QUIMICAS DE LOS AMINOACIDOS EN LAS HISTONAS



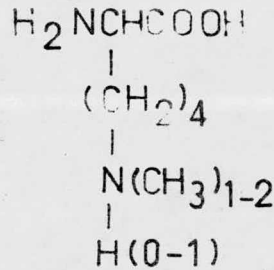
Fosfoserina



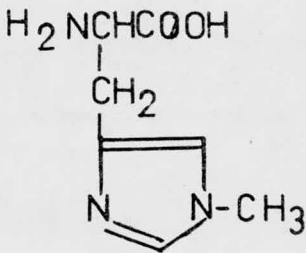
α -N-Acetilserina



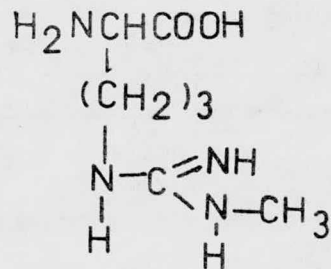
ϵ -N-Acetil lisina



ϵ -N-mono y dimetil lisina



3-metil histidina



ω -N-metil arginina

Fig. 1

ricas en valina y lisina. Aunque hay cinco clases principales de histonas en la mayoría de los tejidos existe una heterogeneidad dentro de estos grupos que resulta de modificaciones químicas de algunos aminoácidos específicos, como en las histonas ricas en arginina que han sido extraídas de timo de ternera y que en algunos sistemas electroforéticos se separan en dos subfracciones; una banda que es la histona principal y la otra que contiene un grupo acetilo (22). Este tipo de modificaciones químicas como acetilación, metilación y fosforilación que pueden sufrir algunos aminoácidos, fig (1) incrementa el número de variantes de las histonas (23).

La estructura de la cromatina depende del tipo de célula, su ciclo y su edad y del método de extracción. En la metafase, la cromatina contiene de 13 al 17% de DNA, 8-15% de RNA y 68-79% de proteínas (24), mientras que en la interfase la cromatina contiene aproximadamente 25% de DNA, de 3 a 4% de RNA y 70% de proteína (24). Aunque la estructura de la cromatina no está bien definida, hay varios estudios recientes que proporcionan una visión de como interaccionan las histonas con el DNA. La elucidación de la secuencia de aminoácidos de las histonas ricas en glicina y arginina ha permitido la construcción de modelos, en los cuales la región amino terminal de estas histonas se acomoda como una α -hélice en las largas acanaladuras de la doble hélice del DNA (25).

Los grupos α -amino de residuos de lisina forman puentes salinos con los grupos fosfato del DNA. De manera similar se comportan las histonas que contienen arginina y lisina (26).

Numerosos estudios físicos han mostrado que las histonas ricas en glicina y arginina adoptan una estructura de α -hélice cuando se unen al DNA, no así, cuando están libres en solución (27). Inversamente cuando las histonas ricas en lisina se unen al DNA, el comportamiento físico es el de una proteína en forma extendida; otros trabajos hechos sobre histonas ricas en serina y lisina (28), apoyan la idea de que las regiones básicas son los sitios primarios de la interacción y que las regiones no básicas parecen tener estructura secundaria que pueden ser sitios para las interacciones histona-histona.

Los perfiles de desnaturalización térmica de varios complejos de DNA-histona indican que los efectos de cada histona sobre la estructura del DNA son bastante específicos (29). Estudios similares sobre la interacción de histonas ricas en serina y lisina con DNA indican que los residuos amino terminales estabilizan al DNA contra la desnaturalización térmica mucho mejor que las porciones carboxiloterminales (30).

Recientemente Clark y Felsenfeld (31), reportaron

que cuando se remueven selectivamente de la cromatina todas las histonas excepto las ricas en glicina y arginina y las histonas ricas en arginina, estas dos clases de proteínas permanecen firmemente unidas a segmentos intactos de DNA que contienen grandes cantidades de guanina y citocina, lo cual confirma que debe haber una interacción específica entre las histonas y las bases que componen el DNA. Aunque el número de aminoácidos básicos es aproximadamente igual al número de nucleótidos cargados negativamente en la cromatina, la titulación de la cromatina con polilisina (32), muestra que aproximadamente el 48% de los grupos fosfato del DNA en la cromatina están libres. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos por Simpson (33) sobre la modificación de la cromatina de hígado de conejo con anhídrido acético que alcanza un valor de acetilación de 54 residuos de amino ácidos por 100 pares de bases.

Otros estudios en los que se ha empleado la digestión de la cromatina con tripsina demuestran que 55 peptidos unidos por 100 pares de bases del DNA son susceptibles al rompimiento (33).

Estos resultados hacen pensar que la cromatina tiene una conformación de super-enrollamiento y que la interacción de las histonas a través del DNA actúa favoreciendo esta conformación (34).

II. PROTEINAS NO-HISTONICAS

En la actualidad se ha enfocado la atención al estudio de la función biológica de las proteínas no-histónicas ó ácidas que están asociadas a la cromatina de células eucarióticas. Se han realizado estudios en sistemas bacterianos (35), que presentan la ventaja de que fácilmente se pueden disponer de mutantes, lo que ha permitido un rápido avance en el análisis estructural y funcional de estas proteínas.

Las proteínas no-histónicas contienen grandes cantidades de ácido glutámico y ácido aspártico (36) y en contraste con las histonas, las proteínas no histónicas, presentan una gran heterogeneidad, tanto estructural como funcionalmente.

Busch (37), observó que las proteínas no-histónicas eran capaces de formar complejos con las histonas desplazando las del DNA. También se ha reportado que estas proteínas no-histónicas se unen directamente al DNA (38). Es posible que las proteínas no histónicas de la cromatina jueguen un papel importante en a) La regulación de la actividad genética por apertura de las regiones del DNA en la cromatina para ser usadas como patrones en la síntesis de RNA, dependiente de DNA, b) La regulación continua de la actividad genética, determinando de este modo los patrones de restricción del DNA en la cromatina (que regiones van a ser permanentemente inactivas no disponibles para la transcripción y cuales regiones podrán serlo) c) La regulación de la velocidad de transcrip

cción del DNA por medio de la enzima RNA polimerasa, y d) El mantenimiento de la organización de la cromatina en los cromosomas tanto en la interfase como en la metafase (39).

Por otra parte, se ha supuesto que los represores genéticos tienen sitios específicos de unión sobre el DNA. Sin embargo, a diferencia de los sistemas bacterianos donde la mayoría de las proteínas no-histónicas unidas al DNA parecen tener funciones represoras (35), en las células de mamíferos la eucromatina tiene un contenido de proteínas no-histónicas más alto que la heterocromatina y las proteínas ácidas involucradas en el control genético tienen funciones desrepresoras, más que funciones represoras (16).

Recientemente, se ha sugerido que las proteínas no-histónicas pueden servir como "sitios de reconocimiento" para ciertas proteínas citonucleares, que están involucradas en la regulación de la transcripción (40).

Hay una prueba considerable de que los receptores hormonales en el citoplasma de células específicas transportan a algunas hormonas ó sustancias activadoras al interior del núcleo donde el complejo hormona-receptor se fija a sitios específicos del gene (41) (42). Algunas hormonas esteroides incrementan la velocidad de síntesis de las fracciones específicas de proteínas no-histónicas (43).

La presencia y actividad funcional de tales recepto

res en el oviducto de pollo, hacen que los estrógenos induzcan el crecimiento y la diferenciación así como producción de ovalbumina y otras proteínas de la clara del huevo (42). En el oviducto también existe un receptor específico para progesterona y el complejo receptor-progesterona se une a la cromatina (42).

Las proteínas de la cromatina asociadas con el complejo esteroide-receptor son acídicas y presentan especificidad de tejido (44). Los estudios con cromatinas reconstituidas indican que la capacidad receptora a hormonas esteroideas es debida a las proteínas no-histónicas unidas al DNA del oviducto (40) (45). La reconstitución de la cromatina con histonas de otras fuentes ajenas al oviducto, muestra que no existe especificidad para las histonas.

Un sistema análogo se ha descrito para el útero de la rata (43).

Lo anterior parece indicar que las proteínas no-histónicas juegan un papel importante en el mecanismo de acción de algunas hormonas.

Para el estudio de la estructura y función de las proteínas básicas cromosómicas; el desarrollo de la célula espermática ofrece una serie única de eventos ya que su formación a partir de la espermatogonia es un proceso complejo que involucra división celular y diferenciación. Durante

estos procesos el número de cromosomas se reduce a la mitad y tanto el material nuclear como el citoplásmico se reorganiza de una manera muy especial (46).

En la última fase de la espermatogénesis (fig. 2) ocurre un fenómeno de metamorfosis en el cual las espermatidas se diferencian en espermatozoides sin división posterior. Esto involucra una alteración radical en la forma celular durante la cual la mayor parte del citoplasma incluyendo ácido ribonucleico, agua y glucogeno se pierde (47). La espermatida es una célula moderadamente grande y redonda, mientras que el espermatozoide es una célula alargada completa y móvil. (fig. 3).

Gledhill (48), ha reportado que durante la diferenciación de las espermatidas en espermatozoides ocurre un reemplazamiento de las histonas de tipo somático, por histonas mucho más básicas con un alto contenido de arginina.

Como una consecuencia de este proceso de reemplazamiento, la cromatina del espermatozoide llega a ser altamente condensada y el núcleo mismo sufre una marcada contracción (49), y la expresión genética de las células diferenciadas queda totalmente reprimida (50).

Es posible que el primer aspecto (condensación) sea la función primaria de las histonas y que el segundo (re-represión) ocurre solo como una consecuencia del empaquetamieno

ESPERMATOGENESIS

ESPERMATOGONIA
2 N

MITOSIS

ESPERMATOCITO PRIMARIO
2 N

MEIOSIS I

ESPERMATOCITO SECUNDARIO
N

MEIOSIS II

ESPERMATIDAS

METAMORFOSIS

ESPERMATOZOIDES
N

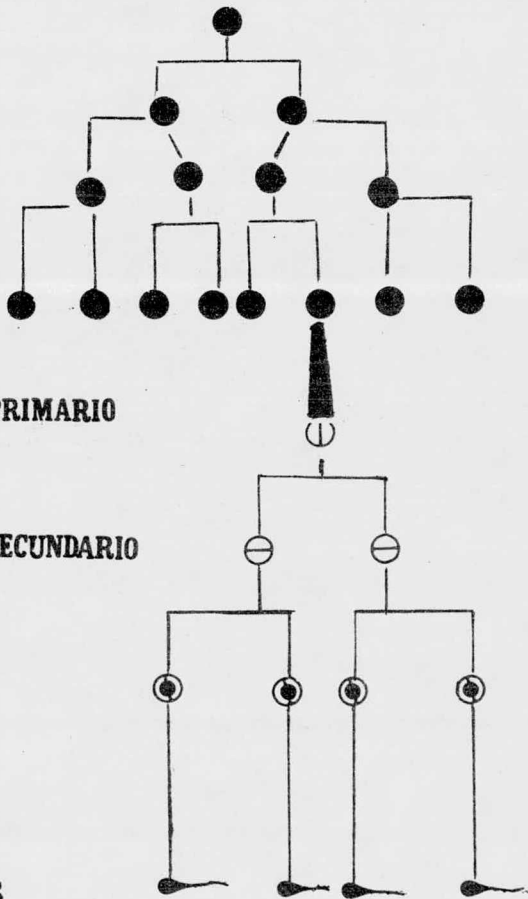


Fig. 2

METAMORFOSIS DE LA ESPERMATIDA

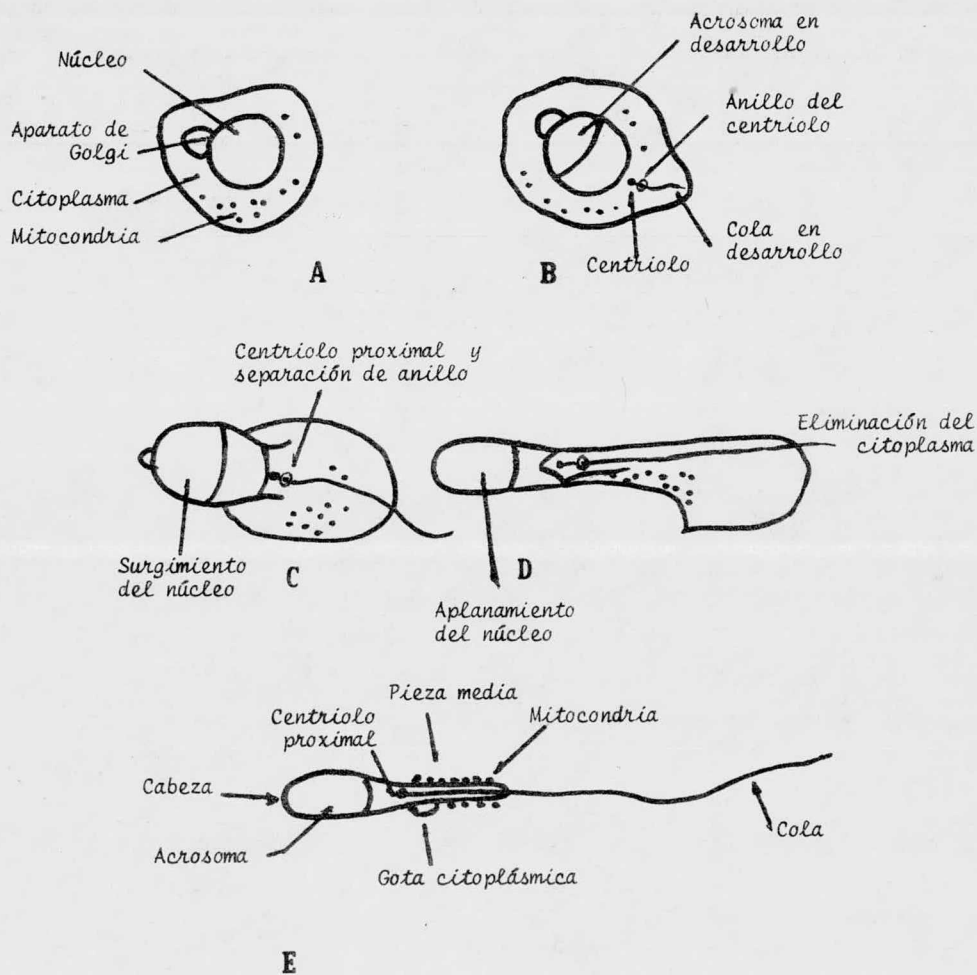


Fig. 3

to del DNA haciendo de esta manera al genoma del espermatozoide indisponible para la transcripción.

Por otra parte, la modificación del metabolismo del espermatozoide por estrógenos ha sido descrita por Hicks y Rosado (51). Sin embargo la escasez de síntesis de RNA y de síntesis de proteínas por estas células hace difícil la interpretación de estos resultados. De acuerdo a los estudios recientes realizados por Hernández y col. (52) sobre el transporte de estradiol y testosterona al núcleo del espermatozoide indican que existe en el espermatozoide un mecanismo activo para efectuar este transporte.

Con el objeto de dilucidar el posible papel que juegan las proteínas nucleares del espermatozoide, desde el punto de vista estructural y/o funcional, hemos decidido aislar y caracterizar a las histonas y a las proteínas no-histónicas del espermatozoide humano y estudiar la fijación "in vitro" a estos dos tipos de proteínas de algunas hormonas esteroides.

MATERIAL Y METODOS

I.- MATERIAL

- a) Tubos de ensayo.
- b) Tubos de centrifuga de vidrio y de plástico de 12 ml.
- c) Vasos de precipitado.
- d) Pipetas.
- e) Micropipetas.
- f) Pipetas Pasteur.
- g) Propipetas.
- h) Matraces.
- i) Viales.
- j) Columnas.

II. REACTIVOS

Se usaron de las marcas: Sigma, Merck, Baker, Mallinckrodt, Gadir, Eastman Organic Chemical, Amersham/Searle y Bio-Rad.

1. Amortiguador Krebs-Henseleit pH 7.4 (libre de calcio).

Cloruro de sodio	0.154 M	(100 partes)
Cloruro de potasio	0.154 M	(4 partes)
Fosfato monopotásico	0.154 M	(1 parte)
Sulfato de magnesio		
Heptahidratado	0.154 M	(1 parte)
Bicarbonato de sodio	1.3%	(21 partes)

Ajustar el pH con HCl IN

2. Solución de formol

Formol al 1%

Citrato de sodio al 2.5%

3. Ditiotreitol (DTT) 1 M4. Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB) al 5%5. Amortiguador de Tris-HCl 0.01 M pH 8

(Tris (Hidroximetil) aminometano) conteniendo Triton
X - 100 al 1%

6. Amortiguador de Tris-HCl 0.01 M pH conteniendo
desoxicolato de sodio 0.01 M.7. Amortiguador de Tris-HCl 0.01 M pH 8.8. Amortiguador de Tris-HCl 0.01 M pH 8.0 conteniendo
NaCl 0.6 M, 2-mercaptoetanol 0.2 M urea 4 M9. Bio-Gel P-2 (50-100 mesh).10. Bio-Gel P-10 (200-400 mesh).11. HCl 0.01 M, 0.25 M y 4 M.12. Acido tricloroacético al 40% y 50%.13. NaCl 0.14 M14. Cloroformo (grado espectro).15. Metanol16. Eter anhidro17. Amortiguador de Tris-HCl 0.1 M pH 8 conteniendo

etilendiamino tetraacetato de sodio (EDTA) 0.01 M y
2-mercaptoetanol 0.07 M.

18. Fenol (grado reactivo)

Se destiló a 182°C para su uso.

19. Acido acético 0.1 M conteniendo 2-mercaptoetanol 0.07 M
20. Acido acético 0.05 M conteniendo urea 9 M y 2 mercaptoetanol 0.07 M.
21. Solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 M pH 8.4 conteniendo urea 8.6 M, EDTA 0.01 M y 2-mercaptoetanol 0.07 M.
22. Etanol (grado espectro).
23. Dodecil sulfato de sodio al 3% (SDS).
24. HClO₄ 0.5 M, 1 M y 2 M.
25. NaOH 1 N.
26. Acido Acético 0.9 N
27. Amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 7.2 conteniendo SDS al 0.1%, 2-mercaptoetanol 0.07 M y Sacarosa 0.25 M.
28. 17-B estradiol-6,7-H³ (act. esp. 4.8 Ci/mmol)
29. Progesterona-7-H³ (act. esp. 4.2 Ci/mmol).
30. Testosterona-7-³H (act. esp. 5 Ci/mmol).
31. Solución centelleante: 2,5 difeniloxazol al 0.4% (PPO) 1,4-bis(2-(5-feniloxazolil) benceno al 0.01% (POPOP) en tolueno.
32. Solución de TEMED
- | | |
|---|---------|
| Hidroxido de potasio 1 N | 48 ml |
| ácido acético glacial | 17.2 ml |
| N, N, N', N', tetrametil
etilendiamina (TEMED) | 4 ml |

33. Solución de acrilamida

Acrilamida	30 g
N, N',-metilenbisacrilamida	0.8 g
agua desionizada a	100 ml

34. Catalizador

persulfato de Amonio	2%
en urea	10 M

35. Tris (hidroximetil) aminometano

	18.7 g
dodecil sulfato de sodio al 10%	4 ml
ácido clorhídrico 6 N para pH 8.8	
ajustar con agua destilada a	100 ml

36. Tris (hidroximetil) aminometano

	6.0 g
dodecilsulfato de sodio al 10%	4 ml
ácido clorhídrico 6 N para pH 6.8	
ajustar con agua destilada a	100 ml

37. Glicina 0.192 M

	14.4 g
dodecil sulfato de sodio 0.1%	1.0 g
Tris (hidroximetil) aminometano 0.025 M	3.0 g

38. Persulfato de amonio al

10%

39. Azul de metileno

0.02%

40. Azul de bromofenol al 0.02% en sacarosa al 50%41. Azul brillante de coomassie al 0.05% en ácido tricloro-
ácetido al 50%42. Acido acético al 7%

III. APARATOS

1. Microscopio (Carl Zeiss)
2. Agitador magnético (Arthur H. Thomas, Co.).
3. Potenciómetro (Metrohm Herisau modelo Composter E-338).
4. Ultracentrífuga refrigerada RC2-B.
5. Colector de fracciones LKB modelo 1700.
6. Liofilizadora (Virtis).
7. Espectrofotómetro Coleman Jr. modelo 635.
8. Densitómetro Kipp & Zone.
9. Centrífuga Clínica (Clay Adams, Inc.).
10. Cámara para electroforésis (Buchler Instruments N°1004).
11. Fuente de Poder (Buchler Instruments N°3 1008).
12. Espectrofotómetro Ultravioleta Unicam SP-800 B.
13. Espectrofotómetro de Centelleo Líquido (Packard Modelo 3390).

IV. METODOS

A. AISLAMIENTO DE LOS NUCLEOS DEL ESPERMATOZOIDE.

Los espermatozoides fueron obtenidos de eyaculados de donadores voluntarios sanos y fértiles, los cuales después de recibirse en vasos de precipitados se dejaron reposar durante 60 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disolución de los coagulos presentes. Con la ayuda de un microscopio de luz (Carl Zeiss) se hizo una selección de las muestras aplicando los siguientes criterios:

- a) Alto contenido de espermatozoides. (Más de 10^8 esp/ml).
- b) Bajo contenido de leucocitos, limitándose estos a un número de 5 células por campo. Analizando por lo menos 10 campos con un aumento de 320 X.
- c) Un volumen mínimo de 2.5 ml.

Para las condiciones de trabajo fue necesario reunir de 8 a 10 muestras de semen que proporcionaron un número aproximado de 3×10^9 espermatozoides, los que se colectaron por centrifugación a 3500 rpm durante 15 minutos utilizando una centrífuga clínica (Clay Adams, Inc.).

El paquete de células obtenido se resuspendió en 5 ml de solución de Krebs-Henseleit, pH 7.4 (K-H) (53), se lavó tres veces con la misma solución y se centrifugó en las condiciones antes mencionadas. Finalmente los espermatozoides se resuspendieron en 10 ml de solución de K-H. Una alícuota de esta suspensión se diluyó 10 veces y el recuento de espermatozoides se hizo empleando una cámara de Neubauer y solución de formol al 1% conteniendo citrato de sodio al 2.5%.

Los espermatozoides así lavados se resuspendieron con solución de K-H 7.4 hasta obtener una densidad óptica de 1.2-1.6 unidades/ml a 550 nm en un espectrofotómetro Coleman Jr. modelo 635. Esa D.O. corresponde a una concentración de 100 133 millones de espermatozoides/ml (54). A esta suspensión se le adicionó una cantidad de ditiotreitól (DTT), suficiente para obtener una concentración final de 0.25 mM y se agitó

durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se agregó bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) hasta obtener una concentración de 0.25%, la agitación se continuó por 30 minutos. Esta suspensión se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente obteniéndose así la fracción nuclear pura, la cual se lavó cuatro veces con solución de K-H en las condiciones de centrifugación ya mencionadas. Se llevó a cabo un control por microscopía electrónica (fig 4) tomando una alícuota de esta suspensión que se centrifugó a 3000 rpm, durante 10 min. Los sobrenadantes se descartaron y los núcleos fueron resuspendidos y fijados en una solución de glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato 0.1 M, pH 7.4, de acuerdo al método de Sosa y Col. (55).

A continuación se presenta un diagrama de los pasos seguidos durante el procesamiento de las muestras de espermatozoides y de leucocitos.

B. OBTENCION DE CROMATINA.

De la fracción nuclear se obtuvo la cromatina por el método de Marushige (56). Los núcleos obtenidos siguiendo el método descrito en el párrafo anterior se resuspendieron en 10 ml de solución amortiguadora de Tris 0.01 M pH 8.0 conteniendo Tritón X-100 al 1% y se dejaron agitando durante 12 hrs. a 4°C. Al finalizar este tiempo la suspensión se centrifugó a 1500 x g en la centrífuga Sorvall modelo RC2-B durante 10 minutos utili

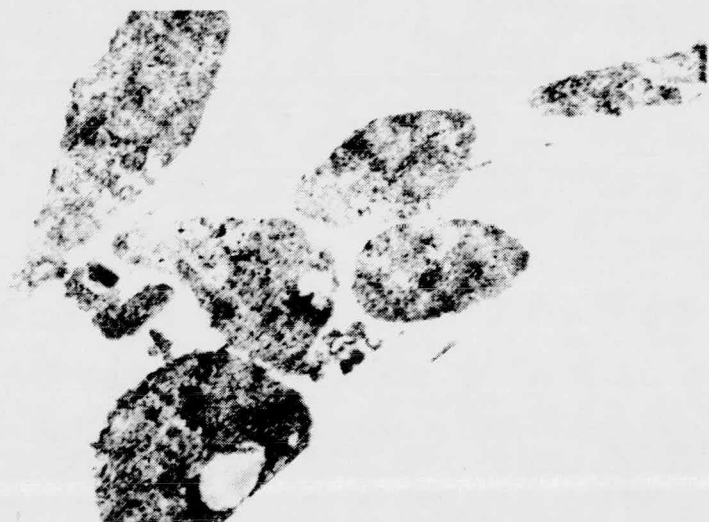
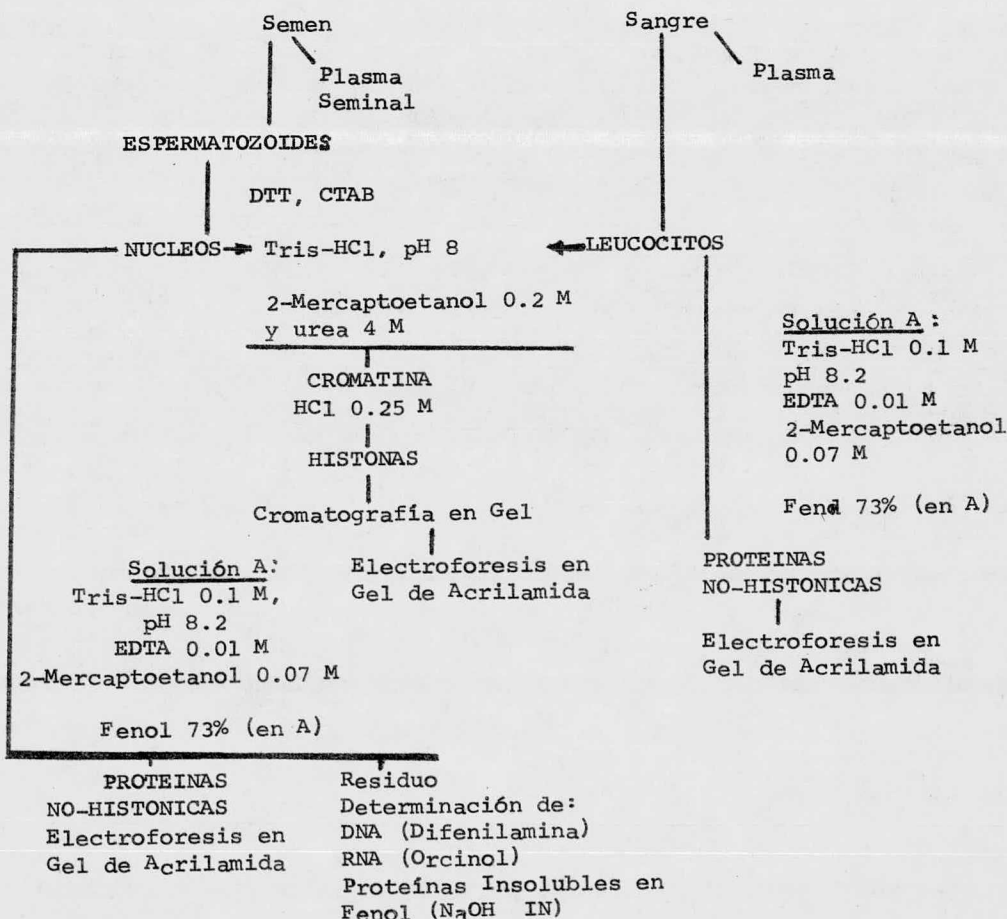


Fig. 4

Núcleos de espermatozoides humanos fijados en una mezcla de glutaraldehído y postfijados en tetroxido de osmio y nitrato de lantano. Los núcleos muestran la preservación de su forma e integridad original, así como también la ausencia de otras estructuras contaminantes (X 70 000).

zando el rotor SM-24. Los núcleos se resuspendieron nuevamente en 10 ml de una solución amortiguadora de Tris 0.01 M, pH 8 conteniendo desoxicolato de sodio 0.01 M y se incubaron a 37° C durante 60 minutos. La suspensión se centrifugó y se lavó cuatro veces con 5 ml de la solución de Tris 0.01 M pH 8.0.

Fig.4A. Diagrama de los pasos seguidos para el aislamiento y la purificación de las proteínas nucleares, su caracterización y su capacidad receptora de hormonas esteroideas.



Finalmente, la cromatina se obtuvo cuando los núcleos se incubaron por 2 hrs. a 37°C en la solución amortiguadora de Tris 0.01 M pH 8.0 conteniendo: NaCl 0.6 M, 2-mercaptoetanol 0.2 M y urea 4 M.

C. FRACCIONAMIENTO DE LA CROMATINA.

I. Aislamiento y Purificación de Histonas.

El aislamiento y purificación de estas proteínas fue a base de Cromatografía por filtración en Gel el cual es un método de separación de proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y otras sustancias poliméricas basado en la diferencia de tamaño de las moléculas.

Para nuestros fines se seleccionaron el Bio-Gel P-2 (50-100 mesh) y el Bio-Gel P-10 (200-400 mesh). El primero se recomienda cuando se requiere alta velocidad de flujo del eluyente sin importar la resolución ya que esta es baja, su principal función es eliminar exceso de sales. El segundo ofrece ventajas en cuanto a resolución se refiere, pero la velocidad de flujo es menor. Este producto se recomienda para determinaciones de pesos moleculares y separaciones de mezclas de proteínas.

Para la preparación de las columnas el Bio-Gel se dejó hidratando durante la noche con agua destilada, equilibrándose después de su preparación con HCl 0.01 M.

A la cromatina obtenida como una suspensión alta-

mente viscosa se le adicionó HCl 4 M hasta una concentración final de 0.25 M manteniendo el tubo en hielo durante el tiempo de adición. Después de 30 minutos de incubación con agitación ocasional se centrifugó a 11,800 rpm por 20 minutos, recuperando las proteínas básicas en la fracción sobrenadante. Este sobrenadante se pasó a través de una columna de Bio-Gel P-2 de 1.5 x 20 cm para eliminar el exceso de sales presente. Las histonas se eluyeron con HCl 0.01 M colectándose en un volumen total de 40 ml al que se adicionó un volumen igual de ácido tricloroacético al 40%. Con el objeto de que las proteínas básicas precipiten, la mezcla se dejó en reposo durante 12 horas en refrigeración, después se centrifugó a 17,000 rpm durante 20 minutos.

Las histonas contenidas en el precipitado se extrajeron con 4 ml de HCl 0.25 N eliminando pequeños residuos por centrifugación a 17,000 rpm. Las proteínas se precipitaron nuevamente con ácido tricloroacético a una concentración final 20%. El precipitado que se obtuvo por centrifugación fue disuelto en 2 ml de solución amortiguadora de Tris 0.05 M pH 8.0 conteniendo cloruro de guanidina 4 M.

EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO DE LA CROMATINA DE LEUCOCITOS.

Con el objeto de tener una preparación de cromatina que pudiera servir como control, se utilizaron leucocitos huma

nos que se obtuvieron a partir de 500 ml de sangre fresca, la cual se dejó reposar en hielo por 2 horas con lo que se logró la separación de leucocitos en la fase superior. Esta fase fue separada por succión utilizando una propipeta y centrifugada a 3200 rpm por 10 minutos en una centrífuga refrigerada.

Los leucocitos se lavaron 3 veces con solución de Tris-HCl 0.01 M pH 7.2 y se incubaron a 37° C por 2 horas en solución de Tris 0.01 M pH 8.0 conteniendo NaCl 0.6 M, 2-mercaptoetanol 0.2 M y urea 4 M, obteniendo así la cromatina (56).

A. EXTRACCION DE HISTONAS.

La extracción y purificación de Histonas se hizo siguiendo el procedimiento descrito previamente para los núcleos del espermatozoide humano.

PURIFICACION DE LA FRACCION DE HISTONAS POR CROMATOGRAFIA EN GEL.

Se preparó una columna de Bio-Gel P-10 de 1.5 x 25 cm equilibrándose durante la noche con HCl 0.1 M. El volumen vacío de la columna se midió usando una solución al 0.02% de azul de dextran 2000.

Se pasaron a través de la columna soluciones de proteínas tanto de espermatozoide como de leucocitos conteniendo concentraciones aproximadas de 300 ug. La elución se hizo con HCl 0.01 M a una velocidad de flujo de 2 ml/min. Se colectaron fracciones de 12 gotas, usando un colector de frac-

ciones LKB modelo 1700, equipado con un graficador y un monitor para ultravioleta Uvicord II.

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LAS HISTONAS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA.

Para la separación electroforética de esta mezcla de proteínas básicas fue necesario concentrar por liofilización la muestra eluida de la columna de Bio-Gel P-10.

Con el objeto de poder correlacionar los pesos moleculares la distancia de migración de cada una de las bandas de proteína, se utilizaron como estandares las siguientes proteínas: citocromo C (P.M. 12450) Ribonucleasa de Pancreas de Bovino (P.M. 13700) Lisozima de huevo (P.M. 14400) y mioglobina (P.M. 17800), de las cuales se prepararon soluciones de aproximadamente 10 ug y que fueron tratadas para su aplicación como se describe más adelante para las histonas.

ELECTROFORESIS

La electroforésis se llevó a cabo siguiendo el método de Wray y Stubblefield (57), que utiliza acrilamida al 7.5%.

REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS.

Solución 1.- Hidróxido de potasio IN	48 ml
ácido acético glacial	17.2 ml
N, N, N', N', tetrametil etilendramina (TEMED)	4 ml
agua desionizada a	100 ml
Solución 2.- Acrilamida	30 g

N, N',-metilenbisacrilamida	0.8 g
agua desionizada	100 g
Solución 3.- Persulfato de amonio	2%
en urea	10 M

(Esta solución se debe de preparar al momento de usarse).

Para la preparación de los geles se combinaron las soluciones en las proporciones siguientes: 3 volúmenes de la solución 1, 6 volúmenes de la solución 2 y 15 volúmenes de la solución 3.

Con esta mezcla se llenaron los tubos de 0.6 cm de diámetro hasta una altura de 7 cm efectuándose la polimerización en un tiempo aproximado de 45 min.

Se aplicaron a los geles alícuotas conteniendo 12 ug de proteína del espermatozoide y 20 ug de los leucocitos respectivamente, disueltos en sacarosa al 15% preparada en ácido acético 0.9 N. Se adicionaron 5 ul de azul de metileno al 0.02% como colorante indicador.

El electrolito utilizado fue ácido acético 0.9 N y la corriente de 2 mA/gel en dirección catódica en un equipo Buchler Instruments durante 3 horas. Los geles se sacaron enfriando los tubos en un baño de hielo por 30 minutos y por inyección de agua, se fijaron con ácido tricloroacético al 10% durante 10 horas y se tiñeron de acuerdo al método de Panyim y Chalkley (58) utilizando una solución de negro de amido al

0.1% en etanol al 20% por 5 horas.

La decoloración se hizo por lavados sucesivos con ácido acético al 7%. Los patrones electroforéticos se obtuvieron por medio de un densitómetro Kipp & Zone.

EXTRACCION SALINA.- Una extracción con NaCl 0.14 M permite remover componentes solubles y algunas proteínas básicas. A la fracción nuclear que ocupa de 150 a 200 ul de volumen se agregaron 2 ml de solución fría de NaCl 0.14 M y se homogenizó en un homogenizador tipo Potter-Elvehjem, después se agregaron 2 ml más de solución de NaCl 0.14 M y se mezcló. El homogeneizado se centrifugó por 10 minutos a 1,000 x g y el sobrenadante se colectó. La extracción se repitió una vez más y los sobrenadantes salinos combinados (8.0 ml) se utilizaron para determinar proteínas (59).

EXTRACCION ACIDA.- El residuo anterior se suspendió en 2.0 ml de HCl 0.25 N frío, se agitó y se adicionaron 2.0 ml más de HCl 0.25 N frío, se mezcló y se dejó reposar en hielo por 1 hora. El material se recogió por centrifugación a 1,000 x g por 15 minutos. El sobrenadante se colectó y el residuo se reextrajo otra vez en las condiciones anteriores, excepto que la muestra no se dejó reposar en hielo. Los sobrenadantes combinados se conservaron en refrigeración hasta su análisis. En esta extracción se recuperan las histonas (60).

EXTRACCION DE LIPIDOS.- El exceso de líquido que quedó junto con el precipitado de los procesos anteriores se eliminó por aspiración ya que el agua puede causar separación de las fases durante la primera extracción de lípidos. El residuo de la extracción ácida se suspendió en 2.0 ml de cloroformo-metanol 1:1 (v/v) y se centrifugó a 1,000 x g 5 minutos, descartando el sobrenadante. El residuo se suspendió en 2 ml de cloroformo-metanol 2:1 (v/v) (en ambos casos la mezcla de cloroformo-metanol fue acidificada con 3 gotas de HCl 0.25 N), se centrifugó nuevamente y el material nuclear se lavó con 4 ml de eter anhidro recuperando el residuo por centrifugación a 1,000 x g durante 1 minuto.

A. SOLUBILIZACION DE LAS PROTEINAS ACIDICAS RESIDUALES.

El complejo residual de DNA-Proteína se suspendió cuidadosamente en 1.5 ml de una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.2 conteniendo EDTA 0.01 M y 2-mercapto-etanol 0.07 M.

A esta suspensión se le adicionó 1.5 ml de fenol, saturado con el mismo amortiguador (fenol 73%) y la preparación se homogenizó por 1 minuto en un homogenizador Potter-Elvehjem a 1,500 rpm. La emulsión resultante se dejó agitando 18 horas a 4° C y se centrifugó a 1,200 x g durante 10 minutos. La fase acuosa junto con la interfase se separaron cuidadosamente y se reextrajeron con un volumen igual de fenol y después de una agitación por 30 minutos a 4° C se

centrifugó nuevamente. Los extractos de fenol combinados se dializaron por 3 horas contra 100 volúmenes de ácido acético 0.1 M conteniendo 2-mercaptoetanol 0.07 M. La diálisis se continuó con solución recién preparada hasta que la fase fenólica se redujo a 0.5 ml aproximadamente. Se abrió el tubo de diálisis y se separó la fase fenólica.

El fenol residual fue dializado contra ácido acético 0.05 M conteniendo urea 9 M y 2-mercaptoetanol 0.07 M por 24 horas. La diálisis se continuó por 2 horas más en solución amortiguadora de tris-HCl 0.1 M y 2-mercaptoetanol 0.07 M. Este procedimiento de diálisis permite recuperar las proteínas solubles en fenol de la fase acuosa para su posterior caracterización.

CUANTIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS.

A la fase acuosa del procedimiento anterior se agregaron 2 volúmenes de etanol frío (grado espectro) con el objeto de precipitar a los ácidos nucleicos. Después de 60 minutos de reposo en hielo, el precipitado se recuperó por centrifugación a 3,000 rpm durante 10 minutos. Este precipitado se trató con 1 ml de ácido perclórico 1 M y se calentó a 70°C por 15 minutos en un Temp-Block (Lab-Line Instruments, Inc.). La muestra se centrifugó a 3,500 rpm 10 minutos y en el sobrenadante se determinó la concentración de ácidos nucleicos. El DNA se determinó por el método de Giles y Myers (61) y el RNA

por la reacción con orcinol (62).

El precipitado obtenido en el paso anterior se solubilizó con la adición de 1 ml de NaOH 1N, permitiendo de este modo medir las proteínas que permanecieron unidas al DNA.

EXTRACCION DE PROTEINAS-NO HISTONICAS DE LEUCOCITOS.

Esta fracción de proteínas se obtuvo de leucocitos aislados por el procedimiento ya descrito. Las extracciones se llevaron a cabo de manera similar como se describió para los núcleos de espermatozoides humanos, sin embargo, sólo se trabajó con las proteínas acídicas.

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS NO-HISTONICAS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA.

Las mezclas de proteínas acídicas nucleares: la fracción soluble en fenol correspondiente a los espermatozoides, y a las proteínas acídicas de los leucocitos se analizaron respectivamente por electroforésis en geles de acrilamida (63). El procedimiento usado está basado en la separación de los complejos de proteína-dodecilsulfato de sodio (64), (65) bajo condiciones en las cuales la distancia de migración de las proteínas individuales puede ser correlacionada con sus pesos moleculares (66).

Ambas fracciones se prepararon para su separación electroforética dializando las contra una solución reguladora de fosfato de sodio 0.01 M pH 7.2 conteniendo dodecilsulfato

de sodio 0.1%, 2-mercaptoetanol 0.07 M y sacarosa 0.25 M. La diálisis se llevó a cabo por 24 horas en 250 ml, de esta solución. Un escaso precipitado formado se eliminó por centrifugación a 15,000 rpm por 20 minutos.

Para preparar 12 geles de 10.5 cm de longitud con un diámetro de 6 mm, se combinaron los reactivos en las siguientes proporciones.

A 18 ml de agua destilada, se agregaron 10 ml de solución A (tris 18.17 g, 4 ml de solución de SDS al 10%, agua destilada y HCl 6 N suficiente para hacer un volumen final de 100 ml a pH 8.8), 11,7 ml de solución B (acrilamida 30 g, N,N',-metilenbisacrilamida 0.8 g y H₂O para 100 ml). Las soluciones combinadas se desaerearon con vacío a temperatura ambiente en un matraz de 1 litro por 60 min. Después se agregaron 0.12 ml de persulfato de amonio al 10% preparado en el momento de usarse y 0.01 ml de N, N, N', N',-tetrametiletilendianina (TEMED). La solución se mezcló y se llenaron los tubos hasta la marca de 10 ml, cubriéndose la superficie con 0.02 ml de solución 0.1% de SDS. La polimerización se efectuó en 45 min. La concentración final de acrilamida fue de 8.75%.

El gel superior de 0.5 cm se preparó a una concentración de acrilamida del 3% adicionando, a 6.5 ml de agua destilada 2.5 ml de solución C (tris 6 g, 4 ml de SDS al 10%, HCl a pH 6.8 y agua destilada para 100 ml), 1 ml de solución B (la cual

contiene la acrilamida) y 0.03 ml de persulfato de amonio al 10%, ya que no fue necesario desaerear esta solución, se agregó 0.01 ml de TEMED y se polimerizaron 0.15 ml de solución sobre el gel inferior en un tiempo aproximado de 2 horas.

Una vez que se llevó a cabo la polimerización del gel se adicionaron las proteínas no-histónicas a concentraciones de 240 ug para los espermatozoides y 300 ug para los leucocitos, ambas contenidas en un volumen de 200 ul de solución previamente mezclados con 100 ul de sacarosa al 50% conteniendo azul de bromofenol al 0.002%.

En otros geles se colocaron las siguientes proteínas: Citocromo C (P.M. 11700), mioglobina (P.M. 17800), ovoalbumina (P.M. 43000), albumina bovina (P.M. 68000) y B-galactosidasa (P.M. 130000) las cuales se utilizaron como estándares.

La cámara se llenó con una solución de Tris pH 8.4 conteniendo glicina 0.192 M y SDS al 0.1%.

La corriente necesaria para que las proteínas atraviesen el gel superior fue de 2 mA por gel y de 4 mA cuando entraron al gel inferior. La electroforesis se suspendió cuando el colorante indicador estuvo a 0.5 cm del extremo del gel, lo cual se logró después de 5 horas aproximadamente.

Los geles se sacaron de los tubos enfriando en un baño de hielo por 30 minutos e inyectando agua con ayuda de una jeringa. Se fijaron en ácido tricloroacético al 50% por 10 horas y se tificaron con solución de azul brillante de coomassie

al 0.05% en ácido tricloroacético al 50% por 5 horas. Para desteñir los geles se empleó una solución de ácido acético al 7%. Los patrones electroforéticos también se obtuvieron con un densitómetro Kipp & Zone.

FIJACION DE HORMONAS ESTEROIDES A HISTONAS Y A PROTEINAS
NO-HISTONICAS.

Para estudiar la capacidad de fijación de las hormonas esteroides a la fracción de histonas y a la fracción de proteínas no histónicas, tanto de leucocitos como de espermatozoides humanos, se emplearon preparaciones de proteínas aisladas y purificadas por los procedimientos descritos anteriormente.

La formación de los complejos de proteína-hormona en cada uno de los casos, se llevó a cabo bajo las condiciones descritas por Defer et al (67).

MEDIO DE INCUBACION.- Fracciones de 240 ug de proteína fueron incubadas con cada una de las siguientes hormonas marcadas: 17β -estradiol (act. Esp. 4.8 Ci/mmol), progesterona (Act. Esp. 4.2 Ci/mmol), y testosterona (Act. Esp. 5 Ci/mmol) a la concentración final de 6×10^{-8} M respectivamente.

La incubación se llevó a cabo por 3 horas a 4°C con agitación continua, en un medio constituido de cloruro de potasio 0.05 M, cloruro de magnesio 0.005 M, 2-mercapto-etanol 0.001 M y el esteroide, haciendo un volumen final de

200 ul.

ELECTROFORESIS.- Los complejos de proteína-esteroi de fueron separados por los métodos de electroforesis ya descritos, el volumen de 200 ul conteniendo la mezcla de reacción y las proteínas correspondientes se mezclaron con 100 ul de sacarosa al 50%, conteniendo azul de metileno al 0.02%, como colorante indicador en el caso de las histonas y azul de bromofenol al 0.002% en el caso de las proteínas no-histónicas. Simultáneamente, se corrieron controles tanto de proteínas como de hormonas tratados de manera similar a los complejos.

Al terminar la electroforesis los geles control con teniendo proteína se fijaron con ácido tricloroacético al 50% y tanto la tinción como la decoloración se hicieron de manera independiente para cada tipo de proteína como ya se describió anteriormente. Los otros geles se cortaron en fracciones de 2 a 3 mm utilizando un dispositivo especial para este tipo de geles, las rebanadas fueron colocadas de 2 en 2 en viales conteniendo 5 ml de solución centellante preparada con 2,5-difenilozazol al 0.4% y 1,4-bis (2-(5-feniloxazolil) benceno al 0.01% en tolueno recién destilado. Se dejaron extrayendo durante la noche y se contaron en un contador de centelleo líquido (Packard modelo 3390).

RESULTADOS

Los mejores resultados en la disociación de la cromatina de los núcleos de los espermatozoides humanos se obtuvieron cuando éstos núcleos se incubaron a 37°C por 2 horas en una solución amortiguadora de Tris 0.01 M pH 8 que contenía NaCl 0.6 M, 2-mercaptoetanol 0.2 M y urea 4 M.

El mismo procedimiento se aplicó para disociar la cromatina de los leucocitos, y esto permitió que las histonas presentes en ambas cromatinas fueran solubilizadas y extraídas con la adición de HCl a una concentración final de 0.25 N.

DISTRIBUCION CUANTITATIVA DE LAS PROTEINAS NUCLEARES DEL DNA Y DEL RNA DURANTE EL FRACCIONAMIENTO DE LAS PROTEINAS.

En la tabla 1 se presentan los resultados del análisis de cada una de las fracciones obtenidas durante el proceso de aislamiento y purificación de las proteínas nucleares del espermatozoide humano. Estos valores representan el promedio de tres experimentos, razón por la cual no se da su desviación estandar.

Como se puede observar, la mayor parte de las histonas se extrae con HCl 0.25 N, aunque parte de estas proteínas se disocia con cloruro de sodio 0.14 M (56). Combinando los resultados de estas dos fracciones, se obtiene una relación de histonas a DNA de 0.64, que resulta muy similar a la relación de 0.7 reportada por Marushige y Marushige (56) para la

cromatina de espermatozoide de toro.

Con respecto a las proteínas no-histónicas obtenidas en la fase fenólica, éstas fueron sometidas a diálisis exhaustiva contra ácido acético 0.05 M como se indica en Material y Métodos con el objeto de eliminar el fenol (0.003% final determinado espectrofotométricamente a 270 nm) ya que como se sabe, interfiere en la determinación colorimétrica de las proteínas (59).

El análisis cuantitativo de esta fracción, dió una relación de proteínas acídicas a DNA de 1.08. Todavía después de la extracción de los ácidos nucleicos con ácido perclórico 1 M queda un residuo de proteínas. Estas proteínas posiblemente son no-histónicas que están fuertemente unidas al DNA y que el fenol no es capaz de disociar del complejo, ya que la adición de NaOH 1 N permite extraer aproximadamente 31 ug de proteínas por 10^8 espermatozoides.

La cantidad de DNA encontrada corresponde a una recuperación del 110%, ya que mientras que nosotros encontramos que el espermatozoide tiene 3.3 pq de DNA, se sabe, que un núcleo diploide contiene 6 pq de DNA (68). Esta diferencia no es grande y puede deberse a error de tipo experimental.

El RNA representa el 1.45% con respecto al DNA, lo cual resulta dos veces más alto cuando se compara con los datos reportados en espermatozoide de toro, que han sido del 0.7% (57) y que en otros casos solamente había sido reportado

como trazas de RNA en este tipo de cromatina (69).

Recientemente, Paul y Duerksen (70) demostraron que el RNA aislado de la cabeza del espermatozoide de toro es de bajo peso molecular y que sometido a un campo electroforético migra de manera similar al RNA asociado a la cromatina de eritrocitos de pollo (caRNA). Esto nos sugiere que el RNA presente en el espermatozoide humano puede ser "caRNA" y que está asociado formando parte estructural de la heterocromatina.

Las fracciones puras de las proteínas básicas nucleares de estos dos tipos de cromatina se obtuvieron por filtración en gel en una columna de Bio-Gel P-10. Los resultados se muestran en la figura 5A donde se presenta el perfil de elución de las histonas del espermatozoide, las cuales se obtuvieron en un volumen de 16.8 ml. En la figura 5B se presenta el perfil de elución de las histonas de los leucocitos que se colectaron en un volumen de 16 ml.

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LAS HISTONAS.

Cuando las histonas totales se sometieron a una electroforésis en gel de acrilamida, estas proteínas se separaron en bandas bien definidas (fig. 6). Como se puede observar en estos patrones electroforéticos, en la cromatina del espermatozoide existe una población de proteínas más o menos homogénea cuyos pesos moleculares están comprendidos entre 11,300 y 14,800 Daltons ($\text{Dalton} = 1.67 \times 10^{-24} \text{ g}$) y

una sola banda de peso molecular de 18,600 (fig. 7).

Sin embargo en el leucocito existe una distribución electroforética diferente de estas proteínas y sus pesos moleculares van desde 11,200 hasta 20,000 daltons (figs. 6 y 7).

Estos datos concuerdan con lo que se ha reportado para las histonas de otras células somáticas, como eritrocitos y núcleos de timo de ternera (27) que presentan un número igual de bandas aunque hay pequeñas diferencias en la distribución electroforética.

PESOS MOLECULARES DE PROTEINAS NO-HISTONICAS.

La fracción de proteínas solubles en fenol es compleja, ya que comprende una mezcla de proteínas que difieren en tamaño y movilidad electroforética. Las mezclas de proteínas acídicas tanto de espermatozoides, como de leucocitos, se resolvieron en muchos de sus componentes gracias al uso de la electroforésis. (fig.8). La electroforésis en presencia de dodecilsulfato de sodio nos permitió separar las proteínas de acuerdo a sus pesos moleculares. La tinción con azul brillante de coomassie reveló la presencia de muchas proteínas con un amplio rango de pesos moleculares (figuras 9, 10 y 11).

Es importante señalar que los límites de los pesos moleculares de estas proteínas es grande y va desde los 10,000 daltons hasta 103,000 daltons.

El número de bandas de proteínas y sus intensidades

relativas fueron altamente reproducibles en las fracciones de proteínas solubles en fenol preparadas de estas dos fuentes.

La complejidad de las proteínas no-histónicas la indican el gran número de bandas que se muestran en estos patrones electroforéticos. Como se puede ver, (fig. 8) hay una diferencia muy marcada en el número de bandas y en la distribución de éstas, entre las proteínas no-histónicas de una célula sexual, como lo es el espermatozoide, y una célula somática como en el caso del leucocito. En el espermatozoide se identificaron 23 bandas y en el leucocito se detectaron únicamente 15 bandas.

INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS NUCLEARES Y HORMONAS ESTEROIDES.

Es importante señalar que cuando las histonas que se incubaron con las diferentes hormonas se sometieron a electroforesis, no se encontró ninguna fijación de esteroides a este tipo de proteínas. Al analizar la radioactividad contenida en cada una de las rebanadas del gel, se encontró que los esteroides no migran bajo las condiciones de corriente eléctrica empleadas (dirección catódica).

Los controles de las histonas (fig. 6) indican que no existe variación en la distribución de estas proteínas.

En las figuras 9, 10 y 11 se presentan los resultados que se obtuvieron al incubar las proteínas no-histónicas

aisladas de los espermatozoides y de los leucocitos, en presencia de 17β -estradiol (H^3), progesterona (H^3), y testosterona (H^3) a concentraciones finales de 6×10^{-8} M.

En la separación electroforética de las proteínas acídicas que se incubaron con 17β -estradiol se encontró que esta hormona se fija selectivamente a una banda de proteína de peso molecular de 75,000 en el caso del espermatozoide, mientras que no se fija de manera importante a las proteínas del leucocito (fig. 9).

La fijación específica del estradiol que nosotros encontramos coincide con las observaciones de Defer y Col (67), quienes encontraron que bajas concentraciones de estradiol, del orden de 10^{-9} ó 10^{-8} M producen una unión específica a proteínas no-histónicas del hígado de la rata. Si la concentración de estradiol se incrementa, se produce una fijación inespecífica. Esto se demostró por dichos autores al incubarse previamente las proteínas no-histónicas con corticosterona, seguida de una incubación con estradiol 10^{-7} M.

Cuando se incubaron las proteínas no-histónicas con progesterona (H^3) no hubo ninguna fijación de esta hormona a proteínas de espermatozoide, ni a proteínas acídicas de leucocitos (fig. 10). Por el contrario, la testosterona se une a una banda de proteína de peso molecular de 66,000 en la cual se localiza la mayor parte de la radiactividad (fig. 11).

La testosterona no se fija a la fracción de proteínas no-histónicas de los leucocitos, ya que como se observa en la

figura 11, esta hormona queda libre y migra junto con el frente.

T A B L A 1

DISTRIBUCION CUANTITATIVA DE LAS PROTEINAS NUCLEARES, DNA Y RNA DURANTE EL FRACCIONAMIENTO DE LAS PROTEINAS.

EXTRACCION	PROTEINAS	DNA	RNA
Proteínas solubles en NaCl 0.14 M	78+	—	—
Proteínas solubles en HCl 0.25 M	133	—	—
Proteínas solubles en fenol	204	—	—
Proteínas solubles en NaOH IN	31	—	—
Acido Perclórico 1 M	—	331	5

+Los resultados están expresados en $\mu\text{g}/10^8$ espermatozoides.

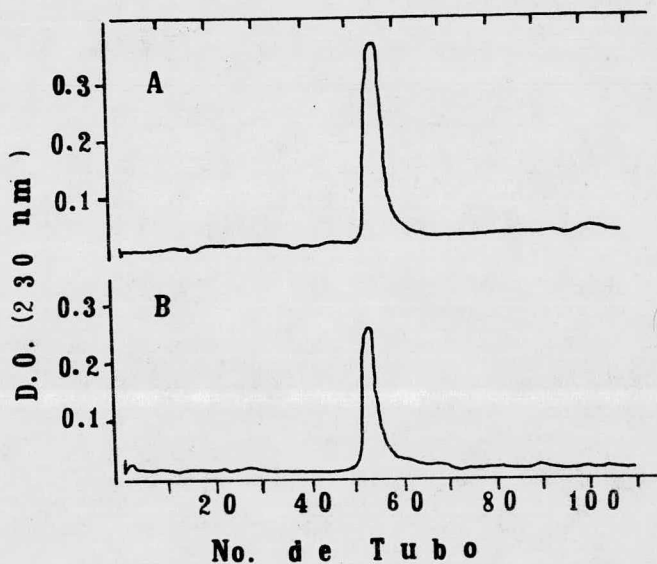


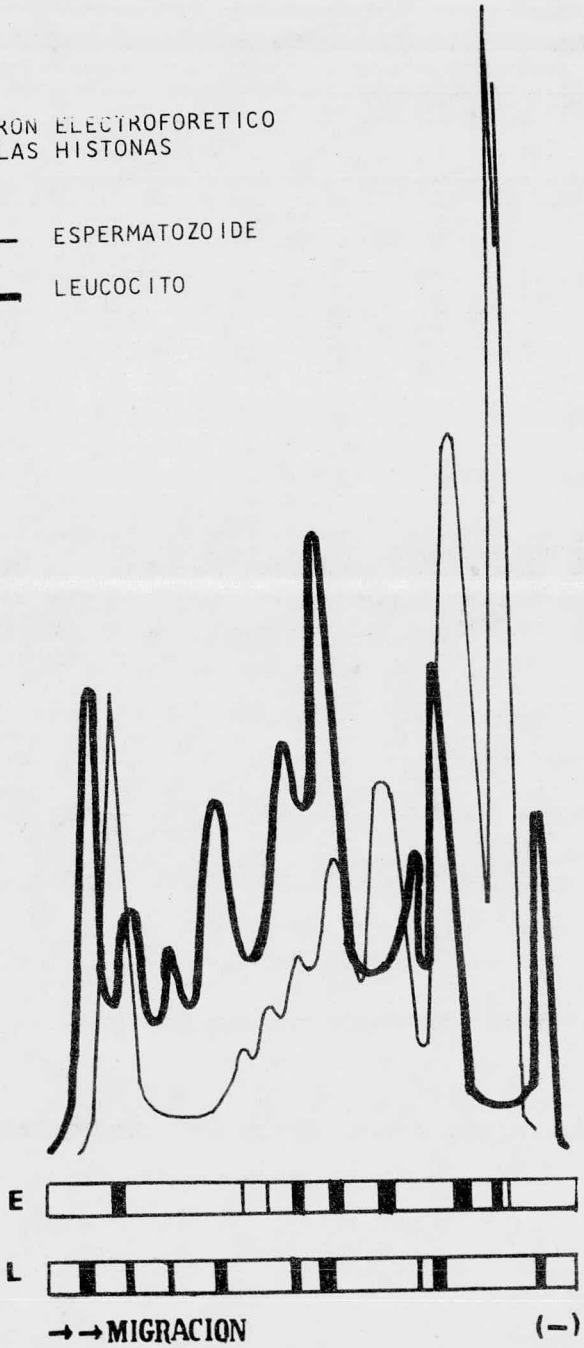
Fig. 5

Perfiles cromatográficos de las histonas extraídas con HCl 0.25 M (columna de Bio-Gel P-10 de 1.5 x 25 cm).
 A. Histonas de espermatozoide humano.
 B. Histonas de leucocitos.
 Las histonas fueron liofilizadas y preparadas para su análisis electroforético.

Fig. 6

PATRON ELECTROFORETICO
DE LAS HISTONAS

— ESPERMATOZOIDE
— LEUCOCITO



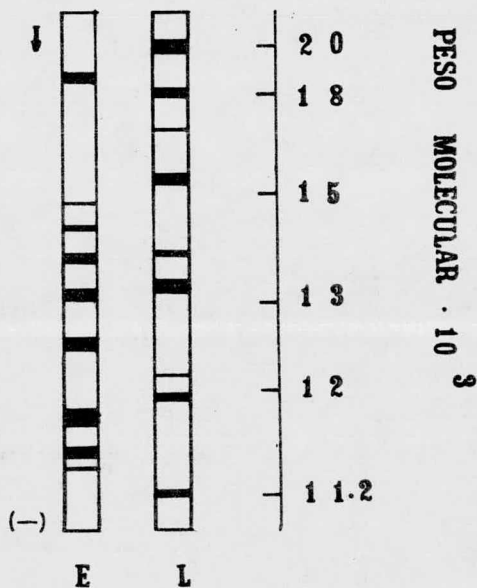


Fig. 7

Perfiles electroforéticos de las histonas del espermatozoide (E) y del leucocito (L). Los pesos moleculares aproximados se determinaron correlacionando la movilidad electroforética y el logaritmo del peso molecular de diferentes proteínas marcadoras.

PATRON ELECTROFORETICO DE LAS PROTEINAS NO HISTONICAS

— ESpermatozoide
— LEUCOCITO

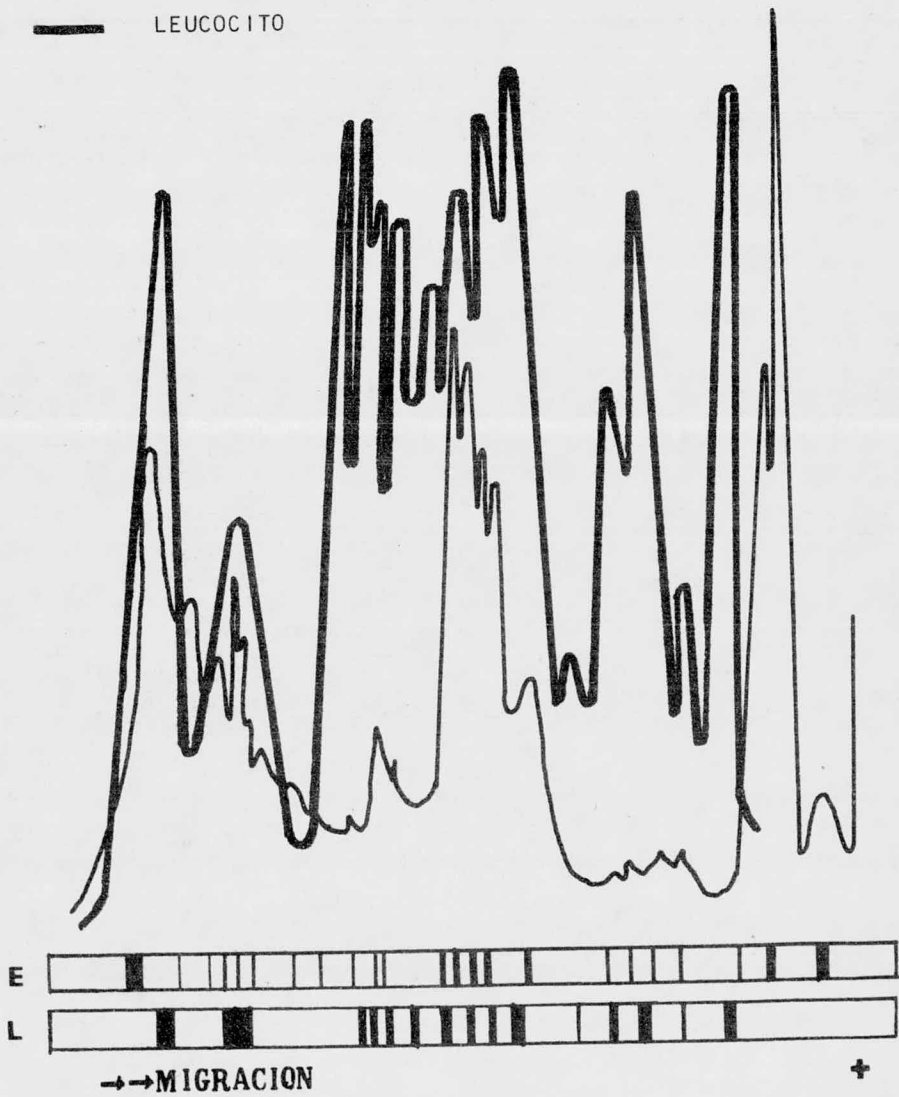


Fig. 8

Fig. 9

INTERACCION DE LAS PROTEINAS NO HISTONICAS CON EL ESTRADIOL

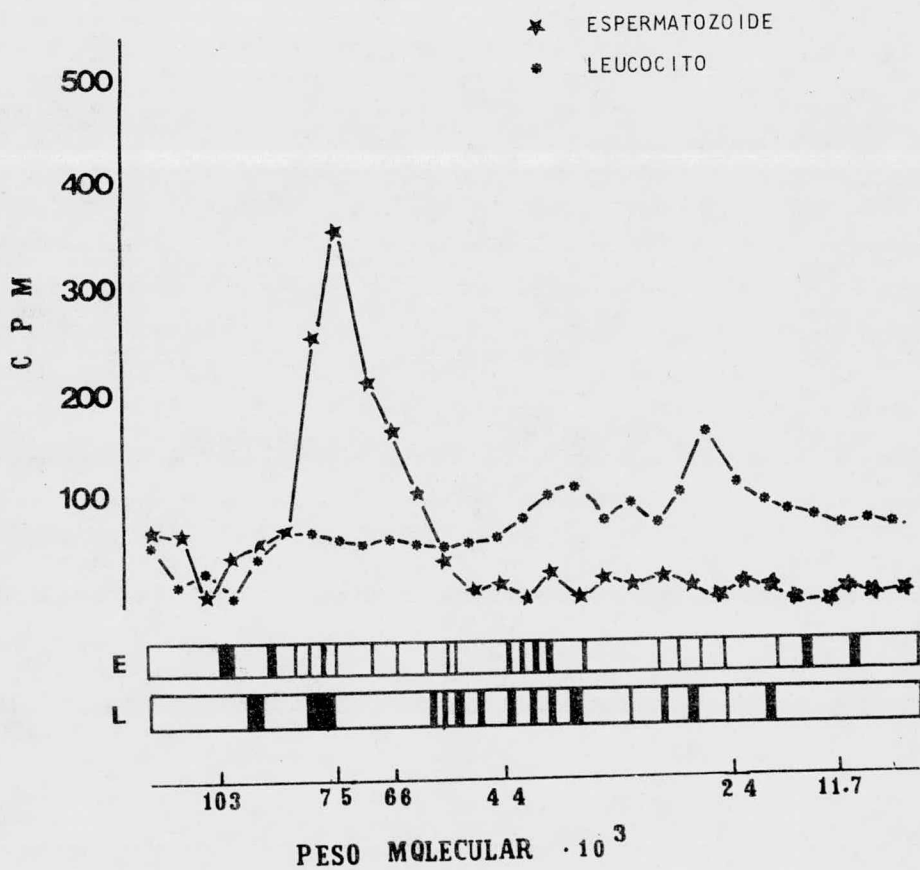


Fig. 10

INTERACCION DE LAS PROTEINAS NO HISTONICAS CON LA PROGESTERONA

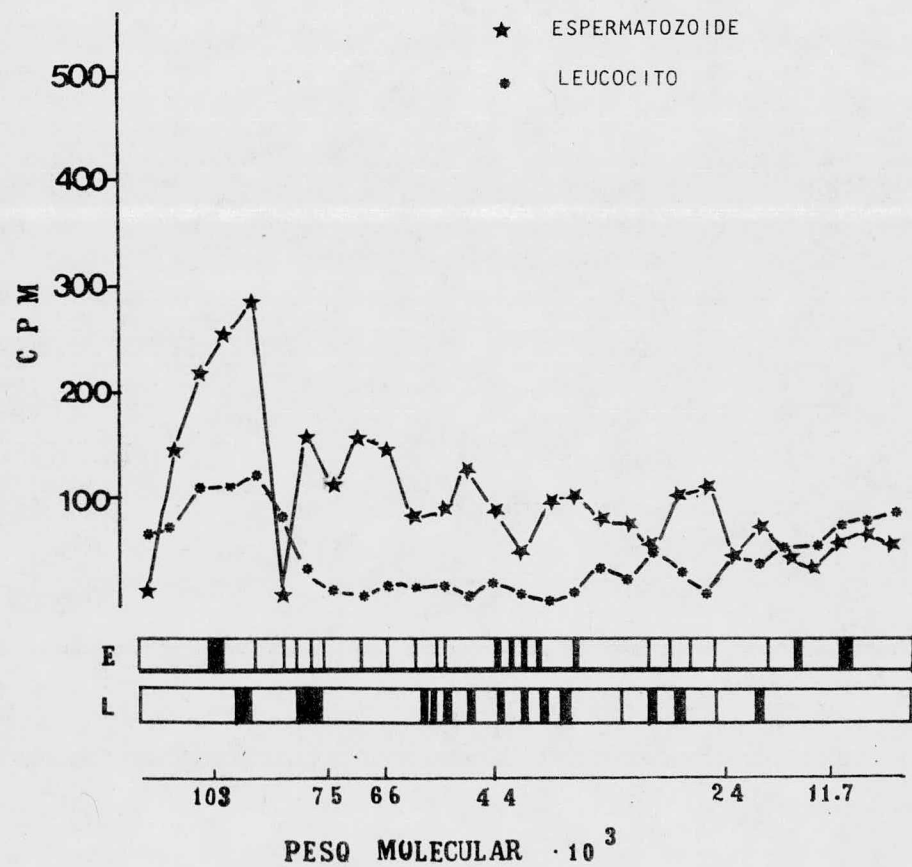
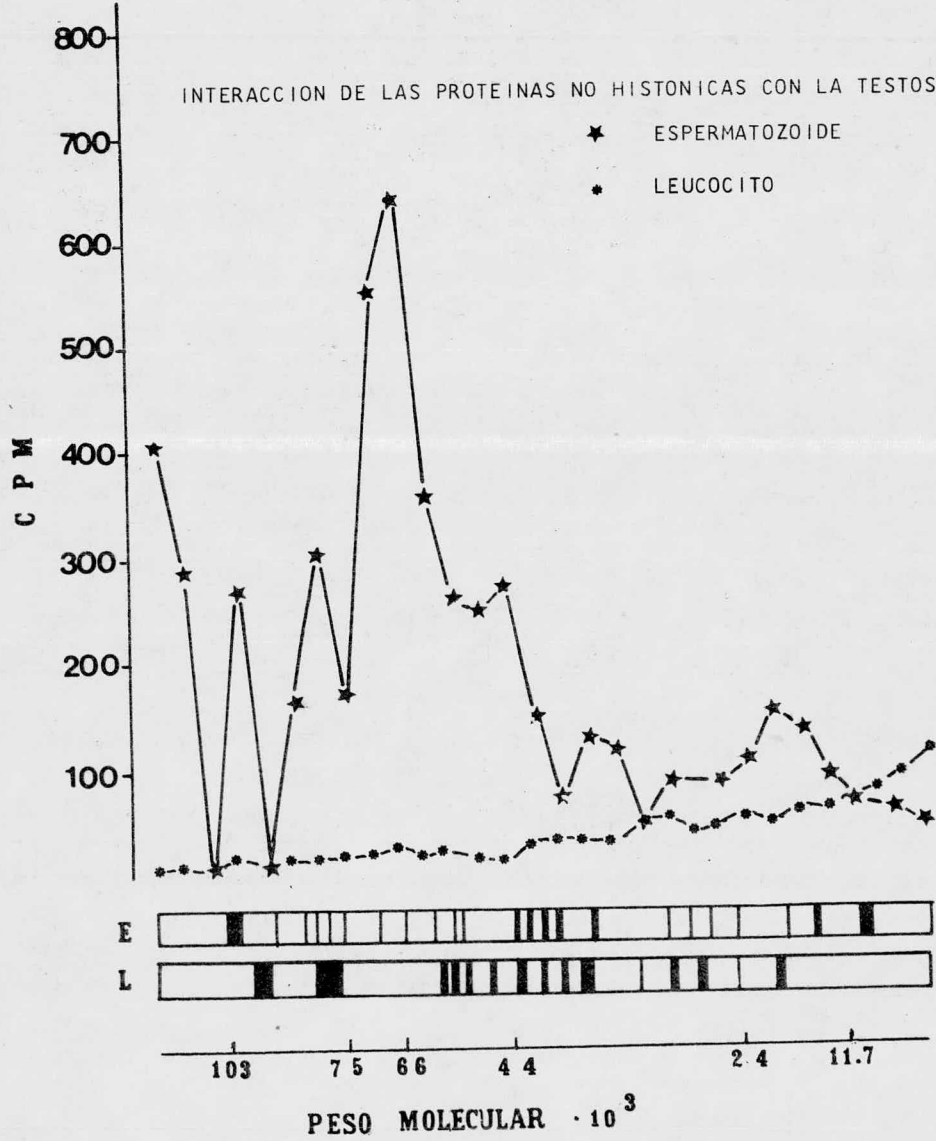


Fig. 11

INTERACCION DE LAS PROTEINAS NO HISTONICAS CON LA TESTOSTERONA

★ ESPERMATOZOIDE
• LEUCOCITO



DISCUSION Y CONCLUSIONES

En el desarrollo de este trabajo tuvimos algunas dificultades para aislar y purificar las proteínas nucleares del espermatozoide debido a la estructura de tipo queratinoide de su cabeza y su consecuente resistencia a varios agentes químicos. Afortunadamente, estos problemas se resolvieron bien con la utilización de cloruro de sodio 0.6 M y mercaptoetanol 0.2 M en presencia de urea 4 M.

La filtración en columna nos permitió obtener las fracciones puras de histonas (fig. 5), ya que estas proteínas quedan libres de sales y la contaminación con proteínas no-histónicas es nula.

Los pesos moleculares que nosotros reportamos aquí tanto para las histonas del espermatozoide como para las histonas del leucocito humano (fig. 7) están dentro de los límites de pesos moleculares reportados por Panyim y Col (22) quienes han caracterizado a las histonas de células somáticas de varios vertebrados y reportan pesos moleculares de 10,000 a 25,000 daltons. Nosotros encontramos que los pesos moleculares de las histonas de los leucocitos van desde 11,200 hasta 20,000 daltons y de 11,300 a 18,600 daltons para las histonas del espermatozoide.

Las proteínas no-histónicas del espermatozoide cuyos pesos moleculares van desde 10,000 hasta 163,000 daltons y las

las proteínas del leucocito que van de 20,000 a 95,000 (fig. 9, 10, 11) demuestran que existe una heterogeneidad en las proteínas del espermatozoide y del leucocito tanto en el número como en el valor del peso molecular. Estos valores son altos y están de acuerdo con los datos obtenidos por otros investigadores, puesto que se ha reportado en células Hela que estas proteínas tienen pesos moleculares entre 15,000 y 180,000 daltons (60). En algunos microorganismos como Physarum polycephalum se han detectado, por electroforésis, más de 100 proteínas acídicas a las cuales además de sus funciones reguladoras, se les ha atribuido papeles enzimáticos, estructurales y cinéticos (71).

Un hecho importante que nosotros observamos en estos resultados es que el espermatozoide posee una población de proteínas básicas cuyos pesos moleculares están comprendidos entre 11,300 y 14,800 daltons, a diferencia del leucocito que presenta una distribución diferente de sus histonas.

La presencia de este grupo de proteínas básicas en el espermatozoide humano con características similares sugiere que posiblemente, el mecanismo de reemplazamiento de las histonas somáticas por un tipo de histonas más básicas durante la diferenciación de la espermátida en espermatozoide también ocurre en el humano, tal como lo han descrito Gledhill y col (48) para el espermatozoide de toro y que ha sido

bien demostrado por métodos citoquímicos en otras especies de animales como ratones (72) y ratas (73).

Sin embargo este fenómeno no ocurre en otras especies como en los equinodermos (74) (75) y moluscos (76) en donde algunas histonas somáticas típicas aparecen en sus espermatozoides, variando este grado de conservación histórica de especie a especie. En aquellas especies en donde predominan las histonas somáticas, la condensación de la cromatina es limitada (76).

En estos dos tipos de células que nosotros hemos seleccionado para nuestro estudio encontramos ciertas diferencias entre las proteínas que están asociadas a la cromatina. Estas diferencias pueden deberse a que la información genética codificada en el DNA es única para cada especie, puesto que como lo muestran estos resultados aún dentro del mismo organismo, las proteínas no-histónicas son diferentes tanto en número como en su comportamiento electroforético (fig. 6 y 8).

Aunque todas las células de los organismos contienen el mismo DNA (45), la variación en el complemento de las proteínas no-histónicas de los diferentes tipos celulares parece estar dada de acuerdo con la utilización selectiva de la información genética de cada tipo de célula.

Se piensa que generalmente las hormonas esteroideas

se unen a sus receptores específicos del citosol y que los complejos así formados se transfieren al interior del núcleo. Sin embargo, se ha reportado una unión directa del estradiol al núcleo en útero de ternera (77) y en hígado de pollo (78) y de corticosterona en timo de ternera (79), aunque existen los receptores citoplásmicos en cada una de las células de estos tejidos blanco (80). Además los núcleos aislados de varios tejidos son capaces de fijar hormonas esteroides en ausencia de citosol y en algunos casos, son capaces de responder a hormonas por una modificación del metabolismo de los ácidos nucleicos (81).

Como se sabe, la síntesis de algunas fracciones específicas de proteínas del oviducto de pollo y del útero de rata es influenciada por hormonas, tales como progesterona y 17β -estradiol respectivamente, las cuales estimulan la síntesis de RNA en dichos tejidos blanco (42) (43).

Frenster (82), ha sugerido que existe una estrecha correlación entre los ligandos que se unen a cadenas dobles de DNA y aquéllos que inhiben la síntesis de RNA. Por el contrario, los ligandos que tienden a unirse a cadenas sencillas de DNA como ocurre con la testosterona y el estradiol (82), incrementan la síntesis de RNA al favorecer la separación de las cadenas que debe ocurrir para que la transcripción se efectúe.

Cuando nosotros estudiamos la interacción de las histonas y las proteínas no-histónicas con algunas hormonas esteroideas; 17β -estradiol (H^3), progesterona (H^3) y testosterona (H^3) no observamos ninguna fijación de los esteroideos a los dos tipos de proteínas básicas estudiados, ni a la fracción de proteínas no-histónicas de los leucocitos (fig. 9, 10, 11). En las proteínas no-histónicas del espermatozoide hubo fijación de 17β -estradiol a una banda de proteína de peso molecular de 75,000 D (fig. 9) y de testosterona a una proteína de peso molecular de 66,000 daltons (fig. 11).

Nuestros resultados con las histonas, concuerdan con lo reportado por Defer y Col (67) ya que estos investigadores no observaron ninguna fijación de 17β -estradiol, ni de cortisol a histonas de hígado de rata. Sin embargo otros autores han reportado que el 17β -estradiol es capaz de unirse "in vitro" a las histonas ricas en arginina, más que a las fracciones ricas en lisina (83) aunque en varios casos, se ha demostrado que la preparación de histonas puede estar contaminada con proteínas no-histónicas (84) y esto sería suficiente para explicar la unión observada.

El hecho de que nosotros no hallamos observado fijación de progesterona a ninguna de las proteínas del espermatozoide y del leucocito, se puede deber a la ausencia del receptor citoplásmico, ya que es uno de los requerimientos para que

la fijación de esta hormona se lleve a cabo (41), (45), (85).

Una vez que se forma el complejo progesterona-receptor es importante controlar la temperatura, puesto que se ha demostrado (86) que se requiere una temperatura de 25° C a 37° C para que este complejo entre al núcleo. En el caso del receptor de progesterona del oviducto de pollo, no parece requerir de esta temperatura para el proceso sea completo (86).

Spelsberg y col (40) han demostrado con cromatina reconstituidas que son las proteínas no-histónicas las responsables de la fijación del complejo progesterona-receptor.

Jensen y De Sombre (80), han aislado núcleos de útero de rata previamente incubado con estradiol (H^3), así como también en útero de ratas tratadas con estradiol y han encontrado que la radiactividad esta unida a proteínas que tienen las mismas propiedades que el receptor citoplásmico (estereoespecificidad similar para el estradiol, constante de unión, fijación de hormona dependiente de grupos sulfidrilo y especificidad de tejido (40) (87). Esto sugiere que la proteína que fija estrógenos en el núcleo deriva del receptor de estrógenos en el citoplasma (88).

Basados en los datos anteriores y en los resultados recientes de Hernández y col (89) quienes han demostrado la presencia de un receptor citoplásmico para estradiol en el espermatozoide humano, podemos postular que las proteínas

no-histónicas, que se sintetizan en el citoplasma (90) de la espermátida y que se sabe se acumulan en pozas estables (91) sean las proteínas que seleccionen a las hormonas, formando complejos que migren al núcleo en el momento de la transición de la espermátida en espermatozoide, ya que se ha demostrado que hay una secreción testicular directa de 17β -estradiol, estrona y testosterona en el humano (92). Sin embargo las proteínas no-histónicas podrían representar solamente una etapa en la fijación de las hormonas esteroides al material genético. Esto no excluye que el verdadero receptor que dispare la síntesis de RNA en el momento de la fecundación del óvulo pueda ser algún tipo de histona o el DNA mismo, siendo las proteínas no-histónicas las fijadoras transitorias de hormonas dando, por ejemplo, la especificidad de la unión que podría ocurrir finalmente con otras macromoléculas nucleares.

De todo esto, podemos concluir que aunque la presencia de las histonas ricas en lisina y arginina no es indispensable en los espermatozoides de todas las especies, uno de los papeles de estas histonas en el espermatozoide es el de empaquetar el material genético en un volumen pequeño, resultando este empaquetamiento en una forma hidrodinámica más eficiente durante la fecundación, así como también en la protección del material genético contra la acción de algunas en

zimas como en el caso de la desoxirribonucleasa. Se ha medido la actividad de esta enzima sobre los núcleos de timo de ternera después de la adición de histonas (93) y se ha encontrado que el efecto inhibitorio más importante lo presentan las histonas con un alto contenido de lisina y arginina ya que estas proteínas pueden formar enlaces entrecruzados estabilizando de este modo las cadenas de DNA (34) (94).

Esto se ha observado en núcleos intactos así como también en la cromatina extraída en forma soluble, y en los núcleos de los cuales se han aislado tanto las histonas ricas en lisina como las histonas ricas en arginina (93).

El fuerte empaquetamiento del DNA ha sido sugerido como resultado de la observación de los núcleos espermáticos por diferentes métodos como son difracción de rayos X (95) comportamiento hidrodinámico (96), determinación de masa seca (97), etc., y se sabe que la fibra unitaria de cromatina en el espermatozoide de toro y humano consiste de una cadena de DNA de doble hélice con una relación de empaquetamiento de 55:1.

Si 55 equivalentes de longitud de DNA se empaquetan en cada unidad de longitud de la fibra de cromatina, esta fibra por necesidad debe contener 2 órdenes de superhelicoididad.

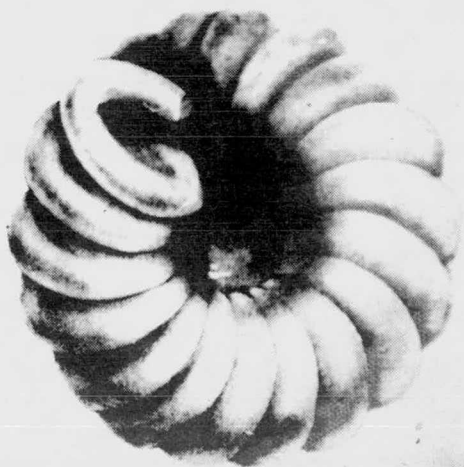
Recientemente Bahr (68) determinó los siguientes parámetros:

- 1.- Longitud de la fibra de la respectiva cromátida 135 - 723 μm .
- 2.- Cantidad de DNA en una doble hélice con β conformación 1.92 $\times 10^6$ daltons.
- 3.- Masa calculada = 3.14×10^{-18} g/ μm de DNA.
- 4.- Diámetro efectivo = 14.4 A°
- 5.- Contenido de DNA por núcleo diploide humano = 6 pg.

Con estos parámetros Bahr calculó que un DNA de doble hélice, envuelto y estabilizado por polipéptidos con β -conformación, ocupa la periferia de un super enrollamiento de 80 A° de diámetro. Este super enrollamiento contiene aproximadamente 190 A° de DNA por vuelta. Un segundo orden de super enrollamiento tendrá un diámetro de 200 A° ; (aquí el primer super enrollamiento ocupa la periferia) y además una distancia de 380 A° del primer super enrollamiento, tendrá por lo tanto 3420 A° de DNA (a continuación se presentan algunos modelos de super enrollamiento de la cromatina).



1



2

Es posible que esta compleja estructura del material genético del espermatozoide humano dependa: 1° de la presencia en él de un tipo especial de proteínas básicas y acídicas, 2° de la presencia de una población mayor de grupos SH, que durante la maduración nuclear de la célula espermática forma enlaces disulfuro (98) y 3° por un contenido mayor de DNA satélite y de secuencias altamente repetitivas, localizadas en ciertas regiones específicas y no a todo lo largo del genoma (89).

En los experimentos aquí descritos, nosotros no podemos excluir de las proteínas no-histónicas la presencia del complejo citoplásmico que haya migrado al núcleo del espermatozoide y sufrido modificaciones.

Es posible que las proteínas no-histónicas jueguen un papel como receptores citoplásmicos y que además tengan una función en la retención selectiva de las hormonas (99) en la transferencia de la hormona al núcleo.

BIBLIOGRAFIA

1. Comings, D. E., and Okada, T. A.; *Exptl. Cell Res.*, 62: 293 (1970).
2. Comings, D. E.; *J. Cell Biol.*, 35: 699 (1967).
3. Bonner, J., Dahmus, M. E., Fambrough, D. Huang, R. C., Marushige, K., and Tuan, D. Y. H.; *Science*, 159: 47 (1968b).
4. Kamiyama, M., and Wang, T.Y.; *Biochim. Biophys. Acta*, 228: 563 (1971).
5. Mirsky, A. E.; *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 68: 2945 (1971).
6. Fleming, W.; *Zellsubstanz, Kern and Zelltheilung Vogel, Leipzig* (1882).
7. Mirsky, A. E., and Ris. H.; *J. Gen. Physiol.*, 34: 475 (1951).
8. Heitz, E.; *Ber Deut. Botan Ges.*, 47: 274 (1929).
9. Cooper, K.W.; *Chromosoma*, 10: 535 (1959).
10. Brown, S.W., and Chandra, H.S.; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 70: 195 (1973).
11. Hess, O., and Meyer, G.F.; *J. Cell Biol.*, 16: 527 (1963).
12. Frenster, J.H.; *Cancer Res.*, 31: 1128 (1971).
13. Frenster, J.H.; and Herstein, P.R.; *New Eng. J. Med.*, 288: 1224 (1973).
14. Frenster, J.H., Allfrey, V.G., and Mirsky, A.E.; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 50: 1026 (1963).
15. Littau, V.C., Allfrey, V.G., Frenster, J.H., and Mirsky, A.E.; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 52: 93 (1964).
16. Frenster, J.H.; *Nature*, 206: 680 (1965b).

17. Klevecz, R.R. and Hsu, T.C.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 52: 811 (1964).
18. Yunis, J.J., and Yasmineh, W.G.; Science, 174: (4015) 1200 (1971).
19. Johns, E.W., "Histones and Nucleohistones" (D.M.P. Phillips, ed.) pp 1-83 Plenum Press, New York (1971).
20. Stedman, E., and Stedman, E.; Nature, 166: 780 (1950).
21. Panyim, S., and Chalkley, R.; Arch. Biochem. Biophys., 130: 337 (1969a).
22. Panyim, S., Bilek, D., and Chalkley, R.; J. Biol. Chem., 246: 4206 (1971).
23. Gurley, L.R., Walters, R.A., and Tobey, R.A.; J. Cell Biol., 60: 356 (1974).
24. Hnilica, L.S.; The structure and Biological Functions of Histones, Chem. Rubber. Press, Cleveland, Ohio (1972).
25. Shih, T.Y., and Bonner, J.; J. Mol. Biol., 48: 469 (1970a).
26. Olson, M.O.J., Sugano, N., Yeoman, L.C., Johnson, B.R., Jordan, J., Taylor, C.W., Starbuck, W. C. and Busch, H.; Physiol. Chem. Phys., 4: 10 (1972).
27. Shih, T.Y., and Fasman, C.D.; Biochemistry, 10: 1675 (1971).
28. Bradbury, E.M., Cary, P.D., Crane-Robinson, C., Riches, P.L. and Johns E. W.; Nature New Biol., 233: 265 (1971).
29. Ansevin, A.T., and Brown, B.W.; Biochemistry, 10: 1133 (1971).
30. Li, H.J., and Bonner, J.; J. Biochem., 10: 1461 (1971).
31. Clark, R.J. and Felsenfeld, G.; Nature New Biol., 240: 226 (1972).
32. Itzhaki, R.F.; Biochem. J., 125: 221 (1971).
33. Simpson, R.T.; Biochemistry, 11: 2003 (1972).
34. Smythies, J.R., Benington, F., Bradley, R.J., Morin, R.D., and Romine, Jr. W.O.; J. Theor. Biol., 47: 309 (1974).

35. Adler, K., Beyreuther, K., Fanning, E., Geisler, N., Gronenborn, B., Klemm, A., Müller-Hill, B., Pfahl, M., and Schmitz, A.; *Nature*, 237: 322 (1972).
36. Teng, C.S., Teng, C.T., and Allfrey, V.G.; *J. Biol. Chem.*, 246: 3597 (1971).
37. Busch, H.; *Histones and other nuclear proteins*. pp. 227, Academic Press, New York (1965).
38. Ursprung, H., Smith, K.D., Sofer, W.H. and Sullivan, P.T.; *Science*, 160: 1075 (1968).
39. Monesi, V.; *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 13: 1 (1971).
40. Spelsberg, T.C., Steggle, A. W., and O'Malley, B.W.; *J. Biol. Chem.*, 246: 4188 (1971a).
41. Edelman, I.S.; *J. Steroid Biochem.*, 6: 147 (1975).
42. O'Malley, B.W., Toft, D.O. and Sherman, M.R.; *J. Biol. Chem.*, 246: 117 (1971b).
43. Cohen, M.E., and Hamilton, T.H.; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 72: (11) 4346 (1975).
44. O'Malley, B.W., Spelsberg, T.C., Schader, W.T., Chytil, F., and Steggle, A. W.; *Nature*, (London) 235: 141 (1972b).
45. Jensen, E.V., Susuki, Y., Haroashima, T., Stumpf, W., Jungblut, P., and DeSombre, E.R.; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 59: 632 (1968).
46. Rosen-Runge, E.C.; *Biol. Rev.*, 37: 343 (1962).
47. Hafez, E.S.E.; *Reproduction in Farm Animals*, Third Edition LEA & FEBIGER, Philadelphia (1974).
48. Gledhill, B.L., Gledhill, MP. Rigler, R. Jr., and Ringertz, N.R.; *Exptl. Cell. Res.*, 41: 652 (1966).
49. Ringertz, N. R., Gledhill, B.L., and Darzynkiewicz, Z.; *Exptl. Cell Res.*, 62: 204 (1970).
50. Marushige, K., and Dixon, G.H.; *Develop. Biol.*, 19: 397 (1969).
51. Hicks, J.J., and Rosado, A.; *Adv. in Steroid Biochem. & Pharmacol.*, 5: 263 (1976).
52. Hernández-Pérez, O.; *Comunicación Personal*.

53. Dawson, R.M.C. Elliott, D.C., Elliott, W.H. and Jones, K.M., Data for Biochemical Research, Second Edition. Oxford University Press, Great Britain (1969).
54. Hernández-Montes, H., Iglesias, G., and Mújica, A.; Exptl. Cell Res., 76: 437 (1973).
55. Sosa, A., Calzada, L., y Rosado, A.; Gaceta Médica de México, 108: (6). 385 (1974).
56. Marushige, Y., and Marushige, K.; Biochim. Biophys. Acta, 340: 498 (1974).
57. Wray, W., and Stubblefield, E.; Anal. Biochem., 38: 454 (1970).
58. Panyim, S., and Chalkley, R.; Arch. Biochem. Biophys., 130: 337 (1969).
59. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.S.; J. Biol. Chem., 193: 265 (1951).
60. Le-Stourgeon, W.M., Nations, C., and Rush, H.P.; Arch. Biochem. Biophys., 159: 861 (1973).
61. Giles, K.W. and Myers, A.; Nature, 206: 93 (1965).
62. Lin, R.I -San and Schjeide, O.A.; Anal Biochem., 27: 473 (1969).
63. Laemli, U.K.; Nature, 227: 680 (1970).
64. Summers, D.F., Maizel, J.V., and Darnell, J.E., Jr.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 54: 505 (1965).
65. Shapiro, A.L., Viñuela, E., and Maizel, J.V.; Biochem. Biophys, Res. Commun., 28: 815 (1967).
66. Weber, K., and Osborn, M.; J. Biol. Chem., 244: 4406 (1969).
67. Defer, N., Dastuge, B., and Kruh, J.; Biochimie, 56: (4) 559 (1974).
68. Bahr, G.F.; Exptl. Cell Res., 62: 39 (1970).
69. Bhargava, P.M., Bishop, M.W.H., and Work, T.S.; Biochem. J., 73: 242 (1959).

70. Paul, I.J., and Duerksen, J.D.; *Molec. Cell Biochem.*, 9: (1) 9 (1975).
71. Cameron, I.L., Jeter, J.R. Jr.; *Acidic Proteins of the Nucleus*. Academic Press, New York (1974).
72. Monesi, V.; *Exptl. Cell Res.*, 36: 683 (1964).
73. Lison, L.; *Acta Histochem.*, 2: 47 (1955).
74. Subirana, J.A., and Palau, J.; *Exptl. Cell Res.*, 53: 471 (1968).
75. Subirana, J.A.; *Exptl. Cell Res.*, 63: 253 (1970).
76. Subirana, J.A., Cozcolluela, C., Palau, J., and Unzeta, M.; *Biochim. Biophys. Acta*, 317: 364 (1973).
77. Alberga, A., Massol, N., Raynaud, J.P., Baulieu, E.E.; *Biochemistry*, 10: 3835 (1971).
78. Mester, J., and Baulieu, E.E.; *Biochem. Biophys. Acta*, 261: 236 (1972).
79. Abraham, A.D., and Sekeris, C.E.; *Biochim. Biophys. Acta* 297: 142 (1973).
80. Jensen, E.V., and DeSombre, E.R.; *Annu. Rev. Biochem.*, 41: 203 (1972).
81. Beato, M., Schmid, W., and Sekeris, C.E.; *Biochim. Biophys. Acta*, 263: 764 (1972).
82. Frenster, J.H.; *Nature (London)*, 208: 1093 (1965e).
83. Sunaga, K., and Koide, S.S.; *Arch. Biochim. Biophys.*, 122: 670 (1967a).
84. Tsai, Y., and Hnilica, L.S.; *Biochim. Biophys. Acta*, 238: 277 (1971).
85. Williams, D., and Gorski, J.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45: 258 (1971).
86. McGuire, W.L., Huff, K., and Chamness, G.C.; *Biochemistry*, 11: 4562 (1972).

- 87.- Puca, G.A., and Bresciani, F.; *Nature (London)*, 218: 967. (1968).
- 88.- Shymala, G., and Gorski, J.; *J. Biol. Chem.*, 244: 1097 (1969).
- 89.- Hernández-Pérez, O., Bello, Ma., y Rosado, A.; en preparación.
- 90.- Chet, I., and Rusch, H.P.; *Biochim. Biophys. Acta.*, 224: 620 (1970).
- 91.- Stein, G.S., and Baserga, R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44: 218 (1971).
- 92.- Longcope, Ch., Widrich, W., and Sawin, C.T.; *Steroid*, 20: (4) 439 (1972).
- 93.- Mirsky, A.E., Silberman, B., and Panda, N.C.; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 69: (11) 3243 (1972).
- 94.- Smythies, J.R., Benington, F., Bradley, R.J., Morin, R. D. and Romine, Jr. W.O.; *J. Theor. Biol.*, 47: 383 (1974).
- 95.- Bram, S., and Ris, H.; *J. Molec. Biol.*, 55: 325 (1971).
- 96.- Ohba, Y.; *Biochim. Biophys. Acta* 123: 76 (1966a).
- 97.- Dupraw, E.J., and Bahr, G.F.; *Acta Cytol.*, 13: 188 (1969)
- 98.- Calvin, H.I., and Bedford, J.M.; *J. Reprod. Fert., Suppl.* 13: 65 (1971).
- 99.- Beato, M., and Fiegelson, P.; *J. Biol. Chem.*, 247: 7890 (1972).