

01684



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**MECANISMOS DE ESTRUCTURACION DE LA
CROMATINA DEL ESPERMATOZOIDE DE
TORO**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS VETERINARIAS
REPRODUCCION**

PRESENTADA POR

GISELA FUENTES MASCORRO



**DIRECTOR DE TESIS
DR. ADOLFO ROSADO GARCIA**

MEXICO, D. F.

2000

278799



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DECLARACION.

La tesis es el resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indica lo contrario, dándose reconocimiento a las fuentes de información consultadas.

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



M. en C. Gisela Fuentes Mascorro

DEDICATORIAS

El presente trabajo está dedicado a mi Familia y de manera muy especial:

“ A todos aquellos a quienes su capacidad de asombro, ha llevado a explorar esos pequeños detalles, con los que se abre la puerta a grandes universos y que han hecho de ellos su razón de ser”.

A:

Mi Abuela Sra. Juana López Centeno qepd

La más querida de todas mis Hermanas:

Lic. En Educación Básica María de Lourdes Fuentes Mascorro qepd, Por que tú presencia será siempre necesaria.

Mi Madre

Profesora. María Engracia Mascorro López.

Por que siempre eres un regazo que calma las tormentas, que da fortaleza, que impulsa, protege, corrige y permite tener un apoyo a toda prueba. Gracias

Mis Hermanos y Cuñadas.

CD Manuel Rogelio Fuentes Mascorro y Lic. Clotilde García. Esperando que el desperdicio de talento siga valiendo la pena.

MVZ Ismael Fuentes Mascorro y M. en C. Yolanda Gutiérrez. Por que paso a paso vamos cubriendo nuestras metas.

Mis alumnos

Por permitirme distraerme de la atención que debo brindarles, esperando que esta realización, me permita brindarles mejores cosas.

Mis amigas.

Dulce, Clara Loza, Dalín, Marcela, Clara Ortega, Gloria Esther y Edith.

Algunas veces lejos, otras veces cerca y otras más trabajando hombro con hombro.

Mis amigos.

Efraín, Martín, Alejandro y Gerónimo.

A veces con porras y otras con la urgencia de que el dibujo es para mañana.

AGRADECIMIENTOS. INSTITUCIONALES.

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

Por otorgarme la beca No. 110924 por el período mayo/1997 a febrero/2000, para la realización de mis estudios de Doctorado.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA CEPIPSA TOPILEJO Por la donación de las muestras de semen.

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD AREA DE REPRODUCCION ANIMAL ASISTIDA Por brindarme el espacio físico y todos los recursos materiales para la realización de este trabajo.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL Por otorgarme una beca en el período de marzo de 1997 a marzo de 1998.

ACADEMICOS

DR. ADOLFO ROSADO GARCIA

Hombre de fehaciente convicción en la investigación, que me ha formado en este arduo camino, indudablemente el mejor investigador, forjador de surcos, a pesar de los temporales y sequías, sembrador incansable; con la esperanza de que la cosecha de los frutos, la realicemos juntos.

M en C HECTOR FERNANDO SERRANO Por facilitarme la comprensión de los problemas de la Biología.

DR. EFRAIN MERCADO PICHARDO Hombre de invaluable displicencia, gracias por tener confianza en su servidora y brindarme una estancia confortable en su laboratorio, así como una fuente segura de conocimiento.

DR. ENRIQUE CANCHOLA Agradezco profundamente su generosidad al brindarme un lugar confortable en su laboratorio, para la realización de este trabajo y siempre un amable consejo.

DR. RAUL ALCANTARA Usted me ha permitido comprender que la Química, no es un monstruo de mil cabezas, ojala pudieran existir millones de maestros como usted.

DR. ANTONIO PLIEGO Su perspectiva de la Biología y de la investigación, permiten tener un punto crítico, para despejar la penumbra.

DR. CARLOS ROMERO Gracias por permitirme tan gentilmente el uso de su equipo.

DRA. CONCEPCION MARTINEZ Agradezco, que sin saber quién soy y adonde voy, me facilitara su equipo

RESUMEN

Para avanzar en el entendimiento acerca de los factores que participan en la organización de la cromatina del espermatozoide, se estudió la posibilidad de asociar ADN purificado de Hígado(ADNh) y espermatozoide(ADNepz) de bovino, con histonas somáticas, para formar nucleosomas, así como las propiedades estructurales de los nucleosomas producidos de esta manera y las características fluorométricas de los productos obtenidos por la interacción *in vitro* del ADN purificado de hígado y espermatozoide bovino con protaminas de salmón. La digestión del reasociado ADN de hígado-histonas, con DNAsa1 y nucleasa micrococcica, produjo fragmentos que en la electroforésis muestran el patrón esperado de polinucleosomas. Los patrones electroforéticos de los nucleosomas de ADNepz-histonas, fueron diferentes. La digestión con nucleasa micrococcica produce principalmente fragmentos de aproximadamente 100 pares de bases (pb) y algunas partículas tipo nucleosoma. Bajo la actividad de DNAsa1 la mayoría de los productos fueron de aproximadamente 100 bp, indicando un incremento en la susceptibilidad de los complejos ADNepz-histonas a la actividad hidrolítica en ambas nucleasas, particularmente hacia DNAsa1. Esta susceptibilidad diferencial fue confirmada por análisis espectrofotométrico de gradientes de sacarosa. La tinción con anaranjado de acridina(AA), de los nucleosomas reasociados histonas-ADN muestran diferencias altamente significativas en la intensidad de la fluorescencia, los complejos ADNepz-histonas, son casi dos veces más fluorescentes que los complejos ADNh-histonas. Por el contrario, los complejos ADNh-protamina teñidos con AA, fueron consistentemente más fluorescentes que los complejos ADNepz-protaminas. Finalmente, no hubo diferencias ni en la intensidad de la fluorescencia ni en el espectro cuando el ADNepz fue teñido con AA después de la interacción con protaminas de salmón. Con base en estos datos se propone que el ADNepz tiene importantes características estructurales que lo diferencian del ADNh. Estas diferencias parecen ser especie específicas y seguramente juegan un papel importante en la determinación de la dramática secuencia de eventos que participan en la organización de la cromatina espermática.

SUMMARY

To advance on the knowledge about the factors participating on sperm chromatin organization we have studied the possibilities of association between purified, high molecular weight, liver and sperm DNA with somatic histones to form nucleosomes. The structural properties of the nucleosome produced in this way and the fluorometric characteristics of the products obtained by the *in vitro* interaction between purified somatic and sperm DNA with bovine and salmon protamines were also studied. DNase or micrococcal nuclease digestion of Liver DNA-histone reassociated chromatin produced the expected poly-nucleosome type of fragments. Electrophoretic patterns of digested sperm-DNA nucleosomes were different. Micrococcal nuclease digestion produced mainly fragments smaller than 100 bp and some nucleosome- type particles. Under DNase activity most of the products were smaller than 100 bp, indicating an increased susceptibility of the sperm DNA-histone complexes to the hydrolytic activity of both nucleases, particularly towards DNase. This differential susceptibility was confirmed by sucrose gradient spectrophotometric analysis. Acridine Orange (AO) staining of histone/DNA re-associated nucleosomes showed highly significant differences in fluorescence intensity, sperm DNA/histone complexes being almost twice as fluorescent as liver DNA/histone complexes. On the contrary, liver DNA/protamine complexes stained with AO were consistently more fluorescent than sperm DNA/protamine complexes. Finally, no differences in either fluorescence intensity or spectra were observed when liver and sperm DNA were stained with AO after interaction with salmon protamines. On the basis of our data we propose that sperm DNA has important structural characteristics that differentiates it from somatic DNA. These differences seem to be specie specific and must surely play an important role on the determination of the dramatic sequences of that participates sperm chromatin organization.

INDICE

Declaración	I
Dedicatorias	II
Agradecimientos	III
Resumen	IV
Summary	V
Tabla de contenidos	VI
Capítulo I	
Introducción	1
Histonas	1
Nucleosoma límite	2
Región eslabón	4
Proteínas de alta movilidad	6
Espermatogénesis	6
Protaminas	7
Protamina P1	9
Protamina P2	9
Niveles de empaquetamiento del ADN en células somáticas	12
Niveles de empaquetamiento del ADN en el espermatozoide de los mamíferos	16
Modelo de dona para el asa	21
Unidades de empaquetamiento	25
Implicaciones del adecuado empaquetamiento	27
Reasociación	29
Hipótesis	30
Objetivos	30
Capítulo II	
Material y Métodos	31
Capítulo III	
Resultados	34
Capítulo IV	
Discusión y conclusiones	41
Capítulo V	
Bibliografía	45

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1	Características de las histonas	3
Cuadro 2	Aminoácidos de la protamina bovina	10
Cuadro 3	Proteínas presentes en el espermatozoide	10
Cuadro 4	Primeros modelos propuestos para la cromatina del espermatozoide	20
Cuadro 5	Implicaciones del empaquetamiento de la cromatina del espermatozoide	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Nucleosoma	5
Figura 2	Formas de la cabeza del espermatozoide de algunos mamíferos	8
Figura 3	Niveles de empaquetamiento del ADN somático	15
Figura 4	Modelo de Balhorn para la unión de protamina P1 al ADN	17
Figura 5	Modelo de Rauskas para la unión de protaminas al ADN	17
Figura 6	Modelo lado a lado de unión de ADN y protaminas	19
Figura 7	Modelo de dona	22
Figura 8	Modelo de solenoide	24
Figura 9	Comparativo de empaquetamiento	26
Figura 10	Espectro de absorción del ADN	35
Figura 11	Electroforesis en gel de agarosa	36
Figura 12	Gradiente isocinético	37
Figura 13	Espectros de fluorescencia de reasociados con protaminas de toro	38
Figura 14	Espectros de fluorescencia de ADN	39
Figura 15	Espectro de fluorescencia de reasociados con protaminas de salmón	40

CAPITULO I. INTRODUCCION

Uno de los problemas de la Biología de la Reproducción, que ha dificultado por sí mismo su comprensión, es la manera en como la cromatina del espermatozoide se empaqueta. Su estudio se ha obstaculizado entre otras cosas debido a que está altamente compactada, y para estudiarla es necesario abrir esta intrincada red, lo que le provoca modificaciones. A pesar de estos obstáculos, ha sido un tema de profundo interés, por las repercusiones alimentarias, de control de la natalidad y de reproducción asistida que representa su comprensión.

El estudio de la cromatina de cualquier célula es de fundamental importancia, ya que para que la célula produzca respuestas a estímulos específicos, el ADN (ácido desoxirribonucleico), debe ser leído, copiado y exportar su mensaje. En el caso de la cromatina somática el panorama es más claro y prometedor, sin embargo en la cromatina espermática es un tanto confuso y hasta contradictorio, debido a que no es posible postular un modelo universal de empaquetamiento, ya que no todas las especies presentan la misma variedad de proteínas nucleares, para el empaquetamiento del ADN.

CROMATINA SOMATICA

En 1959 Zubay y Doty¹, prepararon cromatina de timo de ternera, encontrando como componente esencial un complejo desoxiribo-nucleoproteico que contiene casi igual cantidad de ADN y de pequeñas proteínas básicas. Estas proteínas, las histonas, están presentes con una alta homología, tanto en el tejido animal como vegetal, por lo que se deduce que son fundamentales para la función celular².

A través de estudios de difracción de rayos X³, digestión con DNasa I⁴, digestión con Nucleasa de estafilococo^{5,6} y microscopía electrónica^{7,8,9}, se concluye que la cromatina está constituida por un motivo repetitivo de ~100Å de diámetro que le da una apariencia de "collar de cuentas". Olins y Olins 1974⁹ denominan a cada cuenta "cuerpo nu" y Kornberg¹⁰ y van Holde 1974¹¹, por separado la describen como una pequeña cadena de ADN asociada a un complejo octamérico de histonas. Este complejo contiene dos copias de cada una de las cuatro histonas. Finalmente Oudet et al 1975¹² le asignan a cada cuenta el nombre de nucleosoma.

HISTONAS. Las propiedades químicas de las histonas son muy similares en todos los organismos. Son proteínas pequeñas, con carga positiva, que contienen numerosos residuos de arginina y de lisina. Las cargas positivas dispersas por el esqueleto proteico de las histonas se unen rápidamente a las cargas negativas del esqueleto fosfodiéster del ADN, lo cual permite una importante interacción iónica. Las histonas H3 y H4 tienen más residuos de arginina que de lisina,

mientras que las histonas H2A y H2B, tienen un mayor número de residuos de lisina que de arginina¹³ (Cuadro 1). La estructura primaria de cada histona es casi igual en todos los organismos, lo que implica la correspondiente analogía de estructura terciaria y de función¹⁴. El alto grado de conservación, llamado identidad, no es igual en toda la estructura de las histonas, sino que hay regiones cuya secuencia de aminoácidos ha sido más consistentemente conservada, por ejemplo la región básica N-terminal (amino terminal) de la histona H4 entre los residuos 1-20 y de la histona H3, entre los residuos 1-30^{15,16,17,18,19,20,21}. En contraste H1 es la histona menos conservada durante la evolución¹⁷.

La clase de histonas ricas en lisina, incluye 3 familias H1, H5 localizada exclusivamente en eritrocitos nucleado²² y H1^o que predomina en células que son mitóticamente inactivas²³, lo que sugiere que H1^o y H5 pueden tener funciones similares. En organismos superiores existen 6 subtipos de H1, que son H1a, H1b, H1c, H1d, H1e^{24,25,26} y H1t que esta específicamente presente en el testículo²⁴. Para Lennox (1984)²⁶, estos subtipos difieren en su habilidad para promover la formación de la espiral de 10nm de la fibra de la cromatina.

NUCLEOSOMA LIMITE. Estudios hechos por D'anna Jr e Iserberg (1973,1974)^{27,28}, Kornberg (1974)¹⁰ y Roark et al (1974)³⁰, mostraron que ciertos pares de histonas forman fácilmente complejos diméricos [H2a, H2b] y tetraméricos [H3, H4]₂, esta característica de interacción provee las bases para establecer el mecanismo de formación de las subunidades que constituyen la estructura de la cromatina. Burton et al (1975)³¹, encontraron que las histonas f-3 [H3] y f2a1 [H4] se disocian de la cromatina de timo de ternera reversible y cooperativamente como un complejo equimolar, y que en ausencia de ADN forman dímeros, tetrámeros y oligómeros. Hyde y Walker (1975)³², encuentran que f2a2 [H2a] y f2b [H2b] cuando se colocan en soluciones adecuadas se asocian para formar un dímero con un peso molecular de 28,400 D (Dalton). Estos mismos investigadores precisaron que la presencia de f1 [H1] libre, no tiene efecto en la interacción de las otras 4 histonas.

Camerini-Otero et al (1976)³³, demostraron que el grupo de histonas rico en arginina, H3+H4, tienen un papel central en la organización del ADN en la cromatina. Del mismo modo Boseley et al (1976)³⁴, concluyeron que el par de histonas H3+H4 es esencial para la formación de la estructura de la cromatina, aunque para completar el desarrollo estructural también es necesaria la presencia de H2a+H2b. Oudet et al (1977)³⁵, encuentran que H3 y H4 interaccionan eficientemente con alrededor de 130 pares de bases del ADN, sugiriendo que ellas solas pueden organizar casi todo el nucleosoma. Simon et al (1978)³⁶, encuentran que un octámero conteniendo sólo H3 y H4 puede formar una estructura con propiedades topológicas e hidrodinámicas similares a las de un nucleosoma.

Cuadro 1. Características y modificaciones de las proteínas histonas y HMG (tomada de Csordas, 1990²¹).

Sustrato	Peso mol. (KDa)	Lis/Arg	Modificación de las proteínas nucleares ^a				
			Acetilación ^b	Fosforilación	Poli (ADP-ribosil)ación	Metilación	Glicosilación
Histona H1	21.0	63/3	0	++	++	0	0
Histona H2a	14.0	14/12	+	+	+	0	0
Histona H2b	13.8	20/8	+	0	+	0	0
Histona H3	15.3	13/18	++	+	0	++ (Lis)	0
Histona H4	11.3	11/14	++	+	0	++ (Lis)	0
HMG 1-2	31.7	50/10	+	0	++	+(Arg)	+
HMG 14-17	11.2	21/5	+	++/+	+	?	+

^a Para células normales intactas o tejidos

^b Solo N^o-Lisina

Karawajew y Heymann (1980)³⁷, comprueban que las histonas H3 y H4, forman tetrámeros en solución y que estos interactúan con alrededor de $\frac{3}{4}$ partes del ADN que forma el nucleosoma, uniéndose a él particularmente en la sección media y terminal de los 145pb (pares de bases). H2a y H2b participan como dímeros [H2a-H2b], unidos a vueltas opuestas de ADN. De esta manera es posible proponer que la interacción de la parte globular del centro de histonas con distintos sitios de los 145pb, constituyen las principales interacciones responsables del mantenimiento del nucleosoma límite. Esta organización está posteriormente reforzada por las interacciones de las regiones N-terminales de las histonas H3 y H4 dentro del núcleo. Finalmente proponen como un modelo de la estructura histónica del nucleosoma la participación de un octámero de histonas, formado por un tetrámero [H3-H4]₂ y dos dímeros [H2a-H2b], que están unidos por una fuerte interacción entre H2b y H4 (Figura 1).

En el nucleosoma, los puntos de contacto existentes entre el ADN y el núcleo de histonas son aproximadamente cada 10 pb³⁸. Las histonas H3 y H4 hacen contacto con el ADN dentro de 30 pares de bases de cualquier lado del centro del nucleosoma³⁹. En suma, la periodicidad helicoidal del ADN varía en todas las partes del nucleosoma con los 3 giros centrales de la hélice, teniendo una periodicidad de 10.7 pb y el exterior de los giros de 10 pb^{40,41}.

La interacción ADN-Proteínas está involucrada en muchos de los procesos fundamentales que ocurren dentro de la célula, incluyendo empaquetamiento, replicación, recombinación, restricción y transcripción⁴². Se sabe, por ejemplo que la delección del extremo N-terminal de la histona H4 altera la estructura de la cromatina y alarga desproporcionadamente la fase G2 del ciclo celular. Asimismo, la delección del núcleo hidrofóbico de H4 bloquea la segregación cromosomal y es una mutación letal⁴³.

REGION ESLABON. El ADN eslabón, de 20 a 100 pb, se asocia parcial o totalmente con las histonas ricas en lisina H1 o H5 en la región de enlace de los nucleosomas, desempeñando un papel de "eslabón de unión nucleosomal"^{44,45,46,47}. Esta región, de alrededor de 200 Å de longitud, es fácilmente accesible al ataque de las nucleasas⁴⁸.

Se sabe que las histonas unidoras, como H1, interactúan establemente con el ADN nucleosomal solo después de que el centro del nucleosoma ha sido formado⁴¹. Jeong y Stein (1994)⁴⁹ proponen además que es posible que las histonas de tipo H1 estén asociadas a las estructuras del poro nuclear.

La histona H1 se une a la partícula central del nucleosoma para sellar los puntos de entrada y salida del ADN, el dominio central de H1 aparentemente interactúan con la partícula central del nucleosoma, mientras que el extremo cargado positivamente interactúa con el ADN eslabón y es importante en la condensación de la cromatina antes de la mitosis⁵⁰.

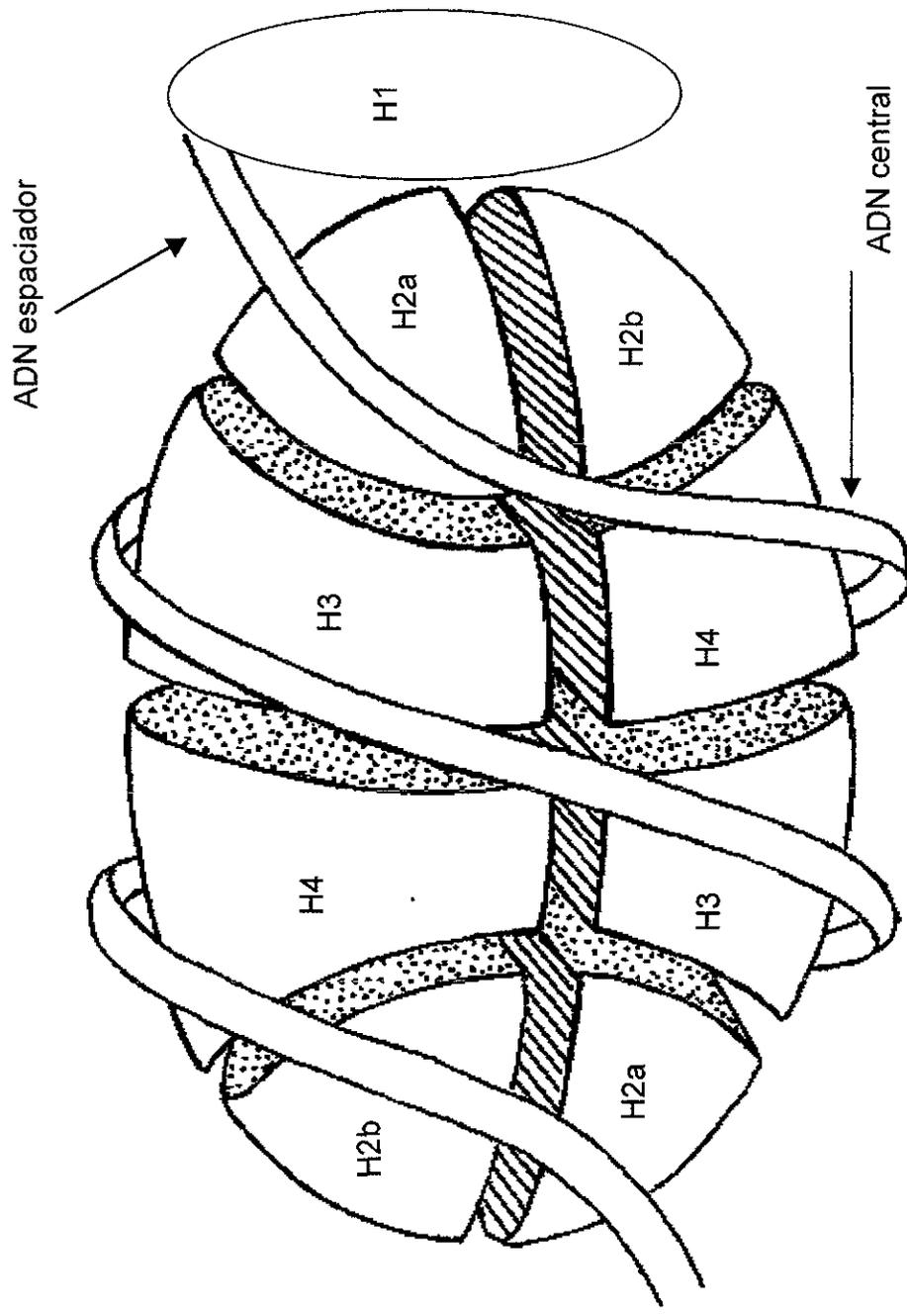


Figura 1. Nucleosoma, estructurado por un tetramero central de H3 + H4 y a los extremos dímeros de H2a + H2b, en la región del ADN espaciador H1. Adaptada de Stryer^{2,3,6} y Csordas^{2,1}

GRUPO DE PROTEINAS DE ALTA MOVILIDAD. Otro grupo de proteínas que son importantes en la estructura de la cromatina. Estas proteínas fueron extraídas inicialmente con NaCl (Cloruro de sodio) 0.35 M (Molar) y se sabe que son fácilmente solubles en ácido tricloroacético. El sobrenadante obtenido después de tratar las soluciones de cromatina con este ácido contiene algunas proteínas que poseen una gran movilidad en geles de poliacrilamida, por lo que fueron llamadas proteínas de alta movilidad (HMG). El grupo de proteínas 14 y 17, son tan similares unas con otras que podrían ser consideradas como un solo grupo [HMG14-17]; HMG 1 y 2 podrían ser tratadas de la misma manera [HMG1-2]. Las proteínas HMG14-17, tienen una distribución desigual de cargas: el extremo amino terminal es muy básico, mientras que el extremo carboxilo terminal es muy negativo. Existen dos sitios de unión para HMG 14-17, en cada nucleosoma, se cree que las proteínas aseguran el ADN en los puntos donde éste entra y sale del centro del nucleosoma⁵¹, el extremo básico amino se une al ADN y el extremo carboxilo negativo se une a las histonas⁵². Por tal razón, las proteínas HMG 14-17 estabilizan el nucleosoma, tanto en estado condensado como descondensado⁵³. Estas proteínas son también parcialmente responsables de inducir espaciamiento regular en los nucleosomas. A diferencia de las histonas, las proteínas HMG están glicosiladas⁵¹, y ha sido propuesto que estas proteínas podrían interactuar con la matriz nuclear a través de sus residuos de azúcar^{54,55}.

Las proteínas HMG 1-2, son tan largas como las proteínas HMG 14-17, pero tienen una estructura muy diferente. Las proteínas HMG 1-2, están formadas por un dominio hidrofóbico central en donde se pueden encontrar un par de segmentos de unión al ADN con una estructura muy característica, por lo que han sido llamadas HMG para el ADN. Cada una de estas estructuras está compuesta de 3 α -hélices⁵¹; dos perpendiculares y antiparalelas a la tercera así que forman una "L". La forma en que las cajas HMG se unen al ADN es aún desconocida. El extremo carboxilo, los últimos 30 residuos, es extremadamente ácido pues contiene numerosos residuos de ácido glutámico o ácido aspártico⁵⁷. La función fisiológica de este extremo rico en grupos carboxilo es desconocida, pero *in vitro* es capaz de desdoblarse⁵⁸, o reiniciar la constitución de la hélice del ADN⁵⁹.

ESPERMATOGENESIS.

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

actividad transcripcional. Durante la espermiogénesis, la espermatíde redonda experimenta una metamorfosis complicada, dando origen a una célula morfológicamente distinta, el espermatozoide. Cada especie tiene una forma característica de espermatozoide⁶⁰ (Figura 2). Esta forma es debida a la pérdida de mucho (sino todo) del citoplasma, y al desarrollo de un flagelo. Durante estos pasos, y después que la actividad del genoma ha cesado, el espermatozoide desarrolla un núcleo altamente compactado, con disminución de las actividades replicativa y de reparación.

El proceso involucra una serie de reacciones a través de las cuales las histonas y proteínas no histonas de la cromatina son reemplazadas durante un período de tiempo variable y de una manera específica. Algunas veces, este reemplazo involucra un grupo de proteínas conocidas como "proteínas de transición" y éstas a su vez por uno o más tipos de protaminas⁶¹. Este proceso de reemplazo constituye uno de los cambios más marcados en la estructura de la cromatina de los eucariontes.

PROTAMINAS. Fueron descubiertas por Miesher en 1869, quién las encontró acopladas a las bases nitrogenadas de la "nucleína" del espermatozoide de salmón Rhine (salmo salar). Estudios subsecuentes de Kossel (1928)⁶² y Felix (1960)⁶³, establecieron la naturaleza polipeptídica de las protaminas. En 1969 Bloch⁶⁴, las clasificó en cinco tipos:

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

De acuerdo con esta clasificación en los mamíferos se presentan las protaminas de tipo II.

TIPO II. Protaminas estables. La característica esencial de las protaminas estables, también llamadas "queratinosas", es la presencia de 6 a 9 residuos de cisteína por mol, lo cual permite la formación de puentes inter e intra disulfuro en la molécula de protamina⁶⁴. Tales puentes covalentes imparten un grado adicional de estabilidad por la formación de enlaces cruzados y por tanto confieren a la cromatina del núcleo del espermatozoide sus características de estabilidad.

Coelingh et al (1972)⁶⁵, encuentran que la protamina de bovino, con un peso molecular de 6,200, está constiuída por 47 amino ácidos, con alanina como amino terminal y glutamina como carboxilo terminal. Contiene 24 residuos de arginina y 6 residuos intermedios de cisteína, 19

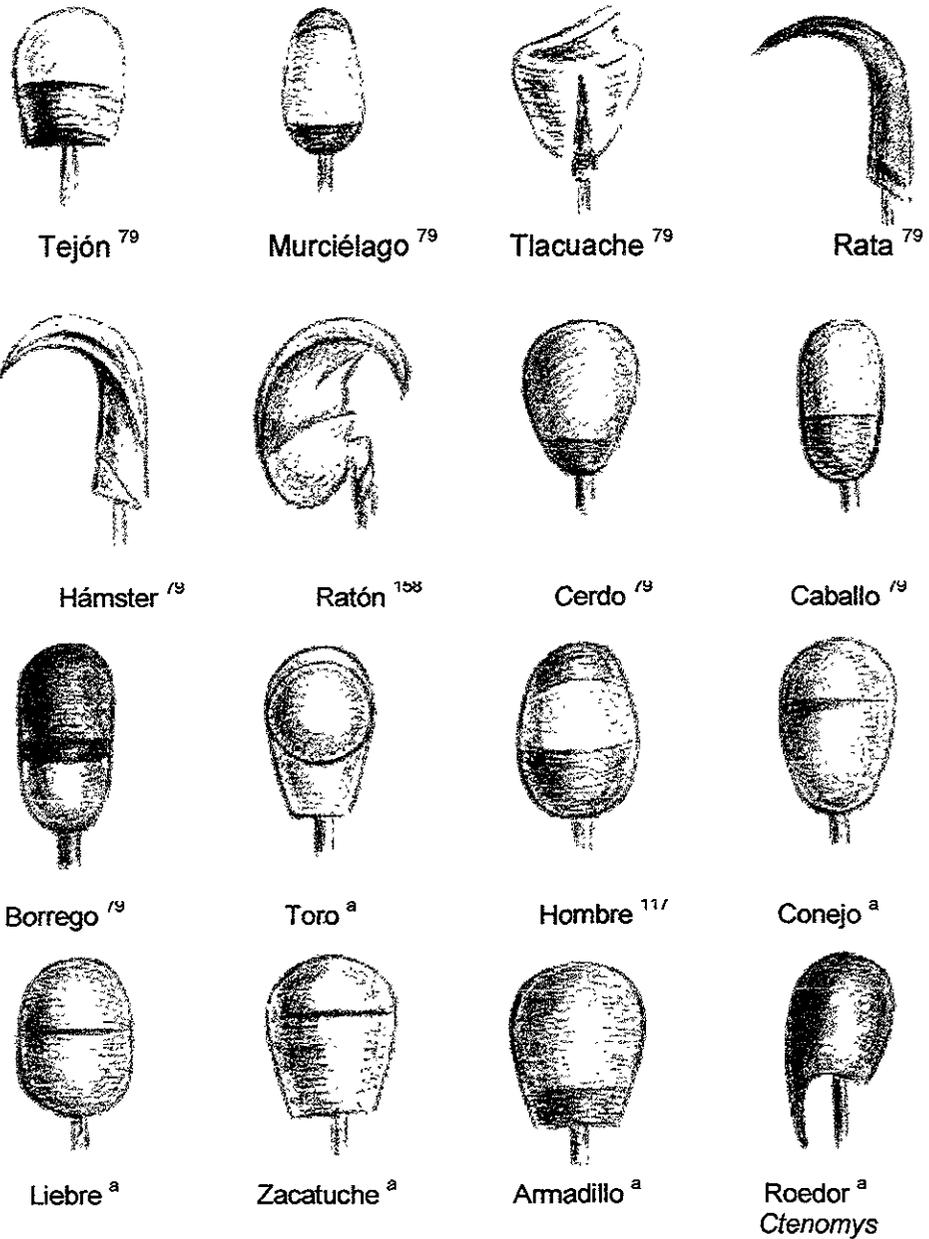


Figura 2. Forma de la cabeza del espermatozoide de algunos mamíferos.
 a Dibujos realizados en base a fotografías del área de reproducción animal asistida UAM-I.
 Las dimensiones de los dibujos y los colores son exclusivamente con el fin de agruparlos de manera que solo se muestren las diferentes formas.

residuos de arginina se encuentran en la parte central de la molécula (Cuadro 2). Estos autores proponen que la región media sea el primer sitio de unión con el ADN, mientras las regiones amino y carboxilo terminal podrían ser responsables de la interacción con las moléculas de las proteínas vecinas.

En muchas especies de mamíferos, el núcleo de los espermatozoides contiene un sólo tipo de protamina P1, con una fuerte homología entre especies. Un segundo tipo de protamina P2, está presente en el núcleo de algunos mamíferos, incluyendo el humano⁶⁶, el ratón⁶⁷ y el caballo⁶⁸ (Cuadro 3).

PROTAMINA P1. Además de los mamíferos, también aislada en aves⁷⁹, muchas de estas moléculas tienen una secuencia tetrapeptídica en el extremo amino terminal Ala-Arg-Tyr-Arg (ARYR), a excepción del conejo⁶⁹, en el cual la alanina está sustituida por valína en el primer residuo, sin embargo, este cambio no tiene mayor efecto en la estructura de la protamina. La secuencia ARYV es seguida por un motivo conservado Ser-Arg-Ser-Arg (SRSR), después por un grupo de cinco a siete argininas, en suma en esta región la posición 8, tiene serina o treonina, ambos son hidroxí-aminoácidos, polares y susceptibles de ser fosforilados⁷⁹.

La presencia de varias cisteínas en las protaminas de los mamíferos, fue propuesta como un mecanismo esencial para la estabilización del complejo de nucleoprotaminas, a través de la formación de enlaces disulfuro en el núcleo del espermatozoide^{70,71}. Sin embargo la cisteína podría no estar involucrada en el proceso de condensación nuclear y sólo tomar parte en la estabilización final de la nucleoprotamina ya condensada.

PROTAMINA P2 EN MAMIFEROS. Las protaminas P2 fueron primero secuenciadas en el espermatozoide humano⁶⁶ y en el ratón⁶⁷. Característicamente este tipo de protaminas son sintetizadas como precursores^{72,73,74,75,76}, y deben ser procesadas post-transcripcionalmente, dando origen al producto final.

Pirhonen et al (1994)⁷⁷, encontraron que la diferente localización de los residuos de fosfoserina en las protaminas P2 de humano y caballo indican que éstas se unen al ADN o interaccionan con otras moléculas de protaminas. Gatewodd et al (1990)⁷⁸ y Bianchy et al (1992)⁵⁶, demostraron que la protamina humana P2 puede ser una proteína semejante a las descritas como "dedos de zinc", conteniendo motivos descritos para factores reguladores de la transcripción y unirse selectivamente a sus sitios de unión, facilitando el cierre de la transcripción hacia el final de la espermatogénesis y quizá la estabilización de la cromatina de espermatozoide por zinc.

En el espermatozoide de ratón y del humano, la P2 comprende del 50 al 60% del total de las protaminas, pero no ha sido observada en proporción tan elevada en otros mamíferos, aunque existe un nivel bajo de ARNmP2 en la rata y en el cobayo⁷⁶. El hecho de que la familia P2 no haya

Cuadro 2 Secuencia de aminoácidos de la protamina P2 del Toro (Tomado de Coelingh et al 1972⁶⁵).



Cuadro 3 Presencia de proteínas de transición, se ve claramente que la presencia de éstas no es dependiente de el tipo de protaminas que presenta la especie.

Especie animal	Tipo de protaminas	Proteínas de transición	Referencia
Conejo	P1	-	127
Toro	P1	-	128
Borrego	P1	SI	79
Rata	P1	SI	129
Caballo	P1, P2	-	130
Hombre	P1, P2	SI	131
Ratón	P1, P2	SI	116

sido identificada en aves, hace tentador especular que en términos de evolución aparecen y funcionan inicialmente las protaminas de tipo P1, y que la familia P2 aparece posteriormente como un tipo de moléculas de soporte en animales más evolucionados, para determinar la estructura nuclear junto con P1, aunque también se ha propuesto que el papel importante esté relacionado con la mayor compactación necesaria por el tamaño del núcleo mediante la formación de enlaces cruzados debidos a su alta proporción de cisteína⁷⁹.

Una característica de las protaminas es que son fosforiladas rápidamente, solo un poco después de ser sintetizadas^{80,81}. La carga negativa de los residuos fosforilados puede servir como punto clave para formar enlaces con otras protaminas y para la estabilización de las interacciones electrostáticas proteína- proteína, que pueden ser realizados con los residuos de arginina cargados positivamente. Está claro que las protaminas se unen al ADN sin haber perdido los residuos fosforilados⁸². Este hecho ha conducido a la proposición de que la presencia de residuos de serina fosforilados confiere a la molécula de protamina una carga negativa que podría modular la interacción de las proteínas con el ADN⁷⁹, facilitando la formación de un complejo protamina - ADN⁸³.

Las protaminas fosforiladas podrían localizarse junto a un nucleosoma, e iniciar el rompimiento de la estabilidad de los contactos histona-histona, favoreciendo su liberación⁸⁴, para ser sustituidos por protaminas. Esta hipótesis puede correlacionarse con el fenómeno de hiperacetilación de las histonas, sobre todo de la H4, que se encuentra presente en todas las especies que reemplazan las histonas por protaminas, pero está ausente en aquellas especies que retienen el complemento total de histonas en el núcleo del espermatozoide⁸⁵. Esta hipótesis sugiere que la acetilación de H4 podría servir para debilitar los contactos histona-ADN en el nucleosoma, exponiendo así los dominios de la cromatina a la desestabilización y a la sustitución de las histonas por las protaminas.

Marushige y Marushige (1978)⁸⁶, concluyen que las protaminas son desfosforiladas extensivamente después de completar su asociación con el ADN, lo cual acontece probablemente antes de que el espermatozoide penetre el epidídimo. Pirhonen et al (1994)⁷⁷, aislaron protaminas de espermatozoides eyaculados de humano (HP1 y HP2), caballo (St1 y St2), toro, cerdo y borrego en todos ellos P1 y muestran por secuenciación de péptidos que las formas fosforiladas de estas protaminas están presentes en todas las especies examinadas, lo que indica que el proceso de desfosforilación no se ha completado en los espermatozoides maduros, y que una porción importante de los residuos de serina permanecen fosforilados, encontrando, además, que los aminoácidos hidroxilados que se encuentran en los dobleces de la protamina P1, son los sitios mayormente fosforilados.

D'auria et al (1993)⁸⁷, encuentran que las protaminas se localizan tanto en el surco mayor como en el surco menor formados por la doble hélice del ADN, donde forman complejos con los

nucleótidos del ADN. Los exámenes realizados de las fracciones aisladas de cupleína demuestran que no exhibe ninguna diferencia neta de unión específica hacia bases púricas y pirimídicas de mononucleótidos.

PROTEINAS DE TRANSICION. Algunos Mamíferos como ratón⁷⁹ y humano^{88,89}, durante la espermiogénesis reemplazan gradualmente las histonas nucleares por proteínas intermediarias y después estas mismas son reemplazadas por protaminas. Estas proteínas de transición (TP), tienen una basicidad intermedia, TP1 y TP2 aparecen durante los estadios 12-15 de la espermiogénesis de los mamíferos⁹⁰ y son reemplazadas durante los estadios 15 a 19⁹¹.

TP1 es una proteína de 6,000 Daltones con aminoácidos básicos distribuidos aleatoriamente a lo largo de la molécula⁹², se ha visto que tiene una propiedad desestabilizante del ADN, que se manifiesta a través de sus dos residuos de tirosina, flanqueados por aminoácidos básicos^{93,94}.

TP2 tiene un peso molecular de 13,000 daltones, contiene altos niveles de prolina, serina, arginina y lisina⁹⁵, en TP2 de ratón⁹⁶ y rata⁹⁷, Baskaran y Rao (1991)⁹¹, identificaron dos dominios potencialmente "dedos de zinc", que podrían jugar un papel importante en la iniciación de la condensación de la cromatina y/o en el cese de la actividad transcripcional durante la espermiogénesis de los mamíferos. En la espermátide de rata las histonas son primero reemplazadas por proteínas de transición ricas en lisina TP1, TP2 y TP4. Coincidiendo con la aparición de estas proteínas o ligeramente antes, la cromatina de la espermátide pierde su estructura nucleosomal y cesa la transcripción^{98,99}.

NIVELES DE EMPAQUETAMIENTO DEL ADN EN CELULAS SOMATICAS (figura3).

NUCLEOSOMA. Esta formado por alrededor de 200 pares de bases de ADN (166 a 341 pb dependiendo de la fuente)¹⁰⁰, asociados con un núcleo octamérico de proteínas que comprende un tetrámero central de las histonas ricas en arginina H3 y H4, y dos dímeros laterales de las histonas ligeramente ricas en lisina H2a y H2b. En este andamio proteico, el ADN está organizado dando casi dos vueltas (aproximadamente 266 pb), alrededor del octámero de histonas. Los dos puntos de entrada y salida de la espiral que el ADN forma sobre el centro de histonas están sellados por la unión de una molécula de la histona rica en lisina H1, la cuál bloquea estos puntos de entrada y salida del ADN. El ADN restante, 34 pb, (considerando la estructura típica de "collar de cuentas" con una subunidad de 200 pb), comprende el ADN llamado de unión que conecta un nucleosoma con el siguiente. El largo de la región de unión puede variar desde 0 hasta 80 pb en la cromatina obtenida de diferentes sistemas celulares.

FIBRA DE 10 nm. Esta fibra está constituida por un arreglo lineal de nucleosomas, que bien podría llamarse "filamento nucleosomal"¹⁰⁰. En la cromatina que contiene H1, el ADN de unión y el nucleosoma siguiente dan una vuelta hacia la izquierda, dando a la fibra extendida una apariencia de zig-zag. Por el contrario en los tipos de cromatina que carecen de H1, los puntos de entrada y salida del ADN son al azar, creando una conformación extendida irregular de "cuentas en una cuerda"¹⁰¹.

FIBRA DE 30 nm. Las micrografías electrónicas de los cromosomas en metafase y las secciones delgadas de núcleos en interfase, procesadas a partir de tejidos obtenidos en ausencia de agentes quelantes¹⁰², así como la fibra extendida de cromosomas en metafase, sugieren que el siguiente nivel de empaquetamiento del filamento nucleosomal, está constituido por la "fibra de 30 nm", también llamada solenoide^{103,104,105}.

Esta fibra de 30 nm tiene alrededor de 6 nucleosomas por vuelta y representa una concentración de aproximadamente 50 dobleces de la doble hélice de ADN²¹. Se ha demostrado ampliamente que las histonas que participan en la unión inter-nucleosomal, como H1 y H5, son indispensables en el establecimiento y estabilización de esta estructura solenoide^{101,106,107,108}. Se sabe que su presencia es más determinante que la incubación en soluciones de fuerza iónica baja, y que la acción en la compactación de la fibra puede deberse a la interacción entre dominios globulares¹⁰⁹.

Existe gran controversia acerca de la existencia *in vivo* de este nivel de estructuración, debido a que aunque, Finch y Klug (1976)¹⁰³ demostraron que la estructura de solenoide puede ser inducida fácilmente *in vitro* con un ancho de alrededor de 30 Å, Thoma et al (1979)¹⁰¹, concluyen que solo en concentraciones de NaCl superiores a 100mM se forma la fibra de 30nm. Leuba et al (1994)¹¹⁰, encontraron que la adquisición de este orden de empaquetamiento por la cromatina es inducido por concentraciones de NaCl iguales o superiores a 80 mM. Por otro lado, Horowitz et al (1994)¹¹¹, al estudiar la arquitectura tridimensional de la cromatina por medio del procedimiento de tomografía electrónica, concluyen que incluso en los núcleos con fibras de cromatina claramente definidas existen regiones donde las fibras se interdigitan la una con la otra, perdiendo individualidad y haciendo difícil interpretar la presencia de determinadas estructuras tridimensionales.

Las observaciones realizadas para precisar las propiedades de este tipo controversial de estructuración de la cromatina, demuestran que la fibra contiene de seis a ocho nucleosomas, que se presentan cuando la solución se realiza en medios con una fuerza iónica que va de 70 a 100 mM y que requiere concentraciones milimolares de Mg⁺². Se ha señalado que el diámetro de la fibra varía desde 25 hasta alrededor de 45 nm, dependiendo de la fuente de cromatina, el método para el aislamiento, la preparación de la muestra y el método utilizado para precisar su

estructura¹⁰⁹. VanHolde y Zlatanova (1995)¹¹², han sugerido que el alto orden de estructuración que la cromatina adquiere en medios con altas concentraciones de sal, puede ser llamado “fibra condensada o compactada”.

La localización de la exposición o internalización de los extremos N-terminales de las histonas centrales y del extremo C-terminal de H1 son de interés, ya que estas regiones contienen sitios de modificaciones enzimáticas, que podrían modular la estabilidad de la estructura¹⁰⁰. Woodcock et al (1984)¹¹³, plantean que la región de unión de estas “fibras condensadas o compactadas” no está internalizada dentro de la estructura de alto orden puesto que debe permanecer expuesta para poder ser modificada bioquímicamente cuando sea necesario, lo cual hace a esta estructura más compatible con el modelo de “cinta torcida”. Leuba et al (1994)¹¹⁰, proponen que el ADN unidor debe también estar localizado en el exterior de la fibra de cromatina condensada, formando junto con los nucleosomas las paredes del solenoide. Por otro lado Zlatanova y van Holde (1996)¹⁰⁹ concluyeron que las caras planas del nucleosoma son casi paralelas al eje de la fibra.

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

ESCARPELA, ROLLO, CROMATIDA. Existe evidencia que en los niveles de organización de los cromosomas somáticos eucariontes, cada aumento en el grado de compactación del ADN es multiplicativo. El principio es sencillo: la compactación del ADN en los cromosomas eucariontes se realiza al envolverse un asa sobre otra asa, sobre otra asa, y así sucesivamente¹¹⁴. Debe tenerse en cuenta, que este tipo de empaquetamiento requiere gran cantidad de espacio. Desde la formación de los octámeros de histonas que forman los nucleosomas, estas estructuras semiesféricas ocupan un volumen importante. Este requerimiento de espacio aumenta con cada nivel de superestructuración, porque el enrollamiento y superenrollamiento requieren el ir dejando espacios vacíos considerables en el interior de los giros¹¹⁵.

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

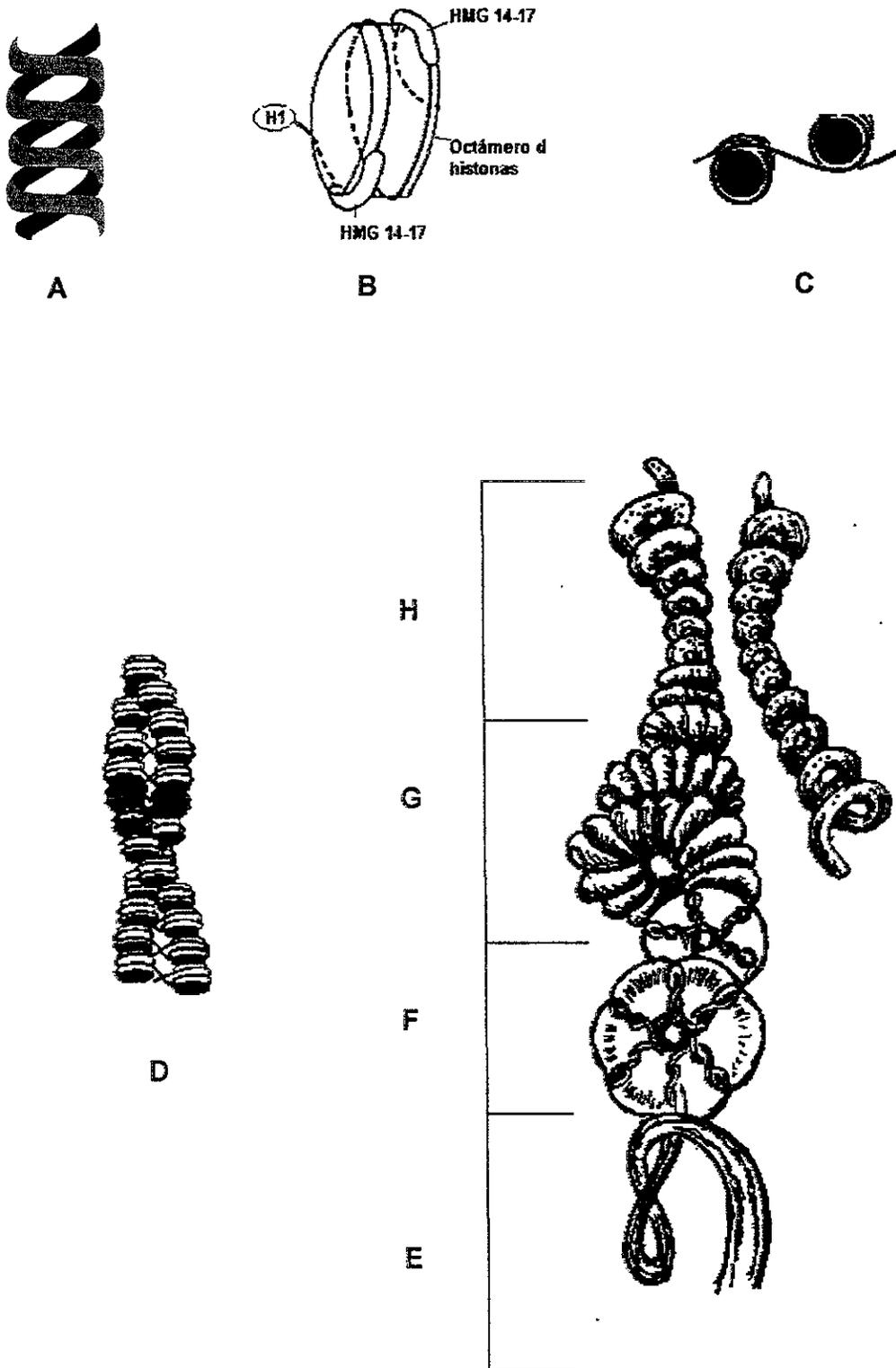


Figura 3. Niveles de empaquetamiento del ADN somático. A doble hélice. B Nucleosoma. C Fibra de 10 nm. D Fibra de 30 nm "solenoid". E Asa (50×10^6 pb). F escarapela (6asas). G rollo (30 escarapelas). H 2 cromatidas (2×10 rollos). Adaptado de Stryer

Inicialmente se consideraba que el ADN del espermatozoide estaba estructurado en nucleosomas o en complejos parecidos a nucleosomas. Pogany et al (1981)¹¹⁶, muestran que el empaquetamiento del ADN en nucleosomas puede requerir un volumen de $9.9\mu\text{m}^3$, que es más de dos veces el volumen determinado para el núcleo del espermatozoide, a pesar de que las observaciones realizadas con microscopía de fuerza atómica (AFM) han mostrado que el volumen del ADN en espermatozoides totalmente hidratados es más de dos veces el volumen indicado previamente¹¹⁷, el volumen disponible aun así es insuficiente para contener la cromatina del espermatozoide empaquetada en estructuras parecidas a nucleosomas. Por lo tanto la cromatina del espermatozoide debe estar organizada de una manera totalmente diferente a la estructura nucleosomal de la cromatina somática.

NIVELES DE EMPAQUETAMIENTO DEL ADN EN EL ESPERMATOZOIDE DE LOS MAMIFEROS.

DOBLE HELICE. Se han demostrado algunas diferencias entre el ADN somático y el espermático, como el largo de los telómeros, la carencia de hipermetilación, diferente contenido de G+C^{119,120,121} y diferente proporción de secuencias de alta repetición¹²².

COMPLEJO ADN-PROTAMINAS. Este nivel de compactación es homólogo al de la estructura somática, pero muy diferente en su estructura. Balhorn (1982)¹²³, propone que las protaminas interactúan con el ADN en una conformación extendida, en donde el segmento central de poliarginina de la protamina P1 se une al surco menor del ADN, formando enlaces cruzados y neutralizando la columna fosfodiéster de la macromolécula, donde los residuos carboxi y amino terminales de las proteínas participan en la formación de puentes de hidrógeno, enlaces hidrofóbicos y disulfuro inter e intra-protamina (Figura 4). Este modelo puede ser adecuadamente aplicado para peces y mamíferos que tienen un solo tipo de protamina, el problema surge en animales que tienen dos o aun tres tipos de protaminas. También en este caso Pogany y Balhorn (1992)¹²⁴ proponen que en el ratón las protaminas P1 y P2 se encuentran en el surco mayor del ADN, D'auria et al (1993)⁸⁷ concluyen que las protaminas están ancladas tanto en el surco mayor como en el surco menor del ADN. Bianchi et al (1994)¹²⁵, sugieren que las protaminas P1 y P2 están ancladas a la superficie externa de la cadena de ADN vía interacciones electrostáticas con los residuos fosfato, sin una específica ubicación en los surcos del ADN. Raukas y Mikelsaar en (1999)¹²⁶, proponen que las moléculas de protaminas están localizadas en canales entre las moléculas de ADN. En este modelo, el ADN está arreglado hexagonalmente en el plano x-y, mientras su posición relativa con respecto al eje z está movida por 0, 1/3 y 2/3 del campo de la doble hélice. Como resultado se forman largas cavidades en tres canales externos, de los seis

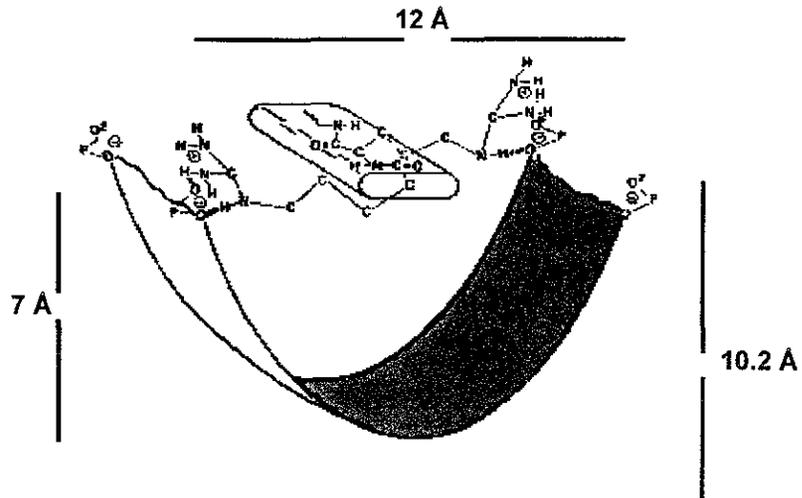


Figura 4. Posición del segmento de poliarginina de la protamina P1 en el surco menor del ADN. Tomada de Balhorn 1982¹²³.

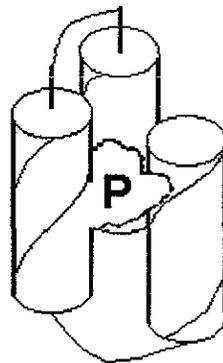


Figura 5. Estructura sugerida por Raukas y Mikelsaar 1999, para la interacción de las protaminas con el ADN que hace uso de oligonucleótidos tripartitas y una torcedura semejante a un paquete hexagonal.

canales que rodean cada molécula de ADN donde el surco mayor está yuxtapuesto. Las moléculas de las protaminas están arregladas de tal manera que pueden llenar el surco mayor en las tres moléculas circundantes de ADN simultáneamente (Figura 5).

FIBRA DE 10 nm. La unión ADN-protaminas, junto con las fuerzas de van der Waals, permiten a nivel molecular adquirir una estructura lineal “lado a lado” (Figura 6). Se ha demostrado que tal estructuración no confiere al ADN ninguna clase de superenrollamiento.^{132,133,134}

Considerando que el ADN del espermatozoide no se replica, ni se transcribe ARN, se puede concluir que las características funcionales del superenrollamiento presente en las células somáticas es temporalmente sacrificado, con el fin de conferir protección al ADN, a través de un estado densamente empaquetado. En el cuadro No.4 se describen los modelos más representativos que corresponden a este nivel de empaquetamiento hasta 1988.

Desde 1956, Wilkins¹³⁵ muestra que el núcleo del espermatozoide es esencialmente un agregado cristalino de nucleoproteínas. Estudios de criofractura, mostraron que el núcleo del espermatozoide de los mamíferos está compuesto de hojas laminares apiladas orientadas de forma paralela al eje longitudinal del espermatozoide, en el toro^{136,137}, conejo¹²⁷, y el hombre¹³⁸.

Estudios de microscopía electrónica en rata y conejo¹²⁹, han demostrado que la cromatina está presente formando una serie de láminas, paralelas al eje del núcleo. En espermatozoides de grillo^{139,140}, se ha demostrado que la cromatina del espermatozoide está enrollada en formación lineal a lo largo del eje longitudinal de los núcleos. Experimentos de dicroísmo circular¹³⁰ y el uso de luz polarizada¹⁴¹, en espermatozoides de caballo muestran que la cromatina del espermatozoide de los mamíferos placentarios se comporta como un líquido colestérico, en el que los filamentos de ADN, son empaquetados en formación lineal en planos paralelos. Todos estos datos son acordes con el modelo de Balhorn.

EQUIVALENTE AL SOLENOIDE. Se ha publicado muy poca evidencia acerca de la estructura espermática equivalente al solenoide, en 1993 Ward¹⁴², propone un modelo basado en las siguientes evidencias:

Estudios de tinción inmunohistoquímica e hibridización *in situ*¹⁴³ han demostrado que los centrómeros se localizan en un foco discreto dentro del núcleo del espermatozoide. Resultados similares han sido obtenidos, mediante estudios de hibridización *in situ* para cromosomas específicos^{144,145}. Estos datos sugieren la idea de que las asas de ADN están plegadas o en espiral dentro de un foco localizado en el núcleo del espermatozoide.

Allen et al (1990)¹⁴⁶, observaron núcleos de espermatozoide de ratón y toro en espermatozoides intactos, así como la cromatina de núcleos parcialmente descondensados, encontrando que el ADN no está organizado como un largo legajo lineal de fibras, en cambio el

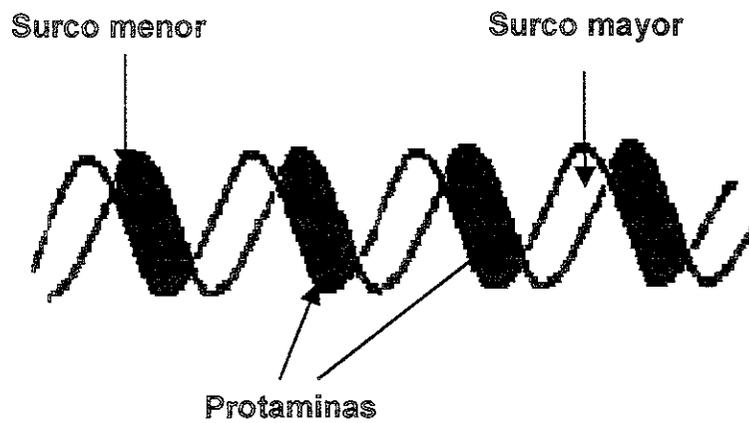


Figura 6. Modelo "lado a lado". Adaptado de Ward 1993 ¹⁴².

Cuadro 4. Modelos que se han propuesto desde 1970 hasta 1988, que equivalen a la fibra de 10 nm de las células somáticas, se nota que a pesar del paso del tiempo y el avance de la tecnología, este nivel de empaquetamiento parece ser una constante.

Año de Publicación	Descripción	Especie	Referencia
70	Láminas paralelas al eje del núcleo	Conejo	127
74	Red cerrada	Toro	128
77	Líquido cristalino colestérico	Caballo	130
78	ADN enrollado alrededor de multímeros de histonas, espaciadas regularmente a lo largo de la fibra, generando un arreglo lineal de nucleosomas de espermatozoide conectados por pequeños tramos de ADN sin acomplejar	Toro Borrego Caballo	79
78	Arreglo lineal a lo largo de la longitud del núcleo	Grillo	139
80	Configuración de cuentas en una cuerda	Toro Hombre Trucha Tiburón	131
81	Las protaminas en la cromatina del espermatozoide, no proveen una subunidad núcleo alrededor de la cual se enrolla el ADN	Ratón	116
82	El ADN del espermatozoide está en un arreglo lineal lado a lado	Ratón	123
83	Arreglo laminar paralelo al eje del núcleo	Rata	129
83	Líquido colestérico, las hebras de ADN están empaquetadas en un arreglo lineal en planos paralelos	Caballo	141
88	Arreglo lineal a lo largo del eje longitudinal del núcleo	Grillo	140

ADN del espermatozoide parece estar enrollado en una compleja madeja de tamaño variable, pero suficiente para contener el equivalente a un replicón de ADN. Koheler et al (1983)¹²⁹, notaron un arreglo similar en el ADN de espermatozoide de rata, el ADN dentro del nódulo o cuenta tiene un diámetro de 13 a 25 nm. Estos nódulos son fuertemente empaquetados dentro del núcleo del espermatozoide, en un arreglo tridimensional.

En 1991 Allen et al¹¹⁷, al observar por microscopía electrónica núcleos totalmente hidratados, precisan que el volumen del núcleo del espermatozoide, es más de dos veces superior al estimado con anterioridad por Pogany et al (1981)¹¹⁶, así como que la cromatina del espermatozoide *in vivo*, está altamente hidratada, este volumen es consistente con la organización nodular.

MODELO DE DONA PARA EL ASA . Criterios para el modelo.

De acuerdo con los datos presentados anteriormente, es posible construir un modelo para el ADN del espermatozoide, entre la unión de las protaminas y la organización en dominios de asa, los criterios para el modelo propuesto por Ward (1993)¹⁴², son dos:

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

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

PRIMER PASO: Reemplazo de histonas por protaminas.

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

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

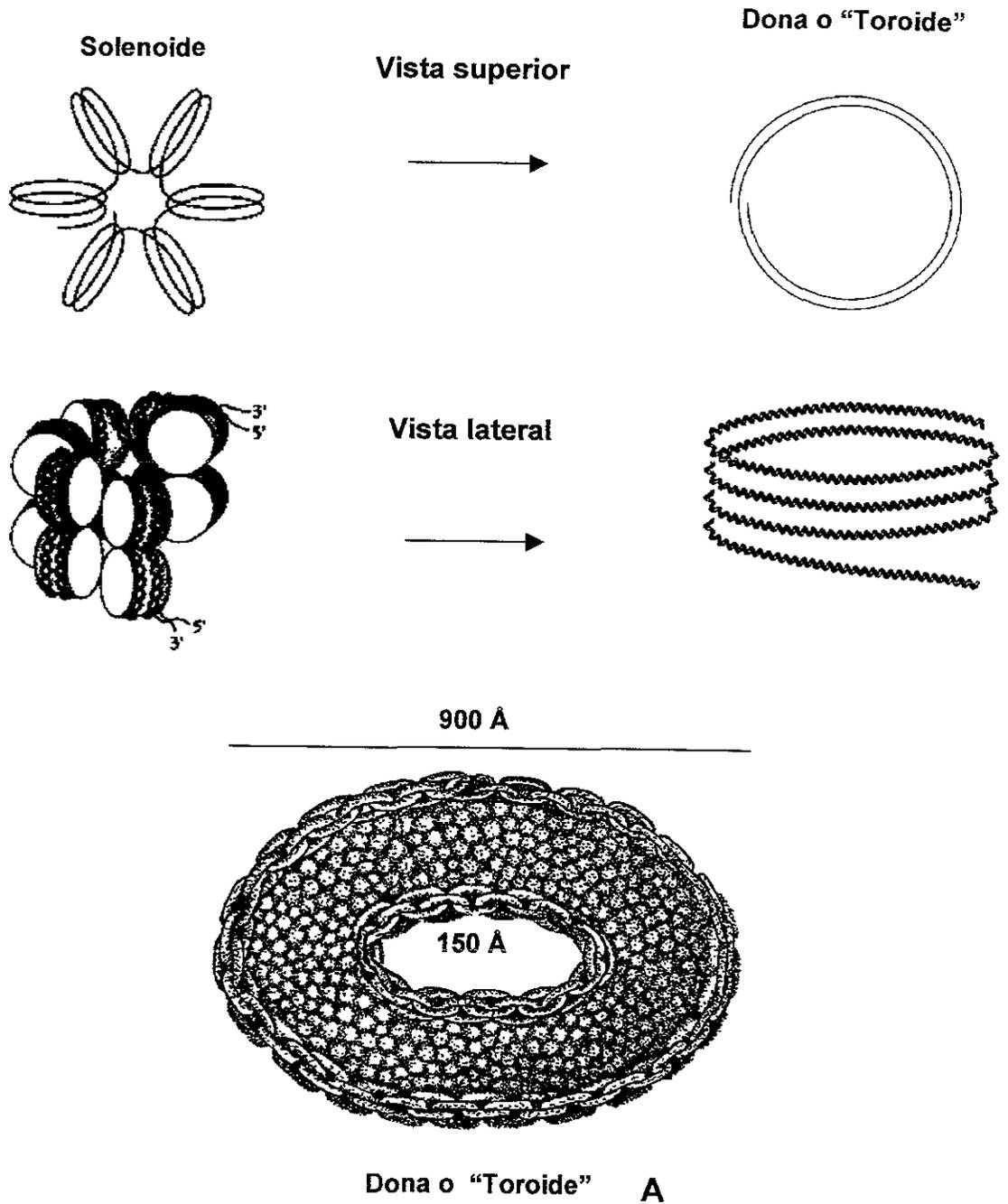


Figura 7. Modelo propuesto para la transformación de solenoide a dona (totoide), cuando se realiza El recambio de histonas por protaminas. Adaptado de Ward 1993¹⁴². La figura A es un dibujo basado en una fotografía de microscopía electrónica de Hud 1993¹⁴⁹.

del ADN unido con protaminas, podrían unirse uno con otro por fuerzas de van der Waals, como propuso Balhorn¹²³ (Figura 7).

Este primer paso del modelo predice que el ADN del espermatozoide, tiene una ligera superhélice negativa con un grado de 2/13 ó 15% del ADN unido a histonas, lo que coincide con lo reportado por Risley et al (1986)¹³² y Ward et al (1989)¹³³, aunque debe reconocerse que los métodos usados no son lo suficientemente sensibles para distinguir entre la ausencia de superhélice, con un decremento del 85%¹⁴². Tal ajuste en la regulación de la densidad de superenrollamiento del ADN, durante la espermatogénesis, requiere de la presencia de una topoisomerasa. Morce-Gaudio y Risley (1991)¹⁴⁷, demostraron que la topoisomerasa II, está presente en todos los tipos celulares que forman la secuencia de la espermatogénesis y la espermiogénesis, excepto en el espermatozoide maduro.

Finalmente el reemplazo focal de las histonas por protaminas, predicho por este modelo, es consistente con el primer modelo de Risley et al (1986)¹³², quienes sugieren que los dominios de superenrollamiento pueden servir como unidades estructurales de transición durante la espermatogénesis.

SEGUNDO PASO. Condensación del dominio de asa del ADN.

El siguiente paso del modelo es la formación de la estructura circular vista por microscopía de fuerza atómica (AFM)¹⁴⁶, en la cromatina de espermatozoide. El modelo propuesto para cada una de estas estructuras representa un dominio de asa de ADN colapsado. La comparación de la configuración de solenoide y del núcleo del espermatozoide, está representada en la Figura 8, para un dominio de asa de 47 Kilopares de bases, promedio reportado para espermatozoide de hamster¹³³. Cada 39 vueltas del solenoide (cada vuelta del solenoide es igual a 13 superenrollamientos de ADN), en el par de dominios de asa, eventualmente llegan a ser dos círculos espirales de ADN, cuando son reemplazadas las histonas por las protaminas. En la configuración de dona estos círculos de ADN unidos a protaminas de cada brazo del asa, son colapsados en un nódulo de forma de dona con un diámetro de alrededor de 65 nm.

Este modelo también produce cambios concomitantes con la relación entre el ADN y la matriz nuclear. Primero algunos puntos durante la espermatogénesis (no se sabe aún si antes, después o durante el reemplazo por las protaminas), el número de sitios de anclaje para el ADN puede aumentar o disminuir el tamaño del dominio de asa^{133,148}. La matriz nuclear puede participar en el acomodamiento de la cromatina condensada, esta predicción es consistente con la condensación del núcleo del espermatozoide durante la espermatogénesis.

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

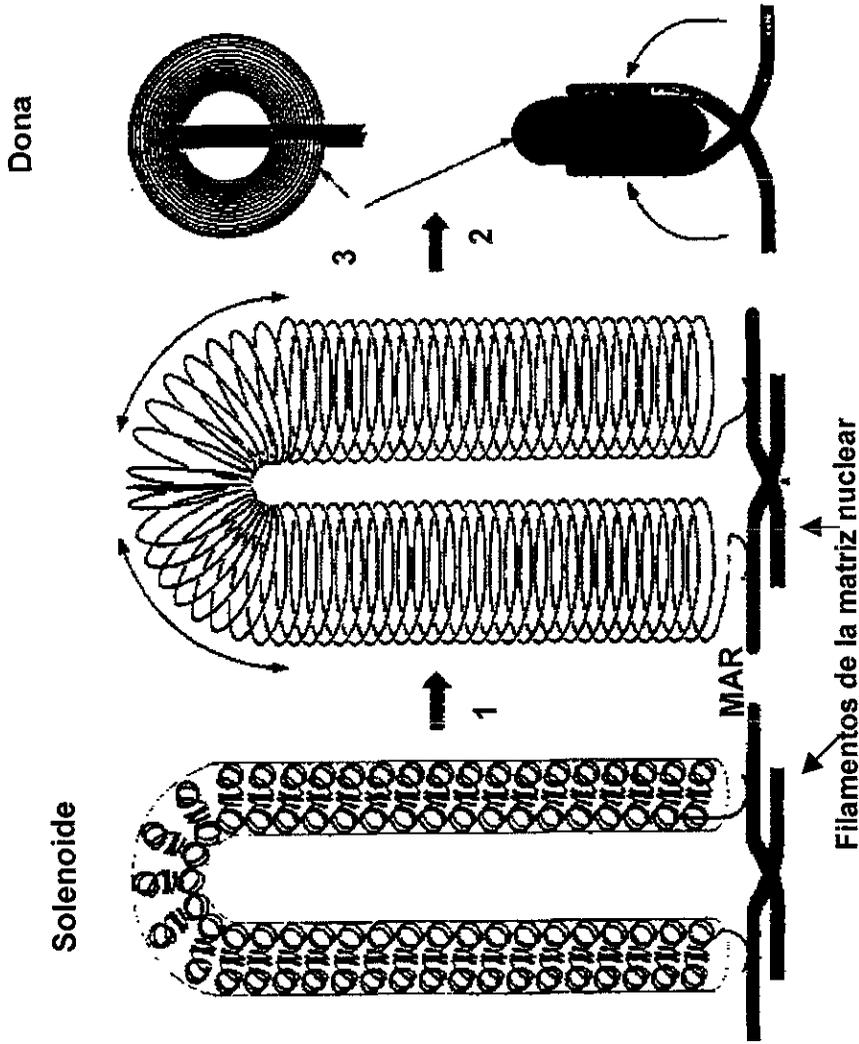


Figura 8. Modelo equivalente al solenoide en el asa del ADN de espermatozoide. El modelo está hecho para un asa de 47 Kpb de largo. En la estructura de dona los círculos de ADN unidos a protaminas, son colapsados dentro de una estructura de forma toroidal haciendo 72 círculos de ADN con un diámetro promedio de 65 nm. El esquema del centro es únicamente didáctico y no se cree que sea real. Este modelo no considera proteínas de transición. Adaptado de Ward 1993.

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

MAR Sitios de anclaje a la matriz nuclear

32.5 nm y una altura de 25 nm¹⁴². Tal estructura ha sido demostrada por Hud et al 1993¹⁴⁹, usando ADN de timo de ternera y reasociándolo *in vitro* con protaminas extraídas de espermatozoides de toro, hamster y ratón y protaminas comerciales de salmón. Al observar los productos de la reasociación concluyen que la cromatina del espermatozoide está empaquetada en una unidad fundamental de aproximadamente 900 Å de diámetro externo, 200 Å de ancho y un diámetro interno de 150 Å, a la que denominan “toroide” (Figura 7A).

Otros investigadores han propuesto “toroides”, de tamaño similar cuando el ADN es condensado por varios cationes^{150,151}. Dentro de estos estudios ha sido estimado que cada “toroide”, contiene aproximadamente 60 Kpb de ADN¹⁵¹. Esto nos lleva a preguntar como la molécula de ADN del largo de un cromosoma entero, puede ser empaquetada en “toroides”, cuando cada una contiene 60 Kpb de ADN. Mientras un solo “toroide”, podría representar la unidad elemental de empaquetamiento del ADN, la condensación genómica podría ser completada por la compactación local del ADN dentro de los “toroides”, con regiones no enrolladas de ADN, actuando como eslabones entre vecinos. Considerando los cálculos del contenido de ADN de estos “toroides” y el tamaño del genoma haploide de los mamíferos, cada núcleo de espermatozoide contiene alrededor de 50,000 “toroides” fuertemente empaquetados¹⁴³.

El modelo de dona permite al ADN del espermatozoide estar altamente empaquetado, comparado con la relativamente abierta configuración del ADN de la célula somática, en el mismo nivel de organización y al mismo tiempo le permite estar organizado en una discreta unidad funcional, el dominio de asa (Figura 9).

UNIDADES DE EMPAQUETAMIENTO.

A lo largo del tiempo se han propuesto algunas unidades de empaquetamiento para el ADN del espermatozoide, que podrían ser el equivalente a nucleosomas en algunos casos. En 1993 Allen et al. (1993)¹⁵², utilizando AFM encuentran una organización nodular para cromatina de toro, ratón y rata, estos nódulos parecen tener una forma elipsoidal de 15 a 25 nm de grosor y 50 a 100 nm de diámetro. Al mismo tiempo, Hud et al¹⁴⁹, proponen usando AFM que la unidad fundamental de empaquetamiento de la cromatina del espermatozoide de los mamíferos (toro) es un toroide de ~ 900 Å de diámetro externo, 200 Å de grosor y con un diámetro interno de 150 Å. Haaf y Ward (1995)¹⁵³ mediante hibridización fluorescente *in situ* en ratón y humano sugieren que una discreta subestructura nodular de < 300 nm de diámetro, podría representar la unidad básica de empaquetamiento (BPU) de la cromatina del espermatozoide de los mamíferos. Allen en 1996¹⁵⁴, encuentra en cromatina de espermatozoides humanos, una larga estructura nodular con un diámetro promedio de 98 nm, y también compuesta de pequeñas partículas parecidas a nucleosomas que se observan formando cadenas lineares cerca del perímetro nuclear.

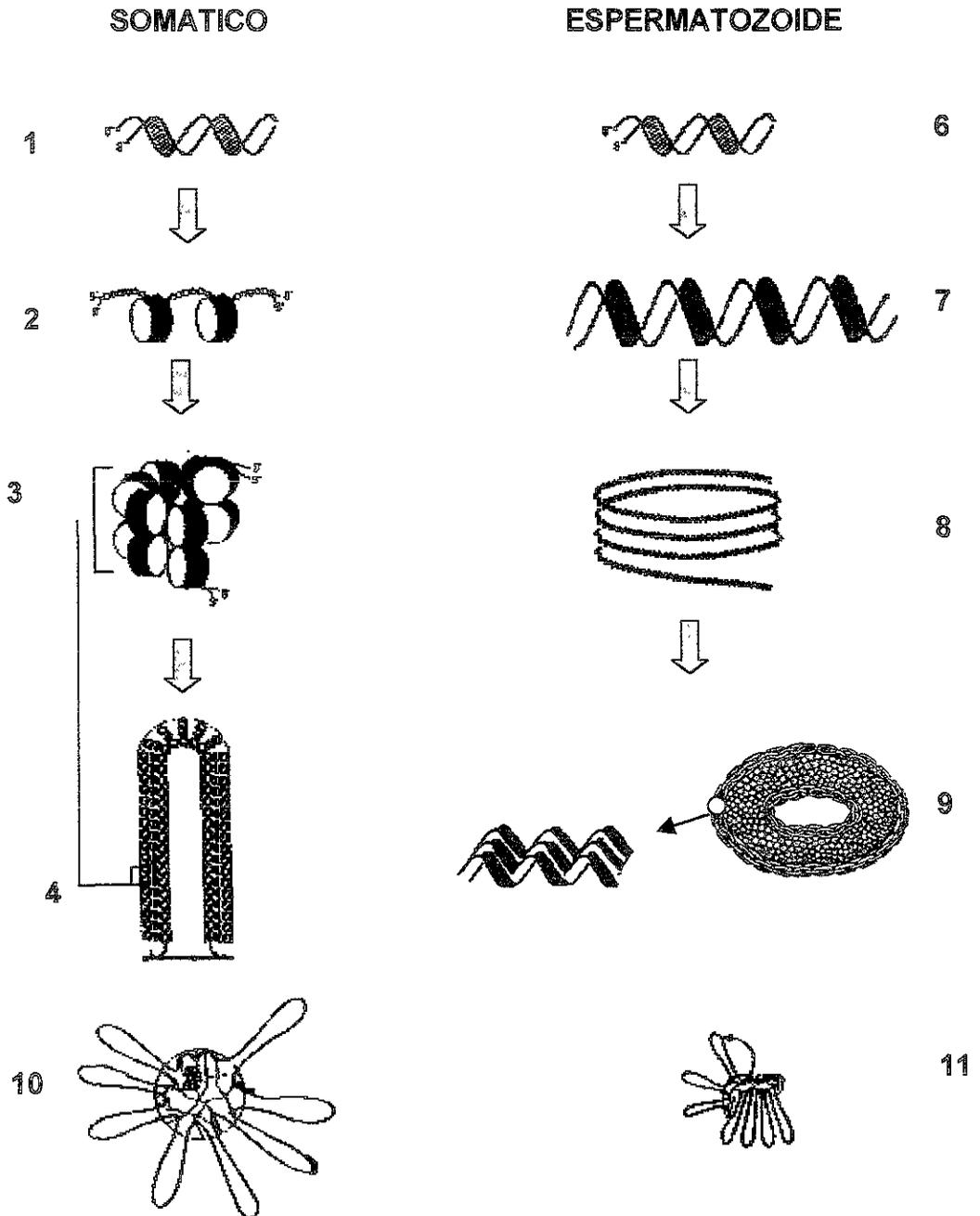


Figura 9. Comparación del empaquetamiento somático y espermático de ADN.

1. ADN Somático	6 ADN espermático
2 Collar de perlas integrado por nucleosomas	7 Protaminas unidas al ADN
3 Solenoide (6 nucleosomas por vuelta)	8 Círculos concéntricos
4 Solenoide cada 600 pb se ancla a la matriz	9 Dona o "toroide"
5 Los genes activos se asocian a la matriz formando asas	10 El ADN se une a la matriz
Adaptado de Ward 1993 ¹⁴² .	11 Las asas son más pequeñas

Este último reporte debe considerarse sin olvidar que el espermatozoide de humano mantiene un 15% de su cromatina empaquetada en nucleosomas¹⁵⁵, que la digestión de núcleos de espermatozoides humanos y de cerdo con DNAsa 1 y Nucleasa micrococcica, muestran que el gen IGF-2 (Factor de crecimiento insulinoide), en ambas especies es retenido en nucleosomas tipo somático, que están fuertemente empaquetados con una periodicidad de 150 pb¹⁵⁶.

En toro¹⁵⁷ y ratón¹⁵⁸, tanto las secuencias repetitivas de ADN como los genes que codifican para proteínas están distribuidas en el núcleo de manera ordenada. Rhim et al (1995)¹⁵⁹, encuentran que en el ratón los genes para epsilon y gama globina, los cuales están activos en la formación del saco embrionario, están contenidos en regiones asociadas a histonas en el espermatozoide y que los genes para beta y delta globina que no son empleados en la formación del saco están asociados a proteínas no histónicas. La formación de dominios de asa por la matriz nuclear del espermatozoide es gene específico y el patrón de enrollamiento de los cromosomas está altamente ordenado, particularmente con respecto a la posición de los telómeros y centrómeros¹⁶⁰.

IMPLICACIONES DE UN ADECUADO EMPAQUETAMIENTO DE LA CROMATINA DEL ESPERMATOZOIDE

Balhorn et al (1988)¹⁶¹, y Belokopytova et al (1993)¹⁶², reportan que los testículos de algunos pacientes infértiles, producen un elevado número de espermatozoides con cabezas largas que contienen menor cantidad de HP2 (Proteína de transición humana) que los pacientes fértiles, la afinidad de HP²+HP3 por el ADN decrece considerablemente en estos pacientes. En algunos hombres infértiles se ha reportado una reducción en el contenido de P2 en relación con P1 (incremento en la relación P1/P2), debido al incompleto procesamiento del precursor de P2 en humanos¹⁶³. Estos datos sugieren que la familia P2 podría realizar una función que podría ser esencial para la fertilización.¹⁶¹

Algunos casos de infertilidad podrían estar relacionados con disturbios en el reemplazo de histonas por protaminas durante la espermatogénesis¹⁶⁴ y el ADN del núcleo de espermatozoides de ratón con una dieta deficiente en zinc fue menos resistente a la desnaturalización *in situ* indicando cambios en la cromatina¹⁶⁵, se conoce que la familia de P2 tiene alta afinidad por el zinc y que puede proveer una adecuada conformación vía la correcta unión de la protamina con el ADN. Se ha mostrado que para una fertilización normal y un adecuado desarrollo embrionario, se requiere una adecuada estructura de la cromatina del espermatozoide. Existen numerosos reportes acerca de algunos problemas de anomalías en la cromatina del espermatozoide que pueden influir en la habilidad fertilizante del espermatozoide¹⁶⁶ (Cuadro 5).

Cuadro 5. Repercusiones de la anormal estructuración de la cromatina del espermatozoide en la reproducción.

Problema clínico	Alteración de la cromatina del espermatozoide	Referencia
Hipofunción de las vesículas seminales	Alta estabilidad de la cromatina	167
Bajos niveles de fructuosa asociados a bajo volumen seminal	Alta estabilidad de la cromatina	168
Espermatozoides de cabeza redonda	Bajos niveles de P1 y P2 y un inusual nivel de precursor de protaminas	169
Espermatozoides con morfología y movilidad adecuadas	Numerosos defectos en la cromatina	170
Infertilidad como resultado de pérdida temprana de preñez	Anormalidades de la cromatina	171
Infertilidad masculina	Disturbios en el reemplazo de histonas por protaminas	164
Elevada temperatura escrotal en toros	Reducción de la estabilidad de la cromatina, tanto en espermatozoides epididimarios como testiculares	172
Alta viscosidad del semen	Alta estabilidad de la cromatina	173
Exposición crónica a Plomo	Alteración de la estructura de la cromatina	174
Exposición a 12.5 Rads de rayos X	Incremento en la susceptibilidad a la desnaturalización del ADN	175
Exposición a 60 Rads de rayos X	Espermatozoides con cabezas anormales	
Estrés calórico en escroto	Disminución de los enlaces disulfuro en las protaminas	176
Inhalación de 1,3 Butadieno	Alteración tanto de la población celular como de la cromatina	177

REASOCIACION.

Los experimentos de reasociación de ADN-histonas y ADN-protaminas¹⁴⁹ han sido utilizados como una herramienta que permite establecer la forma en que se asocia el ADN con las proteínas nucleares.

La cromatina reasociada con una porción de histonas seleccionadas, muestra un patrón de digestión muy similar a la cromatina nativa^{33,178}. Germond et al (1976)¹⁷⁹, reasociaron minicromosomas de SV-40, obteniendo estructuras muy similares a los mini-cromosomas nativos. Laskey et al (1977)¹⁸⁰, usando un extracto libre de células de *Xenopus leavis*, reasociaron nucleosomas con DNA de SV-40, sin emplear diálisis salina.

Tatchell y van-Holde (1977)¹⁸¹, reasocian histonas con ADN purificado, a través de una diálisis salina sucesiva, en la que se disminuye la concentración de NaCl, desde 2M hasta 0.5M y Tris (Trishidroximetilamino) 10mM- EDTA (Acido etilendiaminotetracético) 0.7mM pH 7.2 y compararon velocidades de sedimentación, contenido de histonas, parámetros de dicroísmo circular, desnaturalización térmica, patrón de digestión con nucleasa micrococcica, DNAsa1 y tripsina, concluyendo que todos estos parámetros son similares a los de la cromatina nativa.

Los estudios de reasociación, no solo han permitido estudiar la forma en que se ensamblan los nucleosomas, también han permitido conocer, por ejemplo, la energía libre de unión entre histonas y diferentes secuencias de ADN¹⁸², el daño que causa la luz ultravioleta en la superficie de las histonas¹⁸³ y el reensamble de genes¹⁸⁴, entre otras cosas.

Hud et al (1993)¹⁴⁹, reasociaron protaminas aisladas y purificadas de algunos mamíferos y protaminas comerciales de salmón con ADN de timo de ternera en un amortiguador Tris salino, empleando la mezcla para analizarla en microscopía de fuerza atómica, encontrando una estructura toroidal.

Para corroborar que la reasociación se llevó a cabo, el método más sencillo es el empleado por Fletcher et al (1994)¹⁸⁵, que consiste en realizar al gel de agarosa una doble tinción, con bromuro de etidio para localizar el ADN y con azul de Coomassie para ubicar a las proteínas, al comparar ambas tinciones si la reasociación fue exitosa se empalman sin ningún problema.

Después de digerir con las nucleasas se pueden separar los productos con el uso de gradientes isocinéticos que permiten que las moléculas de igual densidad se muevan a la misma velocidad¹⁸⁶.

El anaranjado de acridina (AO) produce fluorescencia verde, cuando se une a ácidos nucleicos de doble hebra, indicando un monómero de AO intercalado entre bases paralelas en una hélice expandida de una doble hebra de ADN y fluorescencia roja, cuando se une a ácidos nucleicos de una hebra, indicando un enlace iónico entre polímeros de AO y una simple hebra de ADN^{187,188,189,190}.

En el presente trabajo se compararán las características espectrofotométricas de la cromatina y el ADN obtenido de células de hígado con la cromatina y el ADN obtenidos de espermatozoides eyaculados de bovino. También se estudiarán posibilidades de asociación entre el ADN somático y espermático con histonas somáticas para formar nucleosomas y las propiedades estructurales de los nucleosomas obtenidos de esta forma. Finalmente se estudiarán las características fluorométricas de los productos obtenidos por la interacción *in vitro* de ADN somático y espermático con protaminas de salmón y de bovino. Buscando con esto demostrar si las características fisicoquímicas del ADN del espermatozoide juegan un papel importante en la *secuencia de eventos, que se realizan durante la condensación de la cromatina*. Lo que permitirá en el futuro la aplicación de los resultados del presente trabajo para incrementar los parámetros de calidad en la evaluación del semen, la evaluación de los núcleos espermáticos para su empleo en las técnicas de fertilización por inyección intracitoplásmica del núcleo del espermatozoide (ICSI), en la propuesta de técnicas para la suspensión de la fertilidad del espermatozoide con el fin de contar con toros marcadores sin el empleo de técnicas quirúrgicas, control de la natalidad humana y la protección de las células germinales en los tratamientos de quimioterapia y radioterapia.

HIPOTESIS

La estructuración de la cromatina del espermatozoide de los mamíferos, está determinada por las características bioquímicas de su ADN.

OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar si las características del ADN del espermatozoide, participan en la estructuración característica de la cromatina de éste.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

Estudiar la cinética de la formación de nucleosomas, por la incubación de ADN somático y espermático con proteínas histónicas de hígado de bovino.

Estudiar las condiciones necesarias para constituir un complejo semejante al encontrado en el núcleo del espermatozoide, mediante la incubación de ADN espermático con protaminas de bovino y salmón.

Estudiar el tipo de estructuración nucleoproteica que se produce durante la interacción del ADN somático con protaminas de bovino y salmón.

CAPITULO II MATERIAL Y METODOS

Los reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co., JT Baker SA de CV., Merck Chem Co., Bio-Rad laboratorios, ICN, Flow. Labs. Boehringer Mannheim.

MATERIAL BIOLÓGICO: El hígado de bovino fue obtenido de animales sanos poco después de su sacrificio en el Rastro Frigorífico de Los Reyes, La Paz, perfundido con una solución isotónica de NaCl fría y transportado al laboratorio en hielo. El semen fue obtenido de bovinos sanos de fertilidad comprobada, por el método de vagina artificial. Una parte de las muestras se obtuvieron de los animales del CEPIPSA Topilejo de la UNAM y otros de establos de la zona de Texcoco, Estado de México. El semen se transportó a 4°C; Los espermatozoide fueron recuperados por centrifugación a 1,000 x g durante 15'. Los espermatozoides fueron lavados dos veces con una solución Krebs Ringer pH 7.4 libre de calcio, y el botón final fue resuspendido en el mismo amortiguador con 0.5% de dodecil sulfato de sodio (SDS) para eliminar cualquier contaminación de células somáticas. Los espermatozoides fueron lavados por centrifugación tres veces con un amortiguador de Tris 0.1 M pH 8.0.

Extracción y caracterización de ADN. Los núcleos del hígado bovino fueron extraídos por el método de Marzluff y Huang (1984)¹⁹¹, fueron resuspendidos en un amortiguador de Tris 0.15 M pH 8.0, conteniendo 0.015 M EDTA y 2% de SDS. La suspensión fue incubada con agitación por 30' a temperatura ambiente, después se adicionó NaCl para obtener una concentración final 1.0 M y el ADN fue extraído y purificado por el método de fenol de Marmur (1961)¹⁹². El ADN del espermatozoide fue obtenido y purificado por el método de Marmur (1961)¹⁹², modificado por Hernández-Pérez et al (1978)¹²². La concentración de ADN fue determinada por el método de la difenilamina de Gyles y Myers (1961)¹⁹³. La pureza del ADN fue determinada por sus características de absorción a la luz ultravioleta.

La cromatina del espermatozoide de bovino, se aisló por el método de Marushige y Marushige (1974)¹⁹⁴. La cromatina de hígado de bovino fue preparada de los núcleos aislados¹⁹¹, por el método de Itzhaki y Cooper (1973)¹⁹⁵, repitiendo tres veces el proceso final de lavado. El contenido de proteínas de las muestras de cromatina fue determinado por el método de Lowry (1951)¹⁹⁶, usando protaminas de salmón (Cloruro de protamina grado V Chemical Co St Louis Mo), como estándar. La pureza de la cromatina fue determinada por sus características de absorción a la luz ultravioleta.

Reconstitución de nucleosomas. Se utilizó el método de Tatchelly van Holde (1974)¹⁸¹, enriqueciendo la mezcla de histonas y ADN con Histona H1 (Histone type II-SS Sigma Chemical

Co), el ADN purificado de hígado y espermatozoide fue mezclado en el porcentaje de peso requerido y dializado a 4°C, contra cuatro soluciones de NaCl, con disminución sucesiva de la fuerza iónica (1.5, 1.0, 0.75 y 0.5 M) y finalmente contra dos cambios de Tris 10 mM- EDTA 0.7mM pH 7.2. Cada diálisis fue puesta en agitación continua durante 4 horas. La concentración de ADN en las mezclas de reconstitución fue normalmente de 25 µg/ml. Para separar los nucleosomas reconstituídos de cualquier remanente de ADN o histonas, se concentró el material empleando ultrafiltración en Amicon (modelo 12 con membranas para peso molecular de 10), se recobró el 90 % del material que absorbe a 260 nm.

La digestión de nucleosomas reconstituídos con DNAsa 1 y nucleasa micrococcica, para producir fragmentos de nucleosomas reconstituídos tanto de ADN somático como espermático fue realizada siguiendo las técnicas previamente descritas por Noll (1977)¹⁹⁷ y Ballesteros et al (1988)¹⁹⁸ respectivamente. Para la digestión con DNAsa 1 fue usada una unidad de DNAsa 1 pancreática por cada 2µg de ADN en presencia de 4 nM Mg⁺², la digestión se realizó a una temperatura de 37°C durante 90'. Para la digestión con nucleasa micrococcica, la cromatina se incubó a 37°C durante 2' en presencia de 100 unidades de nucleasa por mililitro en un medio que contenía 4 mM Ca⁺². En ambos casos la reacción fue detenida por la adición de EDTA a una concentración final de 10 mM y enfriando en hielo^{181,197}. Los fragmentos obtenidos de la digestión fueron evaluados por electroforesis en agarosa y por sedimentación en gradientes isocinéticos.

La electroforesis de los fragmentos de cromatina, fue realizada de acuerdo al método de Fletcher et al (1994)¹⁸⁵, en geles de agarosa 1.2% y teñidos con bromuro de etidio. Las bandas de ADN fueron visualizadas utilizando luz ultravioleta de onda corta con una lámpara UVS-II.

Sedimentación isocinética de los nucleosomas nativos y reconstituídos. El concentrado de nucleosomas obtenidos después de la ultrafiltración en Amicon fue sometido a la digestión de DNAsa1, como se describió anteriormente. Los productos fueron cuidadosamente estratificados en un gradiente isocinético de 12 ml de sacarosa 5 – 25%¹⁸⁶ y centrifugados (4 horas a 35,000 rpm) usando un rotor SW-65. Posteriormente se colectaron fracciones de 0.25 ml iniciando por el botón del gradiente y fueron analizadas por la absorción UV a 260 nm¹⁹⁷.

Reasociado de ADN aislado de hígado y espermatozoide con protaminas purificadas. Las protaminas del espermatozoide de bovino fueron aisladas por el método de Balhorn et al (1977)¹⁹⁹ y purificadas en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)¹⁴⁹. Se obtuvieron protaminas de salmón (protamine-chloride grade V) de Sigma Chemical Co que fueron usadas sin una posterior purificación. La reasociación con las protaminas de salmón se realizó siguiendo el método propuesto por Hud et al (1993)¹⁴⁹, por la simple incubación de una mezcla de amortiguador Tris-salino, conteniendo protaminas y ADN purificado de hígado y espermatozoide a concentraciones iguales. Se analizaron las características fluorescentes del ADN aislado y purificado de hígado y espermatozoide, así como la cromatina reconstituída ADN-protaminas, después de la incubación

con anaranjado de acridina. Se incubaron dos microgramos de ADN o su equivalente en la cromatina reasociada durante 5 minutos en la oscuridad con 1 μg de AO. Las propiedades fluorescentes de la mezcla fueron analizadas en un espectrofluórometro (Perkin-Elmer LS50B), usando una longitud de onda de excitación de 502 nm.

Los resultados fueron analizados utilizando una computadora PC compatible y mediante el paquete estadístico SPSS. Los parámetros obtenidos para las cromatinas y los ácidos desoxirribonucleicos fueron comparados utilizándose el estadístico de "t" de Student's. Se obtuvieron las medias y desviaciones estándar tanto para ADN como para cromatina. Los gradientes isocinéticos fueron comparados utilizando el estadístico no paramétrico de U de Mann-Whitney.

CAPITULO III RESULTADOS.

La espectrofotometría de la cromatina aislada usada para este estudio, muestra que la relación de absorbancia 260/230 fue significativamente más alta ($p < 0.01$), en la cromatina espermática (1.7 ± 0.16 , $n=7$), que en la cromatina de hígado (1.31 ± 0.07 , $n=10$). Por otro lado, los valores espectrofotométricos obtenidos del ADN purificado no mostrarán diferencias entre el ADN obtenido del espermatozoide (2.22 ± 0.15) y el ADN obtenido del hígado (2.20 ± 0.13). La relación 260/280 fue un buen indicador de la pureza y del alto peso molecular del ADN aislado (figura 10).

La digestión de la cromatina reasociada con ADNh-histonas, con DNAsa1 o nucleasa micrococcica, produjo el patrón de fragmentos tipo polinucleosomal esperado (figura 11, líneas 1 y 2). El patrón electroforético en agarosa obtenido con cromatina reasociada con ADNepz-histonas, fue completamente diferente. Aunque cuando se digirió con nucleasa micrococcica, la cromatina reasociada con ADNepz-histonas produce algunas subunidades de tipo nucleosomal que tienden a ser tan pequeñas como las producidas cuando se uso ADNh-histonas y están acompañadas de fragmentos de 100 pb. Bajo la acción de la DNAsa1 muchos de los productos son de 100 pb, indicando un incremento en la susceptibilidad a la acción hidrolítica de ambas enzimas en el reasociado ADNepz-histonas, particularmente a la actividad de DNAsa1 (figura 11 líneas 5 y 6). Estas diferencias en la susceptibilidad de los reasociados a las enzimas, son confirmadas por los resultados obtenidos por el análisis espectrofotométrico de gradientes de sacarosa, de los productos obtenidos después de la incubación de las dos clases de cromatina reconstituida con DNAsa1 (figura 12).

Los datos espectrofluorométricos obtenidos por la interacción entre anaranjado de acridina (AO) y ADN aislado o cromatina reconstituida con protaminas se presentan en las figuras 13, 14 y 15. La tinción con AO de ADN purificado de alto peso molecular de hígado y espermatozoide, muestran diferencias significativas tanto en intensidad como en el espectro de fluorescencia. Los complejos AO-ADNepz (figura 14), fueron consistentemente más intensamente fluorescentes que los complejos AO-ADNh (figura 14) y muestra un significativo cambio de longitud de onda hacia el verde (máximo 521 nm contra máxima intensidad de fluorescencia 515 nm de AO-ADNh).

Se puede observar que dependiendo de la fuente de ADN, la tinción de la cromatina reasociada ADN-histonas, muestra diferencias altamente significativas en la intensidad de la fluorescencia. Los complejos ADNepz-histonas son casi dos veces más fluorescentes que los complejos ADNh-histonas (figura 13). En este caso no se observan diferencias significativas en los espectros de fluorescencia. Lo opuesto fue observado cuando el ADNh y el ADNepz, fueron reconstituídos con protaminas bovinas (figura 13), en este caso los complejos ADNh-protamina teñidos con AO fueron consistentemente más fluorescentes que los complejos ADNepz-protaminas y muestran un ligero cambio en el pico de fluorescencia. Finalmente no hay diferencias ni en la

intensidad ni en el espectro cuando se tiñeron con AO los reasociados ADNh-protaminas salmón y ADNepz-protaminas salmón (figura 15).

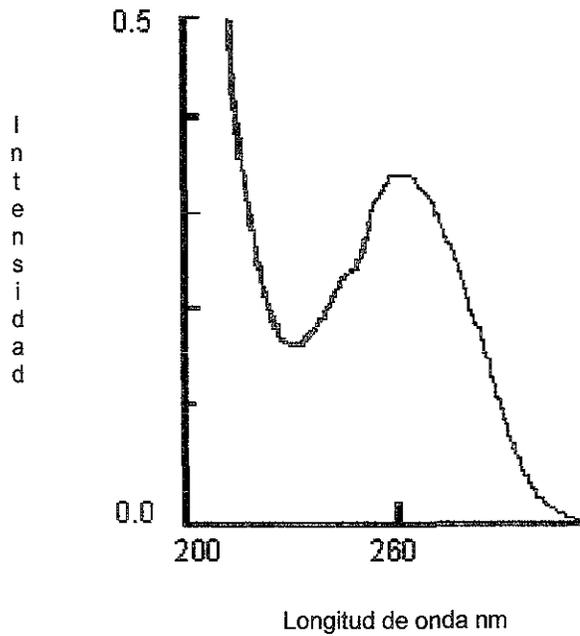


Figura 10 a. Espectro de absorción de ADN somático. n = 40
 $260/280 = 1.98 \pm 0.05$ $260/230 = 2.20 \pm 0.13$

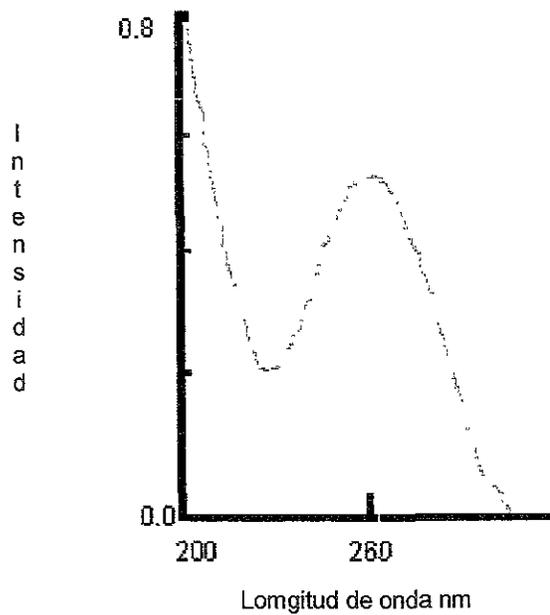


Figura 10b. Espectro de absorción de ADN espermático. n=40
 $260/280 = 2.0 \pm 0.01$ $260/230 = 2.22 \pm 0.15$
35

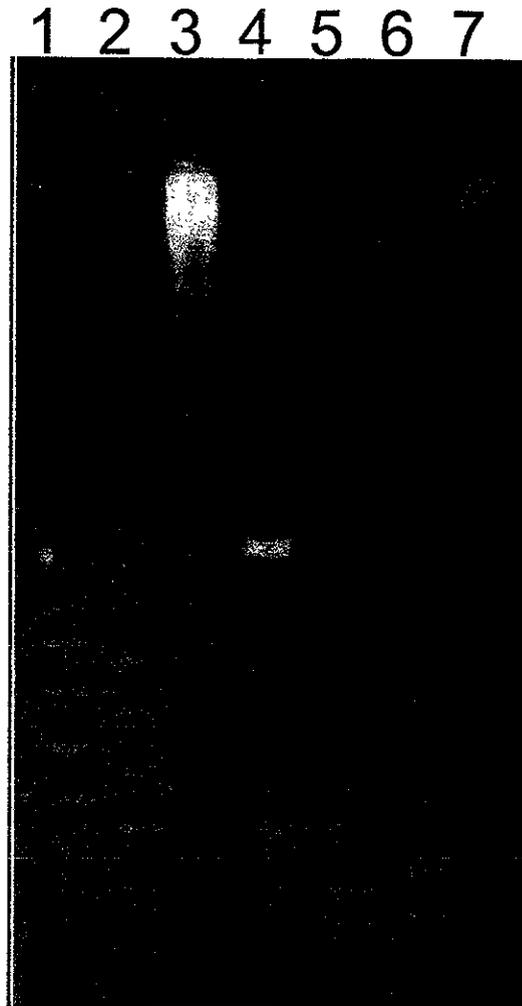


Figura 11. Electroforesis de los productos de digestión.
1.- ADNh-histonas digeridas con DNAsa1
2.- ADNh-histonas digeridas con nucleasa micrococcica
3.- ADNh-histonas sin digerir
4.- Ladder 100 pb
5.- ADNepz-histonas digeridas con DNAsa 1
6.- ADNepz-histonas Digeridas con nucleasa micrococcica
7.- ADNepz-histonas sin digerir
Representativo de 15 experimentos.

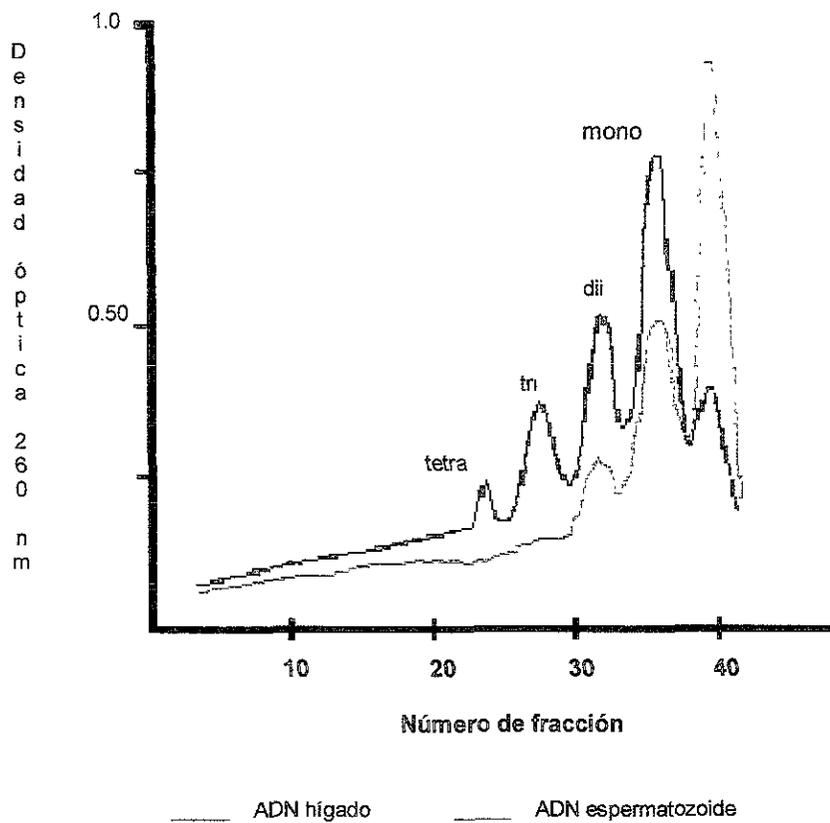


Figura 12. Gradiente isocinético de sacarosa 5 - 25%. Perfil de digestión con DNAsa1 de complejos ADN_h-histonas y ADN_{epz}-histonas. Mono, di, tri, tetra indican nucleosomas.

Se colectaron fracciones de 0.25 ml desde el botón del gradiente. Representativo de 10 experimentos.

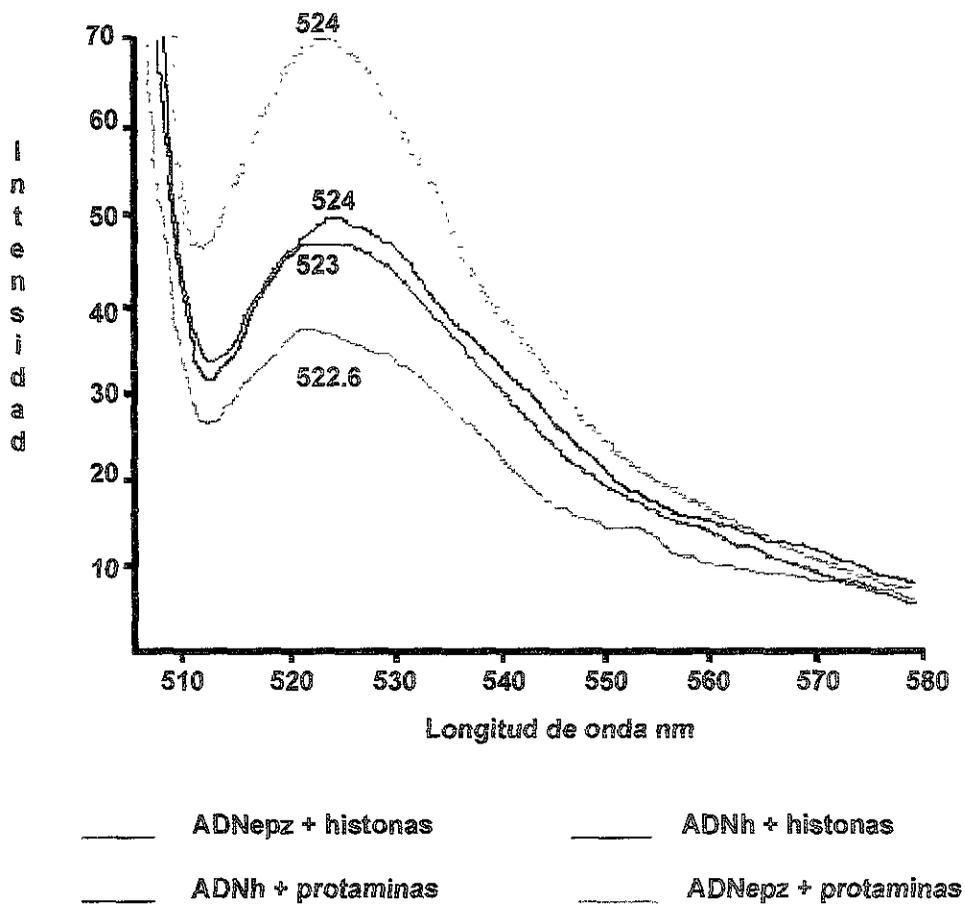


Figura 13. Espectros fluorométricos obtenidos por la interacción entre anaranjado de acridina y los reasociados *in vitro*. Longitud de onda de excitación 502 nm, abertura del slit 5. Espectrofluorómetro Perkin Elmaer LSB-50 Representativo de 15 experimentos.

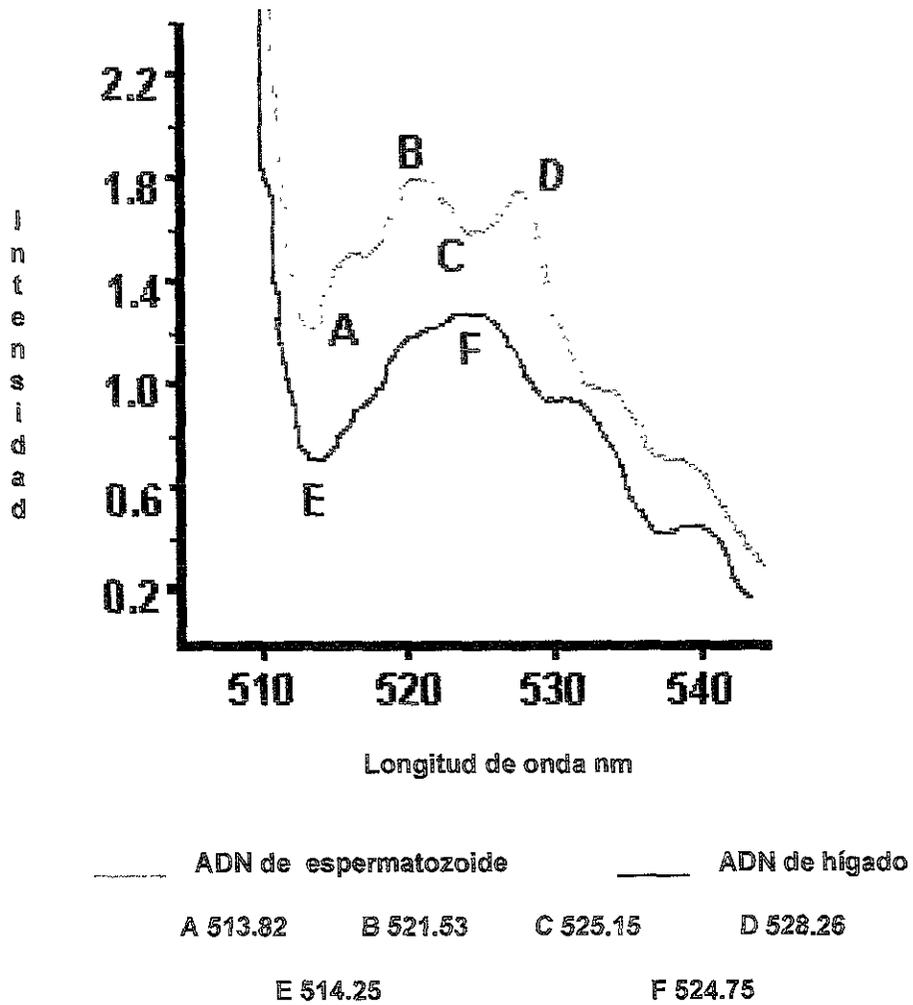
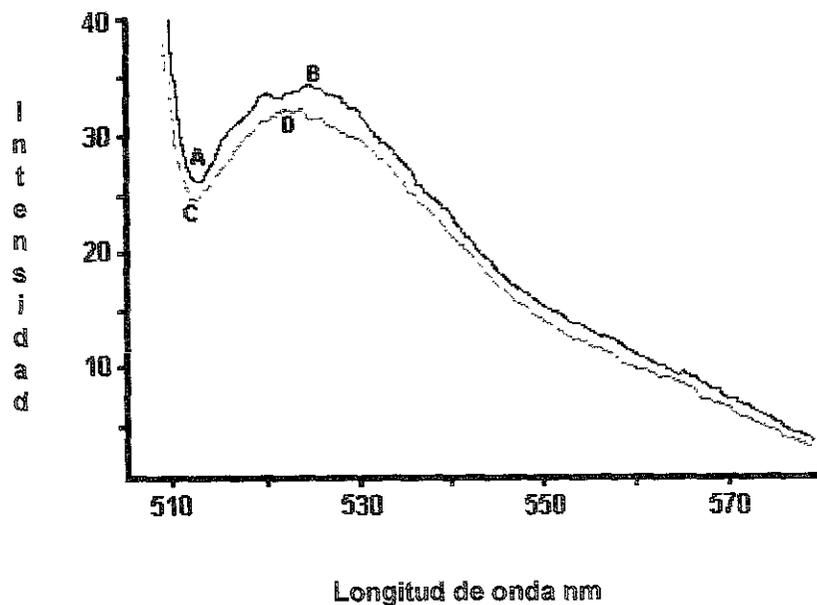


Figura 14. Espectros de ADN de hígado y ADN de espermatozoide, purificados y de alto peso molecular al interactuar con anaranjado de acridina. Representativo de 15 experimentos.



_____ ADNepz + protaminas salmón _____ ADNh + protaminas salmón
 A 512.61 B 524.91 C 512.55 D 523.21

Figura 15. Espectro obtenido de la interacción entre el anaranjado de acridina y el ADN aislado de hígado y espermatozoide reasociado con protaminas de salmón.

CAPITULO IV DISCUSION Y CONCLUSIONES.

La cromatina del espermatozoide ha estado sujeta a una extensiva investigación en los últimos años, se sabe que el ADN dentro del espermatozoide de algunos animales, tal como el erizo de mar²⁰⁰ y la rana²⁰¹, parece estar empaquetado en nucleosomas de manera similar a la encontrada en la cromatina somática. Por otra parte, en algunos peces, ciertos insectos, equinodermos y mamíferos, el ADN del espermatozoide está estructurado, en combinación con una clase especial de pequeñas proteínas básicas, de una manera casi cristalina, condensada más de seis veces que un cromosoma mitótico. En suma, el ADN del espermatozoide, para todos los propósitos prácticos, es bioquímicamente inerte.

Los espectros de fluorescencia obtenidos por la interacción del anaranjado de acridina, sugieren que el ADN somático y espermático pueden tener algunas diferencias estructurales importantes. El hecho de que el ADN del espermatozoide difiera substancialmente en sus características fisicoquímicas del ADN somático ha sido previamente indicado¹²². Estas diferencias estructurales pueden explicar algunas de las divergencias encontradas entre la manera en la cual el ADN somático y espermático interaccionan con la matriz nuclear durante la estructuración de la cromatina. El ADN de las células somáticas está organizado en dominios de asa, aproximadamente cada 60 a 100 Kb, (promedio en el cerebro 76 ± 11 Kb) y está negativamente superenrollado. Estas asas están ancladas en su base a la matriz nuclear. Los dominios de asa del núcleo del espermatozoide difieren de los dominios de las células somáticas del mismo animal en tres aspectos, primero, los dominios de asa del espermatozoide son 60% más cortos (largo promedio de ADN 46 ± 7 Kb), segundo, el ADN del espermatozoide está desprovisto de cualquier superenrollamiento detectable¹³³, tercero, el ADN del espermatozoide interactúa con la matriz nuclear de una manera específica¹⁸¹, formando una estructura con forma de "toroide", la cual ha sido denominada así por Ward (1993)¹⁴².

Se han propuesto algunos componentes y estructuras del espermatozoide, para participar en el proceso que da forma a la cabeza. A las protaminas se les atribuye como funciones inherentes tanto la condensación de la cromatina del espermatozoide como la forma del núcleo; excluyendo otros factores, a pesar de que algunos resultados no respaldan esta hipótesis^{202,203} y sustentan la idea de que la participación de las protaminas en el arreglo final del núcleo del espermatozoide podría ser secundario, y dependiente de la adecuada unión de las protaminas a la cadena de ADN¹⁹⁸. Freemont et al (1991)⁴² han enfatizado la importancia de comprender la naturaleza de la interacción ADN-proteínas, porque debe ser trascendental en muchos procesos fundamentales, incluyendo el empaquetamiento de la cromatina. Russell et al (1991)²⁰⁴, sugieren que las protaminas inducen la condensación de la cromatina solamente reforzando los cambios en la forma que son iniciados por la acción de los microtúbulos de la manchette y otros elementos

estructurales, como la teca perinuclear^{205,206}, y el calix^{207,208}, actuando en el núcleo de la espermátide. Bernardini et al (1992)²⁰⁹, de estudios hechos en rana, concluyeron que la forma de la cabeza del espermatozoide no puede ser realizada solamente por la espermátide, respaldando las hipótesis propuestas previamente^{210,211}, que la especialización ectoplásmica (actina), de las células de Sertoli participan en este proceso. Es posible proponer que la forma del núcleo del espermatozoide es determinada probablemente por la manera en la cuál participan todos los componentes bioquímicos internos en el ensamblaje²¹². Por lo tanto, es sorprendente que haya sido ignorado el papel por la estructura fundamental del ADN del espermatozoide.

Los resultados presentados acerca de la alta susceptibilidad de los nucleosomas reasociados con ADNepz-histonas, a la hidrólisis por parte tanto de la nucleasa micrococcica como de la DNAsa 1, correlacionan con los datos publicados previamente por Ballesteros et al (1988)¹⁹⁸ y muestran que el ADN del espermatozoide, cuando es sometido a las mismas condiciones de reconstitución de nucleosomas que el ADN de hígado, es incapaz de interactuar adecuadamente con las histonas, para formar estructuras similares a los nucleosomas somáticos normales. Weintraub (1983)²¹³, mostró que la estructura secundaria de ciertas secuencias de ADN (particularmente las que se relacionan con la región del promotor y finalizador), tienen diferente afinidad por las histonas nucleosomales, formando estructuras hipersensibles a la digestión de las nucleasas. Es por lo tanto posible sugerir que, las diferencias encontradas en la estructura primaria del ADN podrían darle la capacidad de interactuar específicamente con las protaminas durante el ensamblaje de la cromatina.

En muchas especies de mamíferos las histonas son completamente sustituidas por las protaminas, sin embargo en algunas especies como el humano, un importante porcentaje de histonas persiste. El 85% del ADN en la cromatina del espermatozoide del humano está empaquetado en nucleoprotaminas y el 15% en nucleohistonas¹⁵⁵, proponiendo que la estructura primaria del ADN participa en la determinación de los sitios que deben ser unidos con histonas o con protaminas, como lo muestran los trabajos de Banerjee y Smallwood (1998)¹⁵⁶, que muestran que tanto en cerdos como en humanos el gen para IGF-2, retiene los nucleosomas y que en los núcleos de espermatozoides humanos las secuencias cis-actina inicializadoras de la condensación de la cromatina, probablemente sean secuencias repetitivas de 400 pb, ricas en G-C. Esta especificidad de unión ADN-proteínas, debe ser aun más dependiente de la estructura del ADN en los animales en los cuales más de un tipo de protaminas participan en la organización de la cromatina del espermatozoide.

El anaranjado de acridina ha sido utilizado para marcar ácidos nucleicos en solución y en células intactas. El AA interacciona con ADN de doble hebra por el intercalamiento del colorante entre un par de bases dando una intensa coloración verde, cuando la unión del AA es con una sola hebra forma agregados de colorante mostrando una fluorescencia metacromática roja. La tinción

con AA también ha sido usada para estudiar la estructura de la cromatina del núcleo del espermatozoide de los mamíferos. Kosower et al (1992)²¹⁴, proponen que el color exhibido por el anaranjado de acridina, cuando se une a la cromatina del espermatozoide, está determinado por el estatus tiol-disulfuro de las protaminas asociadas al ADN, la cromatina teñida con acridina y que presenta una fluorescencia roja (640 nm), tiene una mala o deficiente estructuración, contrariamente cuando la unión de las protaminas al ADN es ajustada por la formación de una gran cantidad de enlaces disulfuro, la fluorescencia que se registra es verde (525-530 nm). Una vez que los enlaces disulfuro han sido establecidos en el espermatozoide maduro, la unión de colorantes intercalantes como la cromomisinina A, actinomycin D y anaranjado de acridina queda restringida, debido a que tales uniones requieren la distorsión de la hélice del ADN y la separación del par de bases adyacente al sitio de intercalamiento²¹⁵. En espermatozoides maduros, el intercalamiento de estos colorantes está restringido a un número limitado de sitios entre las regiones del ADN unidas por los segmentos de poliarginina o la molécula de protamina adyacente. Si aceptamos que la cinética de interacción ADN-protaminas debe ser esencialmente dependiente de la estructura del ADN, los resultados de unión con AA, podrían sugerir una vez más que la existencia de diferencias entre las estructuras del ADN de hígado y el ADN de espermatozoide¹²², deben participar en la organización de la cromatina¹⁹⁸.

La específica interacción entre las protaminas y un ADN con propiedades estructurales específicas podría ser esencial para la función espermática. Se sabe que las fallas en la adecuada organización de la cromatina del espermatozoide pueden ser un importante factor en la función reproductiva del macho, produciendo alteraciones como infertilidad, anomalías en la implantación y abortos tempranos. Los resultados de Jennings y Powell (1995)¹⁵⁸, implican que secuencias repetitivas y codificadoras de proteínas están distribuidas de manera específica en el espermatozoide y podrían jugar un papel importante en la estructuración de la cromatina. Los resultados obtenidos están de acuerdo con estos hechos, mostrando que cuando el ADN del espermatozoide interactúa con las protaminas forma un complejo más sólido que cuando el ADN de hígado interactúa con el mismo tipo de protaminas. La restricción esperada en la interacción entre el complejo ADNepz-protaminas y el colorante de intercalamiento se refleja en la baja intensidad de la fluorescencia inducida por el AA. Estos hallazgos pueden ser correlacionados con los resultados obtenidos por Hernández et al (1978)¹²², a través del análisis de reasociación cinética para ADN. Estos trabajos muestran la presencia de grupos específicos de secuencias repetitivas de nucleótidos en el ADN del espermatozoide, las cuales podrían ser importantes en la determinación de sitios específicos de unión entre el ADN y las protaminas.

El ADN en la cromatina somática es marcadamente accesible a moléculas grandes, 45% de los grupos fosfato están disponibles para unirse a polilisina. Contrariamente, en la cromatina del espermatozoide los grupos fosfato libres del ADN están casi ausentes¹⁹⁸. Los resultados obtenidos

por la interacción entre AA y la cromatina reasociada con ADN y protaminas soportan estos resultados mostrando que la interacción entre protaminas y ADN somático o espermático, resulta en la formación de complejos con diferente capacidad para interactuar con los fluorocromos. Desde este punto de vista, los resultados obtenidos por la reasociación entre ADN somático y espermático con protaminas de salmón, son particularmente importantes. La ausencia de diferencias entre la intensidad y/o el espectro de fluorescencia entre los complejos obtenidos bajo estas circunstancias con el ADN de hígado y el ADN de espermatozoide, permiten postular que las protaminas son claramente especie-específicas¹²³, apuntando hacia la necesidad de interacciones fisicoquímicas no ambiguas, entre el ADN y las protaminas para producir un empaquetamiento preciso de la cromatina.

Nuestros datos apoyan los resultados anteriores^{122,198} que establecen, desde el punto de vista fisico-químico, que el ADN del espermatozoide tiene importantes características estructurales que lo diferencian del ADN somático. Estas diferencias seguramente juegan un importante papel en la secuencia de eventos²¹⁶, que se realizan durante la condensación de la cromatina del espermatozoide. La determinación del mecanismo específico por el cual las propiedades particulares del ADN del espermatozoide participan en este proceso requiere futura investigación.

CAPITULO V BIBLIOGRAFIA

- 1.- Zubay G, Doty P. The isolation and properties of deoxyribonucleoprotein particles containing single nucleic acids molecules. *J Mol Biol* 1959;1:1-20
- 2.- Frambrough DM, Bonner J. On the similarity of plant and animal histones. *Biochem* 1966, 5:2563-2570
- 3.- Richards BM, Pardon JF. The molecular structure of nucleohistone (DNH) *Exp Cell Res* 1970; 62: 184-196.
- 4.- Hewish DR, Burgoyne LA. Chromatin sub-structure: the digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease *Biochem Biophys Res Commun*,1973; 52:504-510
- 5.- Rill RL, Van Holde KE. Properties of nuclease-resistant fragments of calf thymus chromatin *J Biol Chem* 1973;248:1080-1083
- 6.- Sahasrabudhe CG, Van Holde KE. The effect of trypsin on nuclease-resistant chromatin fragments *J Biol Chem* 1974;249:152-158
- 7.- Olins AL, Olins DE. Spheroid chromatin units (ν bodies) *J Cell Biol* 1973;59: 252a
- 8.- Woodcock CLF. Ultrastructure of inactive chromatin *J Cell Biol* 1973;59:368a
- 9.- Olins DE, Olins AL. Spheroid chromatin units (ν bodies) *Science* 1974 ;183:330-332
- 10.- Kornberg RDE. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. Chromatin structure is based on a repeating unit of eight histone molecules and about 200 DNA base pairs *Science* 1974;184:868-871
- 11.- Van Holde KE, Sahasrabudhe CG, Shaw BR. 1974a A model for particle structure in chromatin *Nucleic Acids Res* 1974a ;1:1579-1586
- 12.- Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating units *Cell* 1975;4:281-300

- 13.- Simon RH, Felsenfeld G. A new procedure for purifying histone pairs H2A + H2B and H3 + H4 from chromatin using hydrosylapatite *Nucleic Acids Res* 1978;5:3409-3426
- 14.- Rawn JD. *Bioquímica Vol II Interamericana Mc Graw-Hill 1ª ed 1989p*
- 15.- de Lange T, Shiule L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE. Calf and pea histone IV. II amino acid sequence of calf thymus histone IV presence of epsilon-N-acetyllysine. *J Biol Chem* 1969b;244:5669-5679
- 16.- Ogawa Y, Quagliarotti G, Jordan J. Structural analysis of the glycine-rich, arginine-rich histone 3 sequence of the amino-terminal half of the molecule containing the modified lysine residues and the total sequence *J Biol Chem* 1969 244:4387-4392
- 17.- Isenberg I. Histones (review) *Annu Rev Biochem* 1979;48:159-191
- 18.- Weischet WO, Allen JR, Riedel G, van Holde KE. The effects of salt concentration and H1 depletion on the digestion of calf thymus chromatin by micrococcal nuclease *Nucleic Acids Res* 1979;6:1843-1862
- 19.- Ohe Y, Iwai K. Human spleen histone H3 isolation and amino acid sequence *J Biochem* 1981;90:1205-1211
- 20.- Waterborg JH, Matthews HR. Patterns of histone acetylation in *Physarum polycephalum*. H2A and H2B acetylation is functionally distinct from H3 and H4 acetylation *Eur J Biochem* 1984;142:329-335
- 21.- Csordas A. On the biological role of histone acetylation *Biochem J* 1990;265:23-38
- 22.- Butler GC, Neelin JM. A comparison of histone from chicken tissues by zone electrophoresis in starch *Can J Biochem* 1961;39:485-491
- 23.- Panyim S, Chalkley R. A new histone found only in mammalian tissues with little cell division *Biochem Biophys Res commun* 1969;37:1042-1049
- 24.- Seyedin SM, Kistler WS. Isolation and characterization of rat testis H1t *J Biol Chem* 1980;258:5949-5954

- 25.- Lennox RW, Cohen LH. The histone H1 complements of dividing and non dividing cells of the mouse J Mol Biol Chem 1983;258:262-628
- 26.- Lennox RW. Differences in evolutionary stability among mammalian H1 subtypes. Implications for the roles of H1 subtypes in chromatin J Biol Chem 1984;259:669-672
- 27.- D'anna JA, Isenberg I. A complex of histones lib2 and IV Biochem 1973;12:1035-1043
- 28.- D'anna JA, Isenberg I. Interaction of renatured histones f3 and f2a1 Biochem Biophys Res Commun 1974;61:343-347
- 29.- Styer L, Bioquímica 3ª edición, Ed. Reverté SA 1988;pp 834
- 30.- Roark DE, Geoghegan TE, Keller GH. A two-subunit histone complex from calf thymus Biochem Biophys Res Commun 1974;59:542-547
- 31.- BurtonDR, Hyde JE, Walker ID. Histones f2a1 y f3 interact reversibly and cooperatively with DNA to form an equimolar complex in chromatin Febs Lett 1975;55:77-80
- 32.- Hyde JE, Walker ID. Covalent cross-linking of histone in chromatin Febs Lett 1975;50:150-154
- 33.- Camerini-Otero RD, Sollner-Webb B, Felsenfeld G. The organization of histones and DNA in chromatin: Evidence for an arginine-rich histone Kernel Cell 1976;8:333-347
- 34.- Boseley PG, Bradbury EM, Butler-Browne GS, Carpenter BG, Stephens RM. Physical studies of chromatin The recombinant of histone with DNA Eur J Biochem 1976;62:21-31
- 35.- Oudet P, Germond JE, Sures M, Gallwitz D, Bellard M, Chambon P. Nucleosome structure I: All four histones, H2a, H2b, H3 and H4 , are required to form a Nucleosome, but an H3-H4 alone Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1977;42:287-300
- 36.- Simon RH, Camerini-Otero RD, Felsenfeld G. An octamer of histone H3 and H4 forms a compact complex with DNA of nucleosome size Nucleic Acids Res 1978;5:4805-4818
- 37.- Karawajew L, Heymann S. Model considerations on nucleosome structure Studia Biophysica Berlín 1980;79:11-12

- 38.- Arents G, Burlingame RW, Wang BW, Love WE, Mourdrianakis EN. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:10148-10152
- 39.- Pruss D, Wolffe AP. Histone –DNA contacts in a nucleosome core containing a Xenopus 5Sr RNA gene Biochem 1993;32:6810-6814
- 40.- Hayes JJ, Tullius TD, Wolffe AP. The structure of DNA in a nucleosome Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:7405-7409
- 41.- Hayes JJ, Tullius TD, Wolffe AP. Histone contributions to the structure of DNA in the nucleosome Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:6829-6833
- 42.- Feemont PS, Lane AN, Sanderson MR. Structural aspects of protein–DNA recognition Biochem J 1991;278:1-23
- 43.- Kayne PS, Kim U, Han M, Mullen JR, Yoshizaki F, Grunstein M. Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in Yeast Cell 1988;55:27-39
- 44.- Greil W, Igo-Kemenes T, Zachav HG. Nuclease digestion in between and within nucleosome Nucleic Acids Res 1976;3:2633-2644
- 45.- Shawn BR, Herman TM, Kovacic RT, Beaudreau GS, van Holde KE. Analysis of subunit organization in chicken erythrocyte chromatin Proc Natl Acad Sci USA 1976;73:505-509
- 46.- Noll M, Kornberg RD. Action of Micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1 J Mol Biol 1977;109:393-404
- 47.- Strätling WH. Role of histone H1 in the conformation of oligonucleosome as a function of ionic strength Biochem 1979;18:596-603
- 48.- Woodcock CLF, Sweetman HE, Frado LL. Structural repeating units in chromatin Exp Cell Res 1976;97:11-19

- 49.- Jeong SW, Stein A. Micrococcal nuclease digestion of nuclei reveals extended nucleosome ladders having anomalous DNA lengths for chromatin assembled on non-replicating plasmids in transfected cells *Nucleic Acids Res* 1994;22:370-375
- 50.- Roth SY, Allis D. Chromatin condensation: does histone H1 desphosphorylation play a role? *TIBS* 1992;17:93-98
- 51.- Bolander FF. *Molecular endocrinology* Acad Press Inc 2da Ed Printed in USA 1994;pp
- 52.- Martian JKW, Paton AE, Bunich GJ, Olins DE. Nucleosome core have two specific binding sites for nonhistone chromosomal proteins HMG 14 and HMG 17 *Science* 1980;209:1534-1536
- 53.- Ausio J. Structure and dynamics of transcriptionally active chromatin *J Cell Sci* 1992;102:1-5
- 54.- Tremethick DJ, Drew HR. High mobility group proteins 14 and 17 can space nucleosomes in vitro *J Biol Chem* 1993;268:11389-11393
- 55.- Reeves R, Chang P. Investigations of the possible functions of glycosylation in the high mobility group proteins: Evidence for a role in nuclear matrix association *J Biol Chem* 1983;258:679-687
- 56.- Bianchy F, Rousseaux-Prevost R, Sautiere P, Rousseaux P. P2 protamines from human sperm are zinc-finger proteins with one Cys2/His2 motif *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182:540-547
- 57.- Lee KLD, Pentecost BT, D'anna JA, Tobey RA, Gurley LR, Dixon GH. Characterization of DNA sequences corresponding to three distinct HMG-1 mRNA species in line CHO Chinese hamster cells and cell cycle expression of the HMG-1 gene *Nucleic Acids Res* 1987;15:5051-5068
- 58.- Yoshida M. High glutamic and aspartic region in nonhistone protein HMG (1+2) Unwinds DNA double helical structure *J Biochem (Tokyo)* 1987;101:175-180
- 59.- Paull TT, Haykinson MJ, Johnson RC. The nonspecific DNA-binding and DNA-bending proteins HMG 1 and HMG 2 promote the assembly of complex nucleoprotein structure *Genes Dev* 1993;7:1521-1534
- 60.- Poccia DL. Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early development *Int Rev Cytol* 1986;105:1-65

- 61.- Kasinsky HE. In "Histone and other basic nuclear proteins" L Hnilica, G Stein, J Stein Eds
CRC Press, Boca Raton, Florida 1989
- 62.- Kossel A. "The protamines and Histones", Longmans Green, New York 1928
- 63.- Felix K. Protamines *Advances Protein Chem* 1960;15:1-56
- 64.- Bloch DP. A catalog of sperm histones *Genetics Suppl* 1969;61:93-112
- 65.- Coelingh JP, Monfoort CH, Rozijn TH, Gevers LJA, Schiphof R, Steyn-Parve EP, Braunitzer G,
Shrank B, Ruhfus A. The complete amino acid sequence of the basic nuclear protein of bull
spermatozoa *Biochim et Biophys Acta* 1972;285:1-14
- 66.- McKay DJ, Renaux BS, Dixon GH. Human sperm protamines. Amino-acid sequence of two
forms of protamine P2 *Eur J Biochem* 1986;156:5-9
- 67.- Bellvé AR, McKay DJ, Renaux BS, Dixon GH. Purification and characterization of mouse
protamines P1 and P2 Amino acid sequence of P2 *Biochem* 1988;27:2890-2897
- 68.- Bealiche D, Loir M, Kruggle W, Sautiere P. Isolation and characterization of two protamines St1
and St2 from stallion spermatozoa and amino acid sequence of the major protamine St1 *Biochim
Biophys Acta* 1987;913:145-149
- 69.- Ammer H, Henschen A. Primary structure of rabbit sperm protamine, the first protamine of its
type with an aberrant N-terminal *FEBS* 1988;242:111-116
- 70.-Loir M, Lanneau M. Transformation of ram spermatid chromatin *Exp Cell Res* 1978;115:231-
234
- 71.- Balhorn R. Mammalian protamines structure and molecular interactions in: KW Adolph De
Molecular Biology of chromosome function Springer-Verlag New York 1989;pp366-395
- 72.- Elsevier SM. Messenger RNA encoding basic chromosomal proteins of mouse testis *Dev Biol*
1982;90:1-12

- 73.- Domenjoud L, Fronia C, Uhde F, Engel W. Sequence of human protamine 2 cDNA *Nucleic Acids Res* 1988;16:7733-7735
- 74.- Yelick PC, Balhorn R, Johnson PA, Corzett M, Mazrimas JA, Kleene KC, Hecht B. Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not *Mol Cell Biol* 1987;7:2173-2179
- 75.- Johnson PA, Peschon JJ, Yelick PC, Palmiter RD, Hecht NB. Sequence homologies in the mouse protamine 1 and 2 genes *Biochim Biophys Acta* 1988;950:45-53
- 76.- Hecht NB. In "histone and other basic nuclear proteins" L Hnilica, G Stein and J Stein eds CRC Press, Boca Raton, Florida 1989;pp347-373
- 77.- Pirhonen A, Linnala-Kankkunen A, Mäenpää PH. Identification of phosphoserine residues in protamines from mature mammalian spermatozoa *Biol of Reprod* 1994;50:981-986
- 78.- Gatewood JM, Schroth GP, Schmid CW, Bradbury EM. Zinc-induced secondary structure transitions in human sperm protamines *J Biol Chem* 1990;265:20667-20672
- 79.- Oliva R, Dixon GH. Cap. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction In: Cohn WE and Moldave K *Progress Nucleic Acids Research and Molecular Biology Vol 40 Academic Press Inc* 1991;pp25-93
- 80.- Bode J, Gomez-Lira MM, Schroter H. Nucleosomal particles open as the histone core becomes hyperacetylated *Eur J Biochem* 1983;130:437-445
- 81.- Bode J. Nucleosomal conformations induced by small HMG proteins or by histone hyperacetylation are distinct *Arch Biochem Biophys* 1984;228:364-372
- 82.- Louie AJ, Dixon GH. Trout testis cells. II Synthesis and phosphorylation of histones and protamines in different cell types *J Biol Chem* 1972;247:5498-5505
- 83.- Wehling K, Krauss S, Wagner KG. Cooperative binding of fluorescein-labeled cuplein by DNA *Nucleic Acids Res* 1976;3:149-164

- 84.- Bode J, Willmitzer L, Opatz K. On the competition between protamines and histones: studies directed toward the understanding of spermiogenesis Eur J Biochem 1977;72:393-403
- 85.- Grimes SR Jr, Henderson N. Acetylation of histone during spermatogenesis in the rat Arch Biochem Biophys 1983;221:108-116
- 86.- Marushige Y, Marushige K. Phosphorylation of sperm histone during spermiogenesis in mammals Biochim Biophys Acta 1978;518:440-449
- 87.- D'auria G, Paolillo L, Sartorio R, Wurzbarger S. Structure and function of protamines: and H^3 nuclear magnetic resonance investigation of the interaction of cupleines with mononucleotides Biochim et Biophys Acta 1993;1162:209-216
- 88.- Puwaravutipanich T, Panyim S. The nuclear basic proteins of human testes and ejaculated spermatozoa Exp Cell Res 1975;90:153-158
- 89.- Bjerkedal T, Bakketeig LS. Surveillance of congenital malformations and other conditions of newborns I J of Epidem 1975;4:31-36
- 90.- Miestrich ML. In histone and other basic nuclear proteins Hnilica LS, Stein GS, Stein JL eds CRC Press 1989;pp165-182
- 91.- Basakaran R, Rao MRS. Mammalian spermatid specific protein, TP2, is a zinc metalloprotein with two finger motifs Biochem Biophys Res Commu 1991;179:1491-1499
- 92.- Kistler WS, Noyes C, Hsu R, Heinrickson RL. The amino acid sequence of a testis-specific basic protein that is associated with spermatogenesis J Biol Chem 1975;250:1847-1853
- 93.- Singh J, Rao MRS. Interaction of rat testis protein, TP, with nucleic acids *in vitro*. Fluorescence quenching, UV absorption, and thermal denaturation studies J Biol Chem 1987;262:734-740
- 94.- Singh J, Rao MRS. Interactions of rat testis protein, TP, with nucleosome core particle Biochem Int 1988;17:701-710

- 95.- Grimes SRJr, Platz RD, Meistrich ML, Hnilica LS. Partial characterization of a new basic nuclear protein from rat testis elongated spermatids *Biochem Biophys Res Commun* 1975;67:182-189
- 96.- Kleene KC, Flynn JF. Characterization of a cDNA clone encoding a basic protein, TP2, involved in chromatin condensation during spermiogenesis in the mouse *J Biol Chem* 1987;262:17272-17277
- 97.- Luerssen H, Majer WM, Hoyer-Fender S, Engel W. The nucleotid sequence of rat transition protein 2 (TP2) cDNA *Nucleic Acids Res* 1989;17:3585-
- 98.- Platz RD, Grimes SR, Niestrch ML, Hnilica LS. Nuclear protein transitions in rat testis spermatids *Exp Cell Res* 1977;110:31-39
- 99.- Courtens J, Loir M. Ultrastructural detection of basic nucleoproteins: alcoholic phosphotungstic acid does not bind to arginine residues *J Ultrastruct Res* 1981;74:322-326
- 100.- Thomas JO. The higher order structure of chromatin and histone H1 *J Cell Sci Suppl* 1984;1:1-20
- 101.- Thoma F, Koller TH, Klug I. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of salt-dependent superstructure of chromatin *J Cell Biol* 1979;33:403-427
- 102.- Ris H, Kornberg J. Chromosome structure and levels of chromosome organization In: *Progress in Cell Biol* vol 2 DM Prescott and L Goldstein eds New York Academic Press 1979;pp267-361
- 103.- Finch JT, Klug A. Solenoidal model for superstructure in chromatin *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:1897-1901
- 104.- Sperling L, Klug A. X-ray studies on "native" chromatin *J Mol Biol* 1977;112:253-263
- 105.- Czichos J, Kohler M, Reckmann B, Renz M. Protein-DNA conjugates produced by UV irradiation and their use as probes for hybridization *Nucleic Acids Res* 1989;17:1563-1572
- 106.- Renz M, Nehls P, Hozier J. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1977;42:245-252

- 107.- Strätling WH, Müller U, Zantgraf H. The higher order repeat structure of chromatin is built up of globular particles containing eight nucleosomes *Exp Cell Res* 1978;117:301-311
- 108.- Allan J, Cowling GJ, Harbone N, Cattini P, Craigie R, Goold H. Regulation of the higher order structure of chromatin by histones H1 and H5 *J Cell Biol* 1981;90:279-288
- 109.- Zlatanova J, van Holde K. The linker histones and chromatin structure *New Twists Progress in Nucleic Acids Res and Mol Biol* 1996;52:217-259
- 110.- Leuba SH, Zlatanova J, van Holde K. On the location of linker DNA in the chromatin fiber studies with immobilized and soluble micrococcal nuclease *J Mol Biol* 1994;235:871-880
- 111.- Horowitz RA, Agard DA, Sedat JW, Woodcock CL. The three-dimensional architecture of chromatin in situ: electron tomography reveals fiber composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon *J of Cell Biol* 1994;125:1-10
- 112.- van Holde KE, Zlatanova J. Chromatin higher order structure: chasing a, rage? (review) *J Biol Chem* 1995;270:8373-8376
- 113.- Woodcock CLF, Frado LL, Ratther JB. The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement *J Cell Biol* 1984;99:42-52
- 114.- Leningher AL, Nelson DL, Cox MM. *Principles of Biochemistry* 2nd ed, Worth Publishers New York 1982;pp806-810
- 115.- Pienta KJ, Coffey DS. A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the nucleus and chromosomes *J Cell Sci Suppl* 1984;1:123-135
- 116.- Pogany GC, Corzett M, Weston S, Balhorn R. DNA and protein content of mouse sperm: implications regarding sperm chromatin structure *Exp Cell Res* 1981;136:127-136
- 117.- Allen MJ, Hud NV, Lee C, Pogany GC, Siekhaus WJ, Balhorn R. Analysis of sperm volumes and extent of chromatin compaction by atomic force microscopy *J Cell Biol* 1991;115:50a
- 118.- Strayer L. *Bioquímica* Ed. Reverté SA 1988;pp834

- 119.- Groundine N, Conkin KF. Chromatin structure and the novo methylation of sperm DNA: implications for activation of the paternal genome *Science* 1985;228:1061-1068
- 120.- Hernández-Pérez O, Rosado A. Biología molecular del espermatozoide humano *Ciencia* 1988;39:249-260
- 121.- de Lange T, Shiule L, Myers RM, Cos DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE. Structure and variability of human chromosome ends *Mol Cell Biol* 1990;10:518-527
- 122.- Hernández-Pérez O, Bello Ma, Rosado A. The human spermatozoa genome Analysis by DNA reassociation kinetics *Biochem Biophys Acta* 1978;521:557-565
- 123.- Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm *J Cell Biol* 1982;93:298-305
- 124.- Pogany GC, Balhorn R. Quantitative fluorometry of abnormal mouse sperm nuclei *J Reprod Fert* 1992;96:25-34
- 125.- Bianchi F, Rousseaux-Prevost R, Bailly C, Rousseaux J. Interaction of human P1 and P2 protamines with DNA *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201:1197-1204
- 126.- Raukas E, Mikelsaar RH. Are there molecules of nucleoprotamine? *Bioessays* 1999;21:440-448
- 127.- Koheler JK. A freeze-etching study of rabbit spermatozoa with particular reference to head structure *J Ultrastruct Res* 1970;33:598-614
- 128.- Marushige Y, Marushige K. Properties of chromatin isolated from bull spermatozoa *Biochim Biophys Acta* 1974;340:498-508
- 129.- Koheler JK, Wurschmidt U, Larsen MP. Nuclear and chromatin structure in rat spermatozoa *Gamete Res* 1983;8:357-370
- 130.- Spinski MI, Wagner TE. The total structure and organization of chromosomal fibers in eutherian sperm nuclei *Biol Reprod* 1977;16:428-440

- 131.- Gusse M, Chevallier PH. Electron microscope evidence for the presence of globular structure in different sperm chromatins J Cell Biol 1980;87:280-284
- 132.- Risley MS, Einheber S, Bumcrot DA. Changes in DNA topology during spermatogenesis Chromosoma 1986;94:217-227
- 133.- Ward WS, Partin AW, Coffey DS. DNA loop domains in mammalian spermatozoa Chromosom 1989;98:153-159
- 134.- Ward WS, Partin AW, Coffey DS. Specific organization of genes in relation to the sperm nuclear matrix Biochem Biophys Res Commun 1990;173:20-25
- 135.- Wilkins MHF. Physical studies of the molecular structure of deoxyribose nucleic acid and nucleoprotein Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1956;21:75-90
- 136.- Koheler JK. Fine structure observations in frozen-etched bovine spermatozoa J Ultrastruct Res 1966;16:359-375
- 137.- Plattner H. Bull spermatozoa: a investigation by freeze-etching using widely different cryofixation procedures J Submicr Cytol 1971;3:19-32
- 138.- Koheler JK. Human sperm head structure: a freeze-etching study J Ultrastruct Res 1972;39:520-539
- 139.- Kierzenbaum AL, Tres LL. The packaging unit a basic structural feature for the condensation of late cricket spermatid nuclei J Cell Sci 1978;33:265-283
- 140.- Suzuki M, Wakabayashi T. Packaging of DNA in cricket sperm: a compact model of DNA packaging J Mol Biol 1988;204:653-662
- 141.- Liovlant F. Cholesteric organization of DNA in the stallion sperm head Tiss Cell 1983;115:231-243
- 142.- Ward WS. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa Biol Reprod 1993;48:1193-1201

- 143.- Moens PB, Pearlman RE. Satellite DNA I in chromatin loops of rat pachytene chromosomes and in spermatids *Chromosoma* 1989;98:287-294
- 144.- Guttenbach M, Schmid M. Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradiative in situ hybridization *Am J Hum Genet* 1990;46:553-558
- 145.- Wyrobek AJ, Alhborn T, Balhorn R, Stanker L, Pinkel D. Fluorescence in situ hybridization to Y chromosome in decondensed human sperm nuclei *Mol Reprod Dev* 1990;27:200-208
- 146.- Allen MJ, Pogany GC, Siekhaus W, Balhorn R. Atomic force microscopy studies of mammalian sperm chromatin *J Cell Biol* 1990;11:110 (abstract 613)
- 147.- Morce-Gaudio M, Risley MS. Topoisomerase expression during spermatogenesis *J Cell Biol* 1991;115:50 (abstract 286)
- 148.- Fawcett DW. A comparative review of sperm ultrastructure *Biol Reprod* 1970;2(suppl):90-127
- 149.- Hud NV, Allen MJ, Downing KH, Lee J, Balhorn R. Identification of the elemental packaging unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:1347-1354
- 150.- Gosule LC, Schellman JA. DNA condensation with polyamines I. Spectroscopic studies *J Mol Biol* 1978;12:311-326
- 151.- Arscott PG, Lee G, Bloomfield VA, Evans DF. Helical period of z-DNA *Nature* 1990;23:346-706
- 152.- Allen MJ, Lee C, Lee JD, Pogany GC, Balooch M, Siekhaus WJ, Balhorn R. Atomic force microscopy of mammalian sperm chromatin *Chromos* 1993;102:623-630
- 153.- Haaf T, Ward DC. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers *Exp Cell Res* 1995;219:604-611
- 154.- Allen MJ, Bradbury EM, Balhorn R. The chromatin structure of well-spread demembrated human sperm nuclei revealed by atomic force microscopy *Scann Microsc* 1996;10:989-996

- 155.- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin *Science* 1987;236:962-964
- 156.- Banerjee S, Smallwood A. Chromatin modification on imprinted H19 gene in mammalian spermatozoa *Mol Reprod Develop* 1998;50:474-484
- 157.- Powell D, Dran DJ, Jennings C, Jones R. Spatial organization of repetitive DNA sequences in the bovine sperm nucleus *1990;97:185-191*
- 158.- Jennings C, Powell D. Genome organization in the murine sperm nucleus *Zygote* 1995;3:123-131
- 159.- Rhim JA, Connor W, Dixon GH, Harendza CJ, Evenson DP, Palmiter RD, Brinster RL. Expression of an avian protamine in transgenic mice disrupts chromatin structure in spermatozoa *Biol Reprod* 1995;52:20-32
- 160.- Ward WS, Zalensky AO. The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1996;6:139-147
- 161.- Balhorn R, Reed S, Tanphairchitr N. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratio in sperm of infertile human males *Experientia* 1988;44:52-55
- 162.- Belokopytova I, Kostyleva EI, Tomilin AN, Vorob'ev VI. Human male infertility may be due to a decreased of the protamine P2 content in sperm chromatin *Mol Reprod Dev* 1993;34:53-57
- 163.- de Yebra L, Ballescá JL, Vanrell JA, Coszlett M, Balhorn R, Oliva R. Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels *Fertil Steril* 1998;69:755-759
- 164.- Roest HP, van Klaveren J, de Wit J, van Gurp CG, Kpken MHM, Vermey M, van Roijen JH, Hoogerbrugge JW, Vreenburg JTM, Baarends WM, Bootsma D, Grootegoed JA, Hoeijmakers JHJ. Inactivation of HR6B Ubiquitin-Conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification *Cell* 1996;86:799-810
- 165.- Evenson DP, Darzynkiewicz A, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility *Science* 1980;210:1131-1133

- 166.- Ward WS, Coffey DS. DNA Packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells Biol Reprod 1991;44:569-574
- 167.- Gonzalez GF, Salirrosas A, Torres D, Sanchez A, Villena A. Use of clomiphene citrate in the treatment of men with high sperm chromatin stability Fertil Steril 1998;69:1109-1115
- 168.- Gonzalez GF, Villena A. Influence of low corrected seminal fructose levels on sperm chromatin stability in semen from men attending an infertility service Fertil Steril 1997;67:763-768
- 169.- Carrell DT, Emery BR, Liu L. Characterization of aneuploidy rates, protamine levels, ultrastructure, and functional ability of round-headed sperm from two siblings and implications for intracytoplasmic sperm injection Fertil Steril 1999;71:511-516
- 170.- Chitale AR, Tathaur RG. Nuclear decondensation of sperm head and failure at in vitro fertilization: an ultrastructural study Hum Reprod 1995;10:594-598
- 171.- Ibrahim ME, Moussa MAA, Pedersen H. Sperm chromatin heterogeneity as an infertility factor Arch Androl 1988;21:129-133 .
- 172.- Karabinus DS, Vogler CJ, Saacke RG, Evenson DP. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation on Holstein bulls J Androl 1997;18:549-555
- 173.- Gonzalez GF, Sanchez A. High sperm chromatin stability in semen weith high viscosity Arch Androl 1994;32:31-35
- 174.- Foster WG, McMahon A, Rice DC. Sperm chromatin structure is altered in cynomolugus monkeys with environmentally relevant blood lead levels Toxicol Ind Health 1996;12:723-735
- 175.- Sailer BL, Jost LK, Erickson KR, Tajiran MA, Evenson DP. Effects of X-irradiation on mouse testicular cells and sperm chromatin structure Environ Mol Mutagen 1995;25:23-30
- 176.- Love CC, Kenney RM. Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion Biol Reprod 1999;60:615-620

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 177.- Pacchierotti F, Tiveron C, Ranaldi R, Bassani B, Cordelli E, Leter G, Spano M. Reproductive toxicity of 1,3-butadiene in the mouse: cytogenetic analysis of chromosome aberrations in first-cleavage embryos and flow cytometric evaluation of spermatogonial cell killing *Mutat Res* 1998;397:55-66
- 178.- Sollner-Webb B, Camerini-Otero RD., Felsenfeld G. Chromatin structure as probed by nucleases and proteases: evidence for the central role of histones H3 and H4 *Cell* 1976;9:179-193
- 179.- Germond JE, Bellard M, Oudet P. Stability of nucleosomes in native and reconstituted chromatin *Nucleic Acids Res* 1976;3:3173-3192
- 180.- Laskey RA, Mills AD, Morris NR. Assembly of SV-40 chromatin in a cell-free system from *Xenopus* eggs *Cell* 1977;10:237-245
- 181.- Tatchell K, van Holde KE. Reconstitution of chromatin core particles *Biochem* 1977;16:5295-5303
- 182.- Drew HR. Can one measure the free energy of binding of the histone octamer to different DNA sequence by salt-dependent reconstitution? *J Mol Biol* 1991;219:391-392
- 183.- Suquet C, Smerdon MJ. Damage to DNA strongly influences its rotational setting on the histone surface of reconstituted nucleosomes *J Biol Chem* 1993;268:23755-23757
- 184.- Stemmer WPC. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10747-10751
- 185.- Fletcher TM, Krishnan U, Serwer P, Hansen JC. Quantitative agarose gel electrophoresis of chromatin: nucleosome-dependent changes in charge, shape and deformability at low ionic strength *Biochem* 1994;33:2226-2233
- 186.- McCarty KSJr, Vollmer RT, McCarty KSSr. Isocinetic gradients *Anal Biochem* 1974;61:120-137
- 187.- Evenson DP, Darzynkiewickz A, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility *Science* 1980^a;210:1131-1133

- 188.- Evenson DP, Melamed MR. Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry *Chromosom* 1983;78:225-238
- 189.- Evenson DP, Darzynkiewickz Z, Jost LK. Changes in accessibility of DNA to various fluorochromes during spermatogenesis *Cytometry* 1986;7:45-53
- 190.- Claassens OE, Nenkveld R, Franken DR, Pretorius E, Swart Y, Lombard CJ, Kruger TF. The acridine orange test: determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro *Hum Reprd* 1992;7:242-247
- 191.- Marzluff WF, Huang RChC. Transcription of RNA in isolated Nuclei In: *Transcription and traslation A practical Approach* Ed Hames and Higgins IRL Press Oxford England 1984; pp
- 192.- Marmur JA. Procedure for the isolation of deoxiribonucleic acid from microorganisms *J Mol Biol* 1961;3:208-218
- 193.- Giles KW, Myers A. An improved diphenylamine method for the stimation of desoxyribonucleic acid *Nature* 1965;206:93-114
- 194.- Marushige Y, Marushige K. Properties of chromatin isolated from bull spermatozoa *Biochim Biophys Acta* 1974;340:498-508
- 195.- Itzhaki RF, Cooper HK. Similarity of chromatin from different tissues *J Mol Biol* 1973;75:119-128
- 196.- Lowry OH, Rosenbraugh NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folinphenol reagent *J Biol Chem* 1951;193:265-275
- 197.- Noll M. DNA folding in the nucleosome *J Mol Biol* 1977;116:49-71
- 198.- Ballesteros LM, Delgado NM, Rosado A, Hernández-pérez O. Structure of human sperm chromatin *Arch Androl* 1988;19:63-71
- 199.- Balhorn JM, Gledhill BL, Wyrobek AJ. Mouse sperm chromatin proteins: Quantitative isolation and partial characterization *Biochem* 1977;16:4074-4080

- 200.- Keichline LD, Wassarman PM. Structure of chromatin in sea urchin embryos, sperm and adult somatic cells *Biochem* 1979;18:214-219
- 201.- Kharchenko EO, Nalivaeva NN. Analysis of structural characteristics of sperm chromatin in amphibians *J Evol Biochem Physiol (Praga)* 1980;15:410-416
- 202.- Cole A, Miestrich ML, Cherry LM, Trostle-Weige PK. Nuclear manchette development in spermatids of normal and *azh/azh* mice *Biol Reprod* 1988;38:385-401
- 203.- Fawcett DW, Anderson WA, Phillips DM. Morphogenetic factors influencing the shape of sperm head *Dev Biol* 1971;26:220-251
- 204.- Russell LD, Russell JA, MacGregor GR, Miestrich ML. Linkage of manchette microtubules to the nuclear envelope and observations of the role of the manchette in nuclear shaping during spermiogenesis in rodents *Amer J Anatomy* 1991;192:97-120
- 205.- Bellvé AR, O'Brien DA. The mammalian spermatozoon: structure and temporal assembly In *Mechanism and Control of animal fertilization* Ed JF Hartman Academic Press New York 1983;pp55-137
- 206.- Bellvé AR, Chandrika R, Martinova YS, Barth AH. The perinuclear matrix as a structural element of the mouse sperm nucleus *Biol Reprod* 1992;47:451-465
- 207.- Longo FJ, Cook S. Formation of the perinuclear theca in spermatozoa of diverse mammalian species relationship of the manchette and multiple band polypeptides *Mol Reprod Dev* 1991;28:380-393
- 208.- Longo FJ, Krohne F, Franke WW. Basic protein of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements *J Cell Biol* 1987;105:1105-1120
- 209.- Bernardini G, Donne ID, Norreri S, Negri A, Milzani A. *Xenopus leavis* sperm proteins, previously identified as surface proteins with egg coat binding capability, are indeed histone H4, histone H3, and sperm specific protein SP2 *J Exp Zool* 1992;263:210-214

- 210.- Russell LD, Clemont Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats *Anat Rec* 1977;187:347-366
- 211.- Russell LD, Goh JC, Rashed RM, Vogl AW. The consequences of actin disruption at Sertoli ectoplasmic specialization sites facing spermatids after *in vivo* exposure of rat testis to cytochalasin D *Biol Reprod* 1988;39:105-118
- 212.- Pogany GC, Balhorn R. Quantitative fluorometry of abnormal mouse sperm nuclei *J Reprod Fert* 1992;96:25-34
- 213.- Weintraub H. A dominant role of DNA secondary structure in forming hypersensitive structures in chromatin *Cell* 1983;32:1191-1203
- 214.- Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei *J Androl* 1992;13:342-348
- 215.- Santisteban MS, Montmasson MP, Giroud F, Ronot X, Brugal G. Fluorescence image cytometry of nuclear DNA content versus chromatin pattern: a comparative study of ten fluorochromes *J Histochem Cytochem* 1992;40:1789-1797
- 216.- Sakkas D, Manicardi G, Bianchi PG, Bizzaro D, Bianchi U. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa *Biol Reprod* 1995;52:1149-1155