

## **V.- Discusión Final**



## V.- Discusión.

Puesto que en las secciones precedentes se ha intentado enmarcar los resultados dentro de los estudios y modelos propuestos en la bibliografía, en éste capítulo se discuten las principales ideas (en forma general y global) que surgen de los resultados expuestos.

### 1.- El extracto crudo de los ovocitos de *Holothuria tubulosa* disuelven completamente los núcleos espermáticos

Cuando los núcleos de los espermatozoides de *Holothuria tubulosa* fueron incubados con extracto crudo de ovocitos de la misma especie (incubaciones homoespecíficas) se observó que los núcleos se disuelven (véase Cap.IV; 3.1); de forma similar, éste efecto fue observado en incubaciones heteroespecíficas con núcleos espermáticos de *Dicentrarchus labrax* (resultados no mostrados). Como se sabe, el modelo de *D. labrax* posee una composición proteica nuclear (protamina), muy diferente que los núcleos de los espermatozoides de *Holothuria tubulosa* que contiene histonas.

El hecho de incubar los núcleos espermáticos con el extracto crudo de ovocitos de *Holothuria tubulosa*, es un punto inicial para el estudio de la remodelación de la cromatina espermática (por ejemplo, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster*, anuros, erizo de mar, y otros). Esto fundamenta que los extractos son competentes para la remodelación de la cromatina espermática y producir un pronúcleo masculino completo. Sin embargo, parece muy claro que éste método no es del todo aplicable a los extractos crudos de los ovocitos de *Holothuria tubulosa*, y que su efecto no puede considerarse como un mimetismo de los procesos que deben ocurrir *in-vivo*, ya que no se consigue obtener pronúcleos a partir de los núcleos de los espermatozoides incubados con los extractos crudos.

En realidad ésta observación, puede añadirse como prueba adicional a varios antecedentes que muestran que los extractos completos de los ovocitos de los equinodermos poseen, no solo una, sino varias actividades que pueden actuar sobre la integridad de los núcleos espermáticos:

- a) Eng & Metz (1980) demostraron que el homogenizado de ovocito de erizo de mar disuelven los núcleos de los espermatozoides incubados ( y adicionalmente no reconstituyen el pronúcleo masculino). En éste trabajo se considera implícitamente que la actividad descondensadora no es única. Los extractos de los ovocitos fueron sometidos a centrifugación (150,000 g durante 105 minutos), y tanto el sedimento como el sobrenadante muestran poseer actividad descondensadora. Eng & Metz fraccionaron el sobrenadante e identificaron un grupo concreto de proteínas que exhiben actividad descondensadora de núcleos. Estas proteínas son de peso molecular elevado (aprox. 100,000 Da) y su actividad no es termoestable.
- b) En un trabajo posterior, Delgado et al. (1982) mostraron que el sulfato de glucosaminoglicano, extraído del citoplasma del ovocito de erizo de mar (*T. rosens*) prácticamente libre de proteínas contaminantes, puede descondensar fácilmente los núcleos de espermatozoides humanos. Aquí, se debe mencionar que los glucosaminoglinos son ésteres polisulfúricos de mucopolisacaridos (es decir polisacaridos complejos) de composición parecida a la heparina (ricos en hexosaminas, ácido urónico y sulfatos), y que la heparina es un anión que descondensa los núcleos espermáticos inespecíficamente.

- c) Además de otros polianiones no estudiados que pueden encontrarse, es también interesante señalar que los extractos de ovocitos de equinodermos contienen actividad proteolítica para las proteínas básicas asociadas a la cromatina del espermatozoide. Estas observaciones fueron reportadas en erizo de mar (Betzael & Moav, 1987; Suzuki et al., 1990), estrella de mar (Amano et al., 1992a), y nosotros la encontramos en *Holothuria tubulosa* (ver Cap. IV, 3.2 y 3.3). Esta actividad proteolítica es capaz de actuar sobre las proteínas básicas (histonas y protaminas) tanto cuando se encuentra en el núcleo espermático o en solución. La rápida hidrólisis de las proteínas nucleares puede intervenir en el proceso de descondensación y disolución de los núcleos de los espermatozoides.

La principal idea que emerge en forma obvia en éste punto, es que a diferencia de lo descrito para ovocitos y embriones de *Drosophila melanogaster* y ovocitos de *Xenopus laevis*, los extractos crudos de ovocitos de *Holothuria tubulosa* contiene diversas actividades que interfieren en los procesos de remodelación de la cromatina espermática y por lo tanto no es un sistema válido para mimetizar la transformación del núcleo espermático a pronúcleo masculino.

## 2.- Propiedades del extracto "high-speed" termoestable.

Cuando el extracto de ovocitos de *Holothuria tubulosa* fue centrifugado (150,000 g durante 60 minutos) y sometido a la acción del calor (80°C durante 15 minutos), el sobrenadante termoestable que se obtiene no disuelve los núcleos espermáticos, tampoco se observa actividad proteolítica, pero en cambio se conserva la capacidad de descondensar los núcleos espermáticos de *Holothuria tubulosa* (la descondensación es clara pero limitada), y también se mantiene la capacidad de remover las proteínas de los núcleos espermáticos durante la descondensación. La remoción de las proteínas espermáticas es parcial y las proteínas involucradas son la proteína  $\phi_0$  y la histona H1, esto es coincidente con el hecho de que ambas proteínas son las proteínas específicas del núcleo del espermatozoide.

Aquí, se demuestra que la actividad removedora/descondensadora del extracto high-speed termoestable no corresponde a las proteínas de alto peso molecular (como fue el caso de Eng & Metz, 1980; trabajando con erizo de mar, y además éstas proteínas resultaron ser termolábiles). Además, se refuerza la idea de que en los extractos crudos hay varias moléculas diferentes con capacidad de descondensar los núcleos espermáticos (a través de diferentes mecanismos, que no necesariamente tendrían que estar relacionados con una remodelación de la cromatina espermática en forma fisiológica).

En nuestros experimentos optamos por la obtención de extracto high-speed termoestable porque éste método es utilizado como mucho éxito en el caso de *Xenopus laevis* y ha permitido identificar con éxito moléculas responsables de la remodelación de la cromatina espermática, como la nucleoplasmina (Laskey et al., 1977, 1978) y N1/N2 (Kleinschmidt & Franke, 1982; Kleinschmidt et al., 1986). En ciertos aspectos (como es el caso de la descondensación limitada y remoción de proteínas) el extracto high-speed termoestable de *Holothuria tubulosa* se comporta de forma similar a los obtenidos en anfibios, pero también presenta aspectos diferentes. Dentro de los aspectos diferenciales cabe señalar como importante el hecho que los extractos high-speed de anfibios pueden realizar recambio de las proteínas del núcleo espermático; es decir, pueden remover las proteínas nucleares básicas del espermatozoide y sustituirlas por histonas almacenadas en el ovocito, mientras que el extracto high-speed termoestable de *Holothuria tubulosa* puede remover las proteínas nucleares, pero aparentemente no es competente para recambiarlas por otras proteínas.

Es necesario insistir en que estos hechos son observaciones *in-vitro* y por lo tanto, no significa que *in-vivo* durante la formación del pronúcleo masculino no pueda ocurrir recambio de proteínas. Lo que sugiere estos resultados es que la actividad de los extractos (y posiblemente la forma en que se efectúa la remodelación de la cromatina espermática) es diferente en *Holothuria tubulosa* en comparación a lo que sucede en anfibios.

### 3.- ¿Existe una actividad tipo nucleoplasmina en los extractos de ovocitos de *Holothuria tubulosa*?

La nucleoplasmina es una proteína relativamente mayoritaria en extractos de ovocitos de anfibios y su purificación (o al menos obtenerla muy enriquecida) es relativamente sencilla cuando en general se aplican los métodos que se describen en éste trabajo (ver Cap. III, 4). Sin embargo, cuando estos métodos ampliamente utilizados para purificar nucleoplasmina fueron aplicados para fraccionar los extractos de ovocitos de *Holothuria tubulosa*, no se obtiene ninguna fracción que pueda ser similar a la nucleoplasmina de anfibios. A pesar de ello, se pueden obtener diversas fracciones que contienen proteínas ácidas capaces de producir hinchamiento de los núcleos espermáticos, pero sin producir remoción o intercambio de proteínas nucleares (ver Cap. IV, 5). La consideración de éste punto es importante puesto que puede conducir al error de identificar una actividad "tipo nucleoplasmina" en extractos que no la contienen.

A lo largo de éste trabajo, no existe evidencia de la presencia (o actividad) de una proteína similar a la nucleoplasmina en el ovocito de *Holothuria tubulosa*. Llegando a éste punto es importante reflexionar sobre la relación que debe plantearse entre nucleoplasmina (factores de remodelación) y estructura de la cromatina espermática.

La nucleoplasmina es competente para remover las proteínas específicas del núcleo espermático de *Xenopus laevis* y reemplazarlas por las histonas H2A y H2B (Philpott & Leno, 1992), y también puede remover la protamina típica de otras especies (Iwata et al., 1997; Saperas et al., 1999). Otros estudios *in-vitro* sugieren que la nucleoplasmina también podría remover las histonas H2A y H2B del nucleosoma o al menos desestabilizarlas (Dimitrov & Wolffe, 1996). Sin embargo, los estudios específicos que se han realizado probando la nucleoplasmina sobre cromatina organizada en nucleosomas, no permite concluir que necesariamente la nucleoplasmina tenga un papel en su remodelación (Itoh et al., 1997).

Itoh et al. (1997) estudiaron el efecto de la nucleoplasmina sobre el núcleo espermático de *Rana catesbiana* (que se encuentra organizado en nucleosomas típicos, conteniendo histonas nucleosómicas, empaquetado por variantes específicas de la histona H1). Los autores mostraron que la nucleoplasmina no actúa sobre la remoción de las histonas nucleosómicas del núcleo espermático, y únicamente efectúa una remoción parcial de las variantes específicas de la histona H1. Ésta remoción es muy poco activa, porque se debe utilizar concentraciones de nucleoplasmina extraordinariamente elevada y nunca llega a ser completa. Estos hechos se reproducen cuando los núcleos de los espermatozoides se incuban con los extractos de ovocitos de *Xenopus laevis*.

Por otro lado, Dimitrov & Wolffe (1996) investigan el efecto de los extractos de ovocitos de *Xenopus laevis* sobre la composición y actividad del núcleo de eritrocito de la propia especie. Éste núcleo es metabólicamente inactivo y está formado por las histonas del nucleosoma y dos variantes de la H1 (H1 y H1<sub>0</sub>) que son responsables de su empaquetamiento y parcialmente (estructuralmente) de su inactividad. Los extractos de ovocitos producen una remodelación de ésta cromatina sustituyendo en forma completa a la histona H1 por la histona B4 y por la HMG1 ("high mobility group"), permitiendo

la activación de la transcripción de ciertos genes. De esta forma, la nucleoplasmina sería la responsable de la depleción total de la histona H1<sub>0</sub> y de la depleción parcial de la histona H1. Por otro lado, no encuentran en absoluto que la nucleoplasmina libere los dímeros H2A-H2B de la cromatina.

Los resultados que se presentan en el Cap. IV. 6, muestran que la nucleoplasmina tampoco es competente para remover las proteínas específicas  $\phi_0$  e histona H1 de la cromatina del tipo nucleohistona del núcleo espermático de *Holothuria tubulosa*, tampoco es efectiva en producir hinchamiento de los núcleos. Sin embargo, ésta misma nucleoplasmina es muy activa en la remoción de la protamina de los núcleos espermáticos de *Dicentrarchus labrax*, y que corresponde a un modelo de cromatina del tipo nucleoprotamina.

La consideración global de los estudios efectuados con la nucleoplasmina de *Xenopus laevis*, y los resultados que hemos obtenido sugieren los siguientes puntos:

- a) La nucleoplasmina tiene una afinidad preferente para ciertas proteínas muy básicas (SP de *Xenopus laevis*, protaminas, histona H1<sub>0</sub>). Es muy competente para remover estas proteínas de su estructura original (y en su caso sustituirlas por las histonas H2A y H2B).
- b) La nucleoplasmina posee una afinidad intermedia o muy baja para las histonas que ocupan el DNA linker del nucleosoma (histona H1, proteína  $\phi_0$ )
- c) Por otro lado, no se ha observado en ningún estudio que la nucleoplasmina pueda recambiar histonas (H2A, H2B) en cromatinas que contienen tales histonas en los nucleosomas.

Estos hechos y consideraciones conducen a pensar que el modelo de remodelación de la cromatina del espermatozoide formada por nucleosomas debe ser radicalmente diferente del descrito en *Xenopus laevis* (o *Bufo*) y que la nucleoplasmina típica no posee actividad funcional sobre dicho modelo.

#### 4.- Proteína removedora de $\phi_0$ (PR $\phi_0$ ): Posible rol funcional.

La caracterización bioquímica inicial de la proteína removedora de  $\phi_0$  (PR $\phi_0$ ) nos indica que se trata de una proteína de con M<sub>w</sub> de 61.2 kDa, es una proteína que en su composición es muy acídica y también muy hidrofóbica, además contiene un alto porcentaje de aminoácidos que potencialmente pueden ser fosforilados. Su carácter ácido se confirma por su pI (4-3.9) considerablemente bajo (ver Cap. IV.8).

Funcionalmente *in-vitro*, hemos observado que la PR $\phi_0$  es competente en la remoción específica de la proteína  $\phi_0$  de los núcleos espermáticos de *Holothuria tubulosa*, actividad que no puede ser producida por la nucleoplasmina de *Xenopus*. Por otro lado, la PR $\phi_0$  es incapaz de remover la protamina típica de los núcleos de *Dicentrarchus labrax*, evento que si es realizado por la nucleoplasmina. En estos experimentos también hemos observado que el hinchamiento de los núcleos espermáticos se correlaciona con la pérdida de las proteínas nucleares básicas asociadas a sus cromatinas, en tal sentido podemos afirmar que la descondensación de la cromatina refleja un evidente proceso de remodelación (ver Cap. IV, 7)