

## VI.- Conclusiones



## VI.- Conclusiones.

- 1) Durante la temporada de desove (estado V de la ovogénesis) de *Holothuria tubulosa* se determinó algunas características reproductivas importantes relacionadas con el desarrollo del ovocito:
  - A) El 80% de la población de ovocitos recuperados de las gonadas tienen un diámetro promedio de  $168 \pm 10 \mu\text{m}$ . La ocurrencia del desove en éste tiempo sugiere que éstos ovocitos son de máximo crecimiento. Asimismo, éste elevado porcentaje de ovocitos sugiere que el desarrollo de la ovogénesis debe ocurrir en forma sincronizada o al menos los ovocitos alcanzan el estado de máximo crecimiento en forma sincronizada.
  - B) Los ovocitos recuperados de las gonadas se encuentran retenidos en el estado de profase I (Grupo II; según la clasificación de Rothschild, 1956), y presentan características de maduración (e.g. los granulos corticales se distribuyen en forma exclusiva en el cortex). El ovocito de *Holothuria tubulosa* es una célula con polaridad apical-basal. El dominio apical se encuentra determinado por el micrópilo y se sugiere que el dominio basal se determina por la presencia del núcleo del vitelo. Como se sabe la polaridad apical-basal del ovocito determina la polaridad animal-vegetal del huevo, y ésta a su vez origina el eje antero-posterior de la larva.
  - C) Los ovocitos bloqueados en profase-I pueden fácilmente ser inducidos a la maduración (proceso evidenciado por la ruptura de la vesícula germinal o núcleo) usando agentes reductores de puentes disulfuro. Éstos ovocitos son fertilizables y capaces de clivar logrando su desarrollo embrionario temprano *in-vitro*.
  - D) En la fertilización *in-vitro*, la formación del pronúcleo masculino corresponde a una descondensación de la cromatina espermática al interior del ovocito, dicha descondensación significa un incremento del diámetro del núcleo espermático en 7-8 veces.
- 2) El extracto acelular crudo de gonada femenina (o de ovocitos detenidos en profase-I) contienen diversas actividades biológicas, una de ellas es su capacidad de descondensación de la cromatina espermática, y otra corresponde a una actividad proteolítica que ataca a las histonas asociadas al DNA del núcleo espermático. Ambas actividades son separables y sus roles biológicos serían independientes.
  - A) La actividad proteolítica del extracto degrada preferencialmente las histonas de la cromatina y tiene poca actividad sobre la proteína  $\phi_0$ . La degradación ocurre tanto si las proteínas están organizando la cromatina del núcleo espermático o en solución. Ésta actividad estaría contenida en la fracción macromolecular del "egg-jelly" del ovocito detenido en profase-I.
  - B) La degradación de las histonas por la actividad proteolítica del "egg-jelly" es dependiente de su concentración y del tiempo de incubación. La actividad proteolítica es favorecida en medio

ácido ( $\text{pH} \leq 7$ ), por lo cual se trata de una proteasa(s) ácida y es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los ensayos de inhibición sugieren la presencia de varias proteasas, la principal(es) corresponderían al tipo de la tripsina o serina-proteasa. La actividad proteolítica es termolábil a  $80^\circ\text{C}$ .

- C) La inhibición de la actividad proteolítica por desnaturalización térmica a  $80^\circ\text{C}$  durante 15 minutos permite mantener la actividad descondensadora *in-vitro* de los extractos. Por lo tanto, ambas actividades serían independientes, y la degradación de las proteínas básicas del núcleo espermático no sería un prerequisite para su descondensación.
- 3) El extracto termoestable a  $80^\circ\text{C}$  de la gonada femenina u ovocitos detenidos en profase-I descondensa rápidamente los núcleos espermáticos de *Holothuria tubulosa*, y depende de la proporción núcleos : cant.idad de extracto. Ésta descondensación se produce a consecuencia de la remoción significativa de la proteína espermática  $\phi_0$  y parcialmente de la histona H1; éstas proteínas están asociadas al DNA linker y son las más específicas del núcleo espermático y responsables de la condensación de su cromatina.
  - 4) La presencia de histonas y proteína  $\phi_0$  exógenas en el extracto estimula la capacidad de remoción de las histonas core. Ésta capacidad es mayor en presencia de las histonas "linker" y proteína  $\phi_0$ , mientras que la actividad de las histonas core es considerablemente menor.
  - 5) La utilización de métodos para la purificación de nucleoplasmina de *Xenopus laevis* en el fraccionamiento del extracto de ovocitos detenidos en profase-I de *Holothuria tubulosa*, no permite la purificación de la actividad de remoción de las proteínas específicas del espermatozoide. Sin embargo, la actividad descondensadora de los núcleos espermáticos de *Holothuria tubulosa* se recupera en diferentes fracciones ricas en aminoácidos ácidos (Asp + Glu). Éstas proteínas podrían corresponder a las supuestas nucleoplasmina-like de *Mytilus* y *Spisula*, con las cuales sólo se ha demostrado descondensación del núcleo espermático pero no remoción de sus proteínas básicas
  - 6) La nucleoplasmina de *Xenopus laevis* produce descondensación de la cromatina espermática y remueve la protamina típica del núcleo espermático de *Dicentrarchus labrax*. Sin embargo, ésta misma nucleoplasmina no descondensa los núcleos espermáticos de *Holothuria tubulosa* y tampoco remueve las proteínas específicas del núcleo del espermatozoide. Esto sugiere que el mecanismo de remodelación de la cromatina de *Holothuria tubulosa* debe ser especie-específico.
  - 7) Cuando se fraccionan extractos de ovocitos inducidos a la maduración, se purifica una proteína ácida (Asp+Glu = 30.6%), con un pI muy ácido (3.9-4.0), y con un peso molecular aparente de 61.2 kDa. Ésta proteína (denominada  $\text{PR}\phi_0$  por su función) es competente en remover la proteína  $\phi_0$  específica del núcleo espermático de *Holothuria tubulosa* y produce una descondensación rápida (10-15 minutos) de los núcleos. De tal forma, la proteína  $\text{PR}\phi_0$  del ovocito maduro de *Holothuria tubulosa* sería (en parte) responsable de la remodelación de la cromatina espermática.

- 8) La proteína PR $\phi_0$  de los ovocitos de *Holothuria tubulosa* a diferencia de la nucleoplasmina de *Xenopus laevis* es incapaz de descondensar los núcleos espermáticos de *Dicentrarchus labrax*, y de remover la protamina típica contenida en su cromatina. Así, la funcionalidad de la proteína PR $\phi_0$  en comparación a la nucleoplasmina son totalmente contrastantes.
  
- 9) Finalmente, se podría plantear que la generalización (prácticamente dogmática) que la nucleoplasmina es la molécula universal responsable de la remodelación del núcleo espermático debe ser revisada. La presencia y funcionalidad de la proteína PR $\phi_0$  en los ovocitos maduros de *Holothuria tubulosa* sostienen un nuevo modelo de remodelación de la cromatina espermática que contiene una cromatina organizada como nucleohistona, y es totalmente diferenciable de la remodelación mediada por la nucleoplasmina de *Xenopus laevis* que sufre la cromatina organizada como nucleoprotamina. En éste punto, la remodelación de la cromatina espermática podría ser interpretada en base a estos dos tipos de organización (nucleohistonas y nucleoprotamina). Extensivamente y a la luz de la variedad de moléculas responsables de la condensación de la cromatina espermática, se podría plantear que el problema de la remodelación de la cromatina del espermatozoide ha sido resuelto en un contexto de la coevolución de los gametos. En este sentido, la remodelación del núcleo espermático por la nucleoplasmina de *Xenopus laevis* debería ser considerada como un modelo clásico pero no universal.