

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LOCALIZACION DEL ADN EN EL COMPLEJO SINAPTONEMICO.

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL E INMUNOCITOQUIMICO.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADO EN BIOLOGIA
PRESENTADO POR

MARIA ERNESTINA FLORES RIVERA

CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO DE 1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
ENFOQUE EXPERIMENTAL	21
OBJETIVO	23
MATERIAL Y METODO	24
RESULTADOS	29
DISCUSION	39
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	42

RESUMEN

La meiosis es un proceso muy ordenado en tiempo y en espacio que se encuentra en los organismos con reproducción sexual. Las características normales de la meiosis involucran una serie de procesos esenciales como: a) Reducción en el número cromosómico; b) Recombinación con intercambio de segmentos cromosómicos (crossing over); c) Distribución al azar de los cromosomas homólogos entre las células hijas. Estos procesos dan origen a células haploides con una nueva dotación génica, derivada de la combinación de los cromosomas paternos y maternos.

Una estructura que se cree está involucrada en el apareamiento, la recombinación y segregación, es el "Complejo Sinaptonémico" que se encuentra a lo largo de la región de unión de los cromosomas bivalentes del estadio paquiteno de la profase meiótica tanto en los gonocitos masculinos como femeninos, este complejo está formado por dos gruesos filamentos laterales, uno delgado medial y finas fibras látero-mediales. Previos estudios citoquímicos, mediante digestiones enzimáticas y agentes de contraste preferencial para ADN y ARN demostraron que los brazos laterales contienen una alta concentración de ribonucleoproteínas, así como algunas fibras de cromatina. Sin embargo no se encontró ADN en las fibrillas látero-mediales, ni en el brazo medial (Solarí 1972, Vázquez-Nin y Echeverría 1976, Coll y col. 1986).

Estos hallazgos no aclaran la interrogante de como se lleva a cabo el entrecruzamiento de los filamentos de ADN entre los cromosomas

homólogos, dado que éstos están separados 60nm o más, distancia existente entre los brazos laterales. En el presente trabajo se analiza este problema por la inmunolocalización del ADN con anticuerpos monoclonales y un segundo anticuerpo marcado con gránulos de oro coloidal.

Con este procedimiento se observó una intensa marca de la cromatina compacta y una menor densidad de granos de oro en los brazos laterales, salvo en los extremos de inserción en la envoltura nuclear, en los que practicamente no hay ADN. Estos resultados confirman las mencionadas observaciones citoquímicas.

Además se localizó ADN en pocos lugares del brazo medial, en fibrillas látero-mediales y en fibras que se extienden de un brazo lateral al otro, muchas veces en relación con los nódulos de recombinación. Estas observaciones se interpretan como que el ADN se encuentra entre los brazos laterales únicamente en los lugares correspondientes a los quiasmas.

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

Muchos eucariontes inferiores como algunos protoctistas, algas y hongos proliferan por división celular simple o mitosis, otros tales como la Hydra origina descendientes por gemación de la parte central del cuerpo, y los gusanos y anémonas marinas se parten en dos, regenerándose la porción que falta. Esta reproducción asexual es sencilla y directa dando lugar a una descendencia que es genéticamente idéntica al organismo progenitor. En cambio la reproducción sexual implica una recombinación de genomas procedentes de dos individuos distintos de la misma especie, cuyos descendientes suelen diferenciarse genéticamente entre ellos y de ambos antecesores. Al parecer ésta última, con la consiguiente diversificación genética, ha presentado grandes ventajas, dado que se presenta en la gran mayoría de las plantas y animales (Bernelot-Moens y Moens 1986).

En el ciclo de reproducción sexual de los animales y de las plantas la combinación de los genomas se realiza por medio de la fusión de dos células haploides (el óvulo y el espermatozoide o grano de polen) en el momento de la fertilización, dando lugar a una célula diploide o cigoto que a través del proceso de mitosis, crece y se diferencia celularmente. Dependiendo de la determinación sexual en el momento de la fecundación, en animales, ya sea macho o hembra, se dará origen a un órgano especial; el testículo o el ovario.

En el caso del macho, las células germinales iniciales,

espermatogonias, son descendientes directas de los gonocitos que se observan en los cordones sexuales del testículo fetal. Hay dos clases de espermatogonias, llamadas respectivamente, de tipos A y B que contienen una cantidad diploide de ADN. Las espermatogonias se multiplican por mitosis. La mitad de las células hijas persisten como espermatogonias A, la otra mitad se diferencia ligeramente para transformarse en espermatogonias B. Estas últimas se dividen y diferencian para producir una nueva generación de células germinales.

Los espermatocitos de primer orden, después de la fase S tienen una cantidad tetraploide de ADN y posteriormente entrarán a la división meiótica, formando dos células menores, los espermatocitos de segundo orden, con un contenido diploide de ADN, éstos inician la segunda división meiótica, que origina dos células con una dotación haploide de ADN llamadas espermátidas. Cada una de ellas se transforma en un espermatozoide a través de un proceso denominado; espermiogénesis.

En el sexo femenino, la primera etapa del desarrollo de los gametos es semejante a la que se encuentra en la espermatogénesis: las ovogonias sufren proliferación por divisiones mitóticas. A continuación se convierten en ovocitos de primer orden que inician la primera división meiótica dando lugar a un ovocito de segundo orden y un cuerpo polar, después efectúan una segunda división meiótica que produce una célula haploide, el óvulo y un segundo cuerpo polar.

Los dos tipos de gametogénesis muestran una gran similitud durante el fenómeno de la meiosis en ambos sexos. Pero si bien la espermatogénesis se desarrolla rápidamente, sin interrupciones entre los diversos estadios, la ovogénesis por el contrario, se realiza mucho más

lentamente, con períodos de reposo que pueden ser del orden de varios años.

En animales y plantas superiores la meiosis presenta el mismo proceso básico. A las células que llevan a cabo el proceso meiótico se les denomina células meióticas o meiocitos, son células diferenciadas que están genéticamente programadas para realizar una serie de procesos como: 1) reducción en el número de cromosomas, 2) recombinación con intercambio de segmentos cromosómicos (bloque de genes) por medio de crossing-over, 3) separación al azar de los cromosomas homólogos (Swanson y col. 1981).

Los estadios de la meiosis se clasifican de la siguiente manera:

FASE S PREMEIOTICA -

FASE G2 PREMEIOTICA

DIVISION I

PROFASE I

METAFASE I

ANAFASE I

TELOFASE I

Preleptoteno

Leptoteno

Cigoteno

Paquiteno

Diploteno

Diacinesis

INTERCINESIS

DIVISION II

PROFASE II

METAFASE I

ANAFASE II

TELOFASE II

La duración de los diferentes estadios o subestadios de la meiosis varía ampliamente dependiendo de la especie animal o vegetal de que se trate. En general la primera división es mucho más larga abarcando el 90% de la duración total, y el 10% lo ocupan las fases restantes. Para que la meiosis se lleve a cabo en forma normal hay ciertas precondiciones como por ejemplo: la presencia de un número de cromosomas conveniente (el número diploide $2n$) y la existencia de homología entre pares de cromosomas para que ocurra el apareamiento cromosómico. Algunos cambios que se dan en diferentes organismos, en la fase premeiótica son: una compactación de cromatina y un incremento en la duración de la fase de síntesis del ADN (Bennett 1984).

En la interfase premeiótica, durante el periodo S no se replica totalmente el ADN ya que del 0.3% al 0.4% es replicado en la profase meiótica, pudiendo tener un significado general en el apareamiento de los cromosomas meióticos y/o en el entrecruzamiento (Stern & Hotta 1980).

En la actualidad no se conocen exactamente los factor(es) que active(n) a la meiosis de una célula pregamética tanto en plantas como en animales, pero se tienen evidencias sobre los procesos bioquímicos asociados con el inicio de la meiosis y de la mitosis. Ambos tipos de división son activados por una misma proteína (Darnell y col. 1990).

PRELEPTOTENO

El preleptoteno corresponde a la profase temprana de la meiosis en donde se ha observado el inicio de cierta condensación de los cromosomas, hasta el punto en donde son reconocidos individualmente. Posteriormente los cromosomas se descondensan hasta perder su identidad individual y retornan a una forma difusa, estos eventos de condensación y descondensación probablemente inicien la entrada al estadio leptoteno. En este período los cromosomas son dispersados en el área nuclear (Alberts y col. 1989).

LEPTOTENO

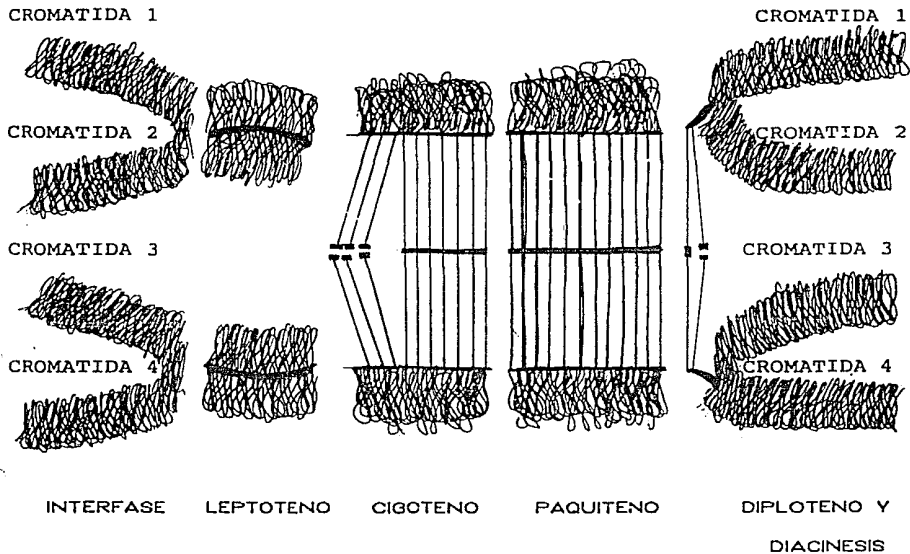
Los cromosomas (dos cromátidas hermanas estrechamente unidas) con un cierto grado de condensación se encuentran como filamentos muy delgados. A lo largo de éstos se observan los cromómeros que son engrosamientos, a manera de cuentas de collar, dispuestos a intervalos irregulares cuyo número, tamaño y posición es característico de cada uno de ellos (Schulz-Schaeffer 1980, Stern y Hotta 1984, Alberts y col. 1989, De Robertis y De Robertis 1989, Darnell y col. 1990). En células sexuales de animales se ha observado que los cromosomas muestran una

polarización definida formando asas cuyos extremos (telómeros) se unen a la envoltura nuclear, en un punto cercano a los centriolos. Esta disposición particular se denomina estado de bouquet o ramillete.

La fijación de los telómeros a la envoltura nuclear, constituye una estructura especializada denominada placa de adhesión, que está acompañada por una redistribución de los poros nucleares, que pierden su distribución homogénea, tendiendo a acumularse en los sitios de fijación de los telómeros (Schulz-Schaeffer 1980, Swanson y col. 1981).

Durante el leptoteno las asas de cromatina toman una disposición lineal laxa. Más tarde las asas tienden a la coalescencia en ciertas regiones o focos que tienen un centro electrodensso. En dichos focos se depositan los componentes laterales del complejo sinaptonémico (Von Wettstein 1977).

PASOS DE LA PROFASE MEIOTICA



En los cromosomas leptoténicos se observan los ejes axiales dentro de la cromatina como cilindros irregulares, que se encuentran en una red de delgados filamentos rodeados por una zona menos densa en la cual los filamentos se mezclan con la cromatina (Vázquez-Nin y Echeverría 1976).

Se acostumbra utilizar el término de ejes axiales en el estadio leptoteno y elementos laterales en los estadios siguientes, sin embargo no hay evidencias de que dichos ejes estén sujetos a una mayor

reestructuración en el curso de la sinapsis. Los ejes axiales son movidos durante la sinapsis de una posición central a una posición lateral con respecto a la mayor cantidad de cromatina de cada cromosoma (Loidl 1991).

CIGOTENO Y PAQUITENO

En cigoteno, el grado de condensación de los cromosomas aumenta en comparación al estadio anterior, éstos se observan más cortos en longitud y de mayor diámetro. Este período se inicia con la sinapsis de los cromosomas homólogos (el alineamiento de un cromosoma materno con un cromosoma paterno) observado por primera vez por Moore en 1895. Los dos homólogos no se fusionan durante el apareamiento, puesto que permanecen separados por un espacio de 60nm o más, que es ocupado por el complejo sinaptonémico, descrito por primera vez por Moses en 1956, en células meióticas de una especie de cangrejo (Loidl 1991).

Se ha encontrado una morfología similar en plantas y animales (Swanson y col. 1981).

Desde la descripción en 1956, se prestó considerable atención al complejo sinaptonémico; las primeras investigaciones fueron principalmente de morfología comparada en un amplio rango de organismos, y del desarrollo de los estadios de la profase meiótica I. Ahora, las investigaciones sobre la morfología del complejo sinaptonémico han quedado atrás, abriéndose un centro de interés en su composición química

y su función. Se han llevado a cabo estudios citoquímicos, mediante digestiones enzimáticas (Solari 1972, Vázquez-Nin y Echeverría 1976, Coll y col. 1986) y por caracterización inmunocitoquímica de los componentes del complejo sinaptonémico (Moens y col. 1987, Heyting y col. 1988, Latos-Bielecka y col. 1990).

De acuerdo a todos los estudios realizados, el complejo sinaptonémico se puede describir como una estructura tripartita que se observa como una cinta aplanada, formado por dos gruesos brazos laterales, uno delgado medial y finas fibras látero- mediales.

La síntesis de ADN cigoténico es requerida antes de la sinapsis de los elementos laterales, para la formación del complejo sinaptonémico (Kurata y col. 1978). Los brazos laterales antes y durante la sinapsis están compuestos en su mayor parte de proteínas histónicas y no histónicas (Villardel y col. 1989), ADN, ARN y proteínas (Esponda y Stockert 1971, Vázquez-Nin y Echeverría 1976, Latos-Bielecka y col. 1990). Cada brazo lateral se ve como un filamento sencillo pero está formado por la reunión de dos cromátidas hermanas, es decir dos dobles hélices de ADN.

En cuanto a su anchura varía de acuerdo al organismo de que se trate, se encuentran rangos de 200A a 600A (Jones H 1973).

Entre los brazos laterales corre un elemento medial, que es paralelo a éstos, resistente a DNasa, sensible a proteasa e insoluble en altas concentraciones de NaCl, contiene muy poco o carece de ácidos nucleicos según Solari (1972). Con otros métodos citoquímicos no se encontraron evidencias de ADN en el brazo medial ni en las fibrillas látero-mediales, pero si ribonucleoproteínas en el cigoteno y paquiteno temprano.

El ARN en todo el complejo escasea en paquiteno avanzado, y está ausente en diploteno (Vázquez-Nin y Echeverría 1976). Las evidencias sugieren que la estructura tripartita del complejo sinaptonémico facilita la sinapsis, recombinación y la posterior disyunción de los cromosomas homólogos (Ierardi y col. 1983, Alberts y col. 1989). El complejo sinaptonémico se empieza a formar en cigoteno, primero las cromátidas hermanas son estrechamente empaquetadas, extendiéndose a lo largo de los elementos laterales en una serie de bucles. Al producirse el apareamiento, los elementos laterales de los cromosomas homólogos lateralizados se adhieren unos a otros, empezando la sinapsis (Von Wettstein y col. 1984).

Los nódulos de recombinación están ensamblados en el elemento central (Westergaard y Von Wettstein 1970, 1972), localizados como pelota sobre una escalera entre los dos cromosomas homólogos (Alberts y col. 1989).

El apareamiento puede comenzar en cualquier sitio del cromosoma, puede unirse por sus extremos polarizados (telómeros) y continuar apareándose hacia el otro extremo, posiblemente empieza en las regiones internas y avanza hacia los extremos, o llevarse a cabo simultáneamente en varios puntos a lo largo de los cromosomas.

En general el apareamiento de los cromosomas homólogos es muy preciso y específico, gen por gen y cromómero por cromómero (De Robertis y De Robertis 1989).

Zickler y col. (1988) han identificado diferentes genes como responsables del alineamiento de los homólogos y de la formación del complejo sinaptonémico, en el ascomicete Sordaria, confirmando que el

alineamiento cromosómico es un prerequisite para la sinapsis. El comportamiento de los mutantes de Sordaria y levaduras, y el curso de experimentos enfocados a la inhibición de la meiosis apoyan el concepto de que el reconocimiento de los homólogos actúa en dos pasos: primero el reconocimiento de los cromosomas homólogos como la precondition de la sinapsis y segundo el de las secuencias precisas en los sitios de recombinación dentro del armazón del complejo sinaptonémico. La existencia de dos fases separadas de reconocimiento de homólogos se podría deber a que el apareamiento recombinogénico requiere de un grado de homología o que éste ayuda a prevenir una recombinación recíproca (crossing over entre regiones homólogas y no homólogas de los cromosomas) (Ashley y Cacheiro 1990, Loidl 1991).

Con respecto a estudios de inmunorreacción de polipéptidos con anticuerpos policlonales desarrollados contra diferentes componentes del complejo sinaptonémico, se ha encontrado que los polipéptidos de 30 y 33 kD (los dos mayores componentes de los brazos laterales del complejo sinaptonémico) son específicos de núcleos cigoténicos, paquiténicos y diploténicos. Esto sugiere que algunos de los constituyentes de los elementos laterales no se originan en estructuras preexistentes en el núcleo, sino que son sintetizados durante la profase meiótica (Moens y col. 1987, Heyting y col. 1988).

Con respecto a los polipéptidos mencionados, una considerable cantidad de topoisomerasa II se encuentra presente en el complejo sinaptonémico, en donde puede jugar un papel estructural, pero no se tienen evidencias directas de su actividad (Moens 1990).

El ADN es parte fundamental del complejo sinaptonémico y de 0.3 a 0.1% de éste es sintetizado durante cigoteno (ADNc) y se le encuentra relacionado con el apareamiento cromosómico. Kurata e Ito en 1978, concluyen en su trabajo realizado con incorporación de timidina tritiada, en células en cigoteno, que el ADN se encuentra localizado en los brazos laterales (elementos laterales) y que funciona como sitios de unión para la formación del complejo sinaptonémico. Al suprimir parcialmente la síntesis de ADN con un agente como la desoxiadenosina, se observa la fragmentación de los cromosomas en cigoteno y en paquiteno, lo que sugiere que la integridad del cromosoma depende exclusivamente del ADN. La inhibición de la síntesis del ARN (con toyocamicina), en leptoteno o cigoteno, produce una permanencia de las células en cigoteno. Si la inhibición se realiza en paquiteno, las células no siguen más allá de la profase, por lo que se sugiere que el ARN es esencial para el desarrollo meiótico (Sakaguchi y col. 1983).

Con respecto al ADN también se ha observado que tiene una estrecha relación con proteínas, pero se desconoce donde reside el ADN que es replicado después de la fase S premeiótica y si es empleado en la sinapsis y el entrecruzamiento (Latos-Bielecka y col. 1990).

Según la teoría de preselección de Stern y col. (1975), la parte de ADN que es retenida por los brazos laterales puede ser provechosa para unir las contrapartes homólogas del complejo sinaptonémico. En hibridación in situ de ADN sobre células extendidas de ratón, en profase meiótica, se ha demostrado que el ADN telomérico está ligado al complejo sinaptonémico, y que la cromatina se asocia de acuerdo a las secuencias de bases de su ADN (Moens y Pearlman 1989, 1990).

El apareamiento de los cromosomas homólogos es total en paquiteno, donde existe una síntesis adicional de ADN, denominado ADN-paquiténico (ADNp), que se encuentra en regiones específicas del cromosoma. Dicha síntesis es del tipo replicación-reparación, cercana a los extremos rotos de los cromosomas relacionados con el proceso de recombinación. Esto ocurre preferencialmente en las regiones del genoma que contienen secuencias repetidas de aproximadamente 200 pares de nucleótidos, asociadas a la actividad enzimática de la endonucleasa que provoca cortes en las dos moléculas de ADN. Posteriormente se produce el desenrollamiento de las cadenas de ADN y la reunión de las mismas en las cromátidas opuestas (De Robertis y De Robertis 1989).

La recombinación génica, no es constante a través del genoma, y puede ser suprimida por la vecindad de la heterocromatina. La cantidad de heterocromatina asociada con el complejo sinaptonémico en paquiteno es mucho mayor que la longitud ocupada en cromosomas mitóticos. Esto sugiere un empaquetamiento diferente de los tipos de cromatina.

La mayor compactación de la heterocromatina a diferencia de la eucromatina puede proveer una restricción física sobre los procesos de entrecruzamiento (Ashley 1987).

En la recombinación se piensa que hay rupturas transversales en un mismo nivel en las cromátidas, seguidas por el intercambio y la fusión de los segmentos intercambiados. El proceso activo está mediado por nódulos de recombinación, las evidencias sobre ésta función es indirecta y se atribuye a que: 1) El número total de los nódulos es igual al número total de quiasmas, que representa el rompimiento y reunión, en el cual dos cromátidas no hermanas (cada una contiene una cadena doble de ADN) han

sido fracturadas y unidas con otras. 2) Los nódulos están distribuidos a lo largo del complejo sinaptonémico en la misma forma que están distribuidos los eventos de entrecruzamiento. Por ejemplo, como los quiasmas, los nódulos están ausentes de esas regiones del complejo sinaptonémico que contienen heterocromatina. También se indica que la presencia de un entrecruzamiento impide que se efectúe otro en un sitio muy cercano, así mismo, los nódulos de recombinación no se encuentran muy cerca uno de otro. 3) Algunas mutaciones en Drosophila causan una distribución anormal de quiasmas a lo largo de los cromosomas, así como una gran disminución de la frecuencia recombinogénica. En esas mutaciones son encontrados pocos nódulos de recombinación, con una distribución modificada que es paralela a los cambios de distribución de quiasmas. Esta correlación sugiere fuertemente que un nódulo de recombinación determina el sitio de cada evento de entrecruzamiento (Alberts y col. 1989).

El estudio de los nódulos de recombinación, su número y su distribución, tanto de los elipsoidales como de los esféricos, en paquiteno, se realizó por reconstrucción tridimensional. También se ha observado una frecuencia de quiasmas de 5.7 por núcleo, ésta cifra corresponde a la frecuencia de 5.7 observado en la suma de nódulos de recombinación elipsoidales y esféricos en paquiteno temprano (Carpenter 1979). Con incorporación de timidina tritiada se ha demostrado que la síntesis de ADN tipo reparador toma lugar en los nódulos de recombinación y da soporte a la idea de que en ellos median cambios recíprocos y conversiones entre los cromosomas homólogos (Carpenter 1981).

DIPLOTENO

En el diploteno, los cromosomas íntimamente apareados comienzan a separarse. La separación no es completa, ya que los cromosomas homólogos permanecen unidos por los puntos de intercambio o quiasmas. A estos se les considera generalmente como la expresión de un fenómeno genético (crossing over). Este estadio está caracterizado por una progresiva decompactación de la cromatina, y la desaparición del complejo sinaptonémico. Los límites de los cromosomas son menos definidos y la cromatina en la región de los brazos laterales aparece como fibras esparcidas. Al mismo tiempo, se observa un incremento de estructuras que contienen RNP, aparecen fibras pericromatinianas en el área de cromatina extendida, y los gránulos pericromatinianos son pocos y siempre están en contacto con la cromatina (Vázquez-Nin y Echeverría 1976).

DIACINESIS

Durante ésta etapa la contracción de los cromosomas vuelve a acentuarse. Las tétradas se distribuyen más homogéneamente en el núcleo y el nucléolo desaparece. Al mismo tiempo el número de quiasmas disminuye. Al final de este período, por lo general, los homólogos quedan unidos solo por sus extremos (De Robertis y De Robertis 1989).

En éste estadio se forman pequeñas masas de cromatina compacta en la membrana nuclear, en contacto con el nucléolo. Los gránulos

pericromatinianos son prominentes, localizados alrededor de pequeños acúmulos de cromatina densa, o menos frecuentemente, en el área cromosómica. La disposición de éstos elementos es similar a la del núcleo interfásico (Vázquez-Nin y Echeverría 1976).

OTRAS FASES

Durante la prometafase I los cromosomas alcanza su máxima condensación. La envoltura nuclear se rompe y los microtúbulos del huso se ensamblan a los cinetocoros. Cada homólogo se une a uno de los polos por el centrómero homólogo; de esta manera las cromátidas hermanas se comportan como una unidad funcional.

En la metafase I los cromosomas se disponen en el plano ecuatorial. Los homólogos se hallan asociados por los extremos, mientras que los centrómeros migran hacia los polos.

En la anafase I las cromátidas hermanas de cada homólogo, unidas por su centrómero se dirigen a los respectivos polos. Los cromosomas cortos, conectados casi siempre por un quiasma terminal, se separan rápidamente. Los cromosomas largos, con quiasmas intersticiales se retrasan en su separación.

La telofase I comienza cuando las cromátidas llegan a sus respectivos polos. Los cromosomas pueden persistir condensados por un tiempo.

En la interfase entre dos divisiones meióticas no hay duplicación del ADN y los cromosomas se encuentran en número haploide.

A una corta profase II sigue la formación del huso. En la metafase II los cromosomas se disponen en el plano ecuatorial, los centrómeros se separan y las dos cromátidas hijas se dirigen a los polos opuestos durante la anafase II.

Cada uno de los cromosomas de los cuatro núcleos de la telofase II tendrán una cromátida. Cada núcleo posee un número haploide de cromosomas, en el cual cada cromosoma está representado una sola vez (De Robertis y De Robertis 1989).

ENFOQUE EXPERIMENTAL

Las evidencias mencionadas anteriormente sobre la presencia de ADN en los brazos laterales del complejo sinaptonémico y su posible ausencia en el elemento central y látero-medial abren la interrogante de como se lleva a cabo el entrecruzamiento de filamentos de ADN entre los cromosomas homólogos si éstos están separados 60nm o más. Por ésta razón se decidió estudiar la localización del ADN con un enfoque inmunocitoquímico, técnica que permite la localización "in situ" de moléculas.

La inmunocitoquímica se basa en la detección de antígenos mediante anticuerpos. Los antígenos son generalmente moléculas de alto peso molecular como las proteínas, los polisacáridos y ácidos nucleicos, exógenos a un animal, que al ser administrados a éste activan a los linfocitos, los que a través de un largo proceso producen anticuerpos específicos. La gran afinidad de los anticuerpos por su antígeno otorga gran especificidad a la reacción y disminuye el ruido de fondo, así como las reacciones cruzadas con otros componentes. En inmunocitoquímica, el anticuerpo se utiliza como un reactivo para localizar el antígeno contra el cual fué preparado y se aplica a una sección de tejido en la que interactúa con el antígeno tisular, formando un complejo antígeno-anticuerpo.

Hay dos métodos para localizar antígenos; el primero es el directo que consiste en marcar al anticuerpo con un colorante o una enzima, el segundo es el indirecto, en el cual el primer paso es la localización del

antígeno del tejido por un anticuerpo no marcado, aplicado al tejido (primer anticuerpo). En el segundo paso se visualiza la reacción por un anticuerpo desarrollado contra la inmunoglobulina del primer anticuerpo y unido a un marcador (segundo anticuerpo). En microscopía electrónica éstos deben contener elementos de alto número atómico o combinarse con uno de ellos. Los marcadores más usados son micelas de oro y la enzima peroxidasa, que cuando se le emplea en presencia de aminobencidina y peróxido de hidrógeno da un producto insoluble y osmófilo (Sternberger 1985).

OBJETIVO

Localizar el ADN, en el espacio de apareamiento de los cromosomas bivalentes (complejo sinaptonémico), como posible sustrato morfológico de la recombinación génica.

MATERIAL Y METODO

En el presente trabajo se emplearon gónadas de rata Wistar machos adultos y de pollos (Gallus domesticus) hembras de un día de nacidas. Tanto los gonocitos masculinos como femeninos fueron incluidos en diferentes resinas. Para un reconocimiento general de los complejos sinaptonémicos, se utilizó, una resina epóxica hidrofóbica (Glycidether 100, MERCK). El procedimiento fué el siguiente: El testículo de rata y el ovario de pollo fueron obtenidos bajo anestesia, cortándose en pequeños fragmentos los cuales se fijaron inmediatamente en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos 0.2 M a pH 7.2 durante dos horas, el material se enjuagó tres veces en el mismo amortiguador (10 min cada uno). La mitad del material fué postfijado con tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de fosfatos, durante 60 min. y enjuagado tres veces en el mismo amortiguador.

Tanto las muestras postfijadas como las que no lo fueron se deshidrataron en alcoholes graduales, empezando 70% hasta llegar a 100% realizando dos cambios de 10 min cada uno. Después se introdujeron en óxido de propileno, paso intermedio entre la deshidratación y la preinclusión.

La preinclusión se realizó con 50% de óxido de propileno más 50% de resina epóxica a temperatura ambiente por 24 horas. Al día siguiente el óxido de propileno se dejó evaporar totalmente y se llevó a cabo la inclusión sobre moldes planos de plástico, en donde se colocó la resina

epóxica con algunos fragmentos de testículo y ovario. La polimerización se realizó en una estufa a 60°C durante 24 horas.

Para hacer las reacciones inmunocitoquímicas, se utilizaron resinas acrílicas hidrosolubles como LR-White y Lowicryl HM23. Al emplear LR-White todos los procedimientos se llevaron a cabo a 4°C.

El testículo de rata y el ovario de pollo fueron obtenidos bajo anestesia y cortados en pequeños fragmentos e inmediatamente fijados, unos en glutaraldehído 2.5%, otros en glutaraldehído al 1% más paraformaldehído al 4% y otros en paraformaldehído al 4%, cada uno de los fijadores fueron disueltos en amortiguador de fosfatos 0.2M a pH 7.2. Posteriormente se enjuagó tres veces el tejido con el mismo amortiguador (5 min por cambio).

La deshidratación se empezó con alcohol al 30% hasta llegar a 90%, una hora en cada alcohol, en el de 100% se se llevaron a cabo tres cambios de una hora cada uno.

La infiltración fué en tres pasos: 1) Se colocaron en una mezcla de dos partes de alcohol al 100% por una de LR-White, tres horas; 2) Después en una mezcla de una parte de alcohol 100% más dos de LR-White, tres horas; 3) Por último en LR-White, toda la noche. Al día siguiente se realizaron tres cambios de LR-White, de una hora cada uno.

Los fragmentos de tejido tanto de testículo como de ovario fueron puestas en cápsulas de gelatina con LR-White, tratando de dejar la menor cantidad posible de aire. La polimerización se llevó a cabo en una estufa a 50°C durante 20 horas.

Para la inclusión con Lowicryl HM23, las fijaciones que se usaron

fueron; glutaraldehído al 1% más paraformaldehído al 4% y otra con paraformaldehído al 4%, disueltos en el amortiguador de fosfatos utilizado en las inclusiones anteriores, la deshidratación fué de la siguiente manera: se emplearon alcoholes graduales iniciando por el de 30% que se aplicó una hora, en el 50% toda la noche, y con 70, 80, 90 y 100% una hora en cada uno, a temperatura de -20°C.

La infiltración empezó con una mezcla de Lowicryl HM23 más una parte de alcohol absoluto por una hora, después en dos partes de resina más una parte de alcohol absoluto una hora y por último dos cambios de resina, el primero de una hora y el segundo de 16 horas a -20°C. La polimerización se hizo en cápsulas de gelatina en una cámara de luz ultravioleta por dos horas.

Para un reconocimiento general de los complejos sinaptonémicos se utilizaron los bloques de tejido incluido en la resina epóxica o en resinas acrílicas, de los cuales se obtuvieron cortes semifinos en un ultramicrotomo Sorvall MT2, de un grosor aproximado de 240nm, éstos fueron montados en portaobjetos, teñidos con azul de toluidina y observados en un microscopio óptico Carl Zeiss, identificando las células en estadio paquiteno según Leblond y Clermont (1952). Después de escoger la zona deseada se procedió a obtener cortes ultrafinos de aproximadamente 60nm de grosor los cuales fueron montados en rejillas de 100 mesh. Estas se contrastaron por flotación en acetato de uranilo (10 min) y citrato de plomo (5 min).

Las preparaciones se analizaron en un microscopio electrónico Carl Zeiss EM10, a diferentes aumentos.

De las muestras incluidas en las resinas acrílicas hidrosolubles se efectuaron cortes ultrafinos de aproximadamente 60nm de grosor y se montaron en rejillas de 100 mesh. Estas rejillas fueron utilizadas para el inmunomarcado de ADN, que se realizó por flotación en una cámara húmeda para evitar la evaporación de los anticuerpos (Fakan y col.1984).

El primer paso fué colocar cada rejilla sobre una gota de NGS (suero normal de cabra), disuelto en PBS (amortiguador de fosfatos salino) en una proporción de 1:50 durante tres minutos, para evitar el ruido de fondo. Posteriormente se removió el exceso de NGS de las rejillas con papel filtro e inmediatamente después fueron colocadas en una gota de α ADN (anticuerpo monoclonal producido en células de ratón) disuelto en PBS-BSA-tween, en una proporción de 1:15, 1:30 y 1:60, por 17 horas a una temperatura de 4°C.

Después las rejillas fueron enjuagadas por goteo y flotación en PBS-tween y en PBS e inmediatamente colocadas sobre una gota de NGS 1:50 por tres minutos. El segundo anticuerpo utilizado fué GAMiGM (suero de cabra antigama globulina M de ratón, marcado con gránulos de oro coloidal de 10nm de diámetro) disuelto en PBS en una proporción de 1:20 y 1:40. El tiempo en que permanecieron las rejillas en el segundo anticuerpo fué de 30 min.

Por último las rejillas se enjuagaron por goteo y flotación en PBS y agua bidestilada. Cuando estuvieron totalmente secas fueron contrastadas con acetato de uranilo (5 min) y con citrato de plomo (3 min) o con un contraste preferencial para ribonucleoproteínas que es con acetato

de uranilo (10 min) - ácido etilenediaminetetraacético (EDTA) por dos minutos y citrato de plomo (2 min) (Bernhard 1969) y con contraste preferencial para ADN con ácido fosfotungstico (PTA) a pH 2.85 por 40 min (Vázquez-Nin y col. 1973).

Las rejillas ya contrastadas fueron observadas en un microscopio Carl Zeiss EM10. Se obtuvieron micrografías a diferentes aumentos de las inmunolocalizaciones realizadas.

RESULTADOS

Los resultados de este trabajo están basados en reacciones inmunocitoquímicas.

Inicialmente se presentarán los elementos ultrasturcturales más característicos del complejo sinaptonémico.

La Fig.1 muestra a pequeño aumento un núcleo en paquitenio, en donde se observa su doble envoltura nuclear, cromatina compacta la cual tiene un mayor contraste. También se nota un pequeño complejo sinaptonémico que está unido a la envoltura nuclear.

El complejo sinaptonémico está formado, como se describió en la introducción, de dos largos brazos laterales que en el caso de la Fig.2 atraviesa gran parte del núcleo, haciéndose evidentes por manifestar un alto contraste. El elemento medial y las fibrillas látero-mediales revelan un contraste ligero.

Los gránulos de oro coloidal que indican las moléculas de ADN, fueron localizados sobre la cromatina compacta, los brazos laterales, y rara vez sobre el elemento medial y las fibrillas látero-mediales. Algunos de estos casos excepcionales son señaladas en las figuras 3,4,5 y 6, en las que los gránulos de oro coloidal se encuentran sobre el brazo medial y las fibrillas látero-mediales. En estas micrografías se descarta la

superposición de cromatina sobre el complejo sinaptonémico, ya que el espesor del corte es de aproximadamente 60nm y la ranura sináptica es clara en el lugar de la marca.

En las Figs.3 y 5 se advierte que el cúmulo central de partículas de oro coinciden con una densificación irregularmente esferoide, que corresponde a un nódulo de recombinación. Es interesante notar que las placas adhesivas están prácticamente desprovistas de oro (Fig.3).

En las figuras 4 y 6 se observan gránulos de oro sobre la parte central del complejo sinaptonémico abarcando el elemento medial y las fibrillas látero-mediales, sin embargo no se advierte la presencia de nódulos de recombinación.

La superposición de la cromatina en el espacio situado entre los brazos laterales (ranura sináptica) se produce cuando el complejo está girado sobre su propio eje, como se ve en la Fig. 7.

Por último se realizaron contrastes preferenciales para ARN y ADN. El ARN se demostró con la técnica de acetato de uranilo-EDTA- citrato de plomo (Bernhard 1969). Los brazos laterales son muy positivos en esta tinción (Fig.8) y también presentan ADN, como lo indica el inmunomarcado de las Figs. 4 y 7. La presencia de fibras de ADN que se tiñen con el ácido fosfotungstíco (Vázquez- Nin y col. 1973) y se marcan con oro coloidal en los brazos laterales, se observa en la Fig.9. En ella queda de manifiesto una pequeña fibra de ADN que atraviesa la ranura sináptica, y contiene oro coloidal.

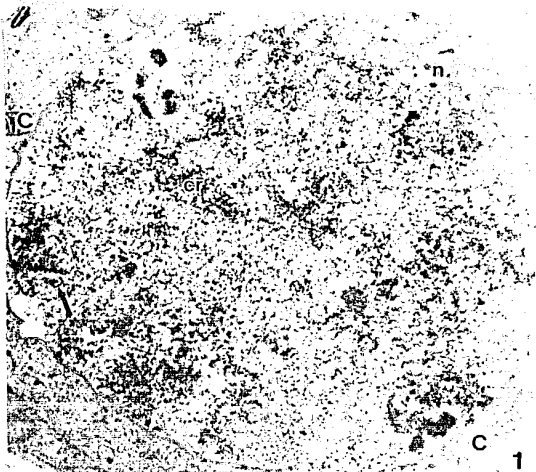


Fig.1. Núcleo de espermatocito I de rata, doble envoltura nuclear (n), cromatina (cr), complejo sinaptonémico (flecha), citoplasma (C). Contraste general con acetato de uranilo-citrato de plomo. X 36 000.



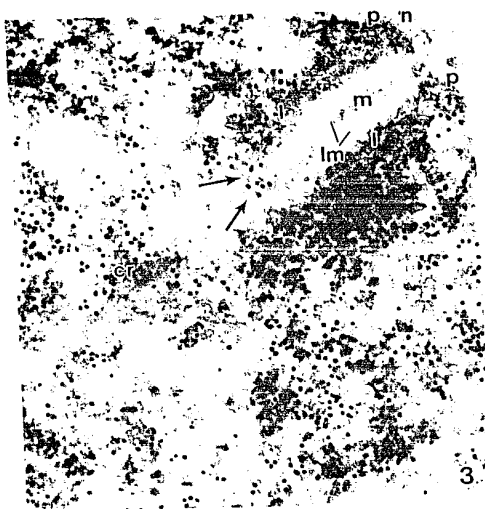
Fig.2. Espermatocito I de rata mostrando un largo complejo sinaptonémico (CS), citoplasma (C), brazos laterales (l), brazo medial (m), filamentos látero-mediales (lm). acetato de uranilo-citrato de plomo. X 41 600.

FIGURAS

Fig.3. Complejo sinaptonémico de espermatocito I de rata resaltando la placa adhesiva (p) que une al complejo sinaptonémico con la envoltura nuclear (n). Se observan los brazos laterales (l), brazo medial (m), fibrillas látero-mediales (lm) y cromatina (cr). Las flechas indican los gránulos de oro coloidal (ADN) sobre un nódulo de recombinación. α ADN 1/30, GAMIGM 1/40. acetato de uranilo-citrato de plomo. X 87 500.

Fig.4. Espermatocito I de rata mostrando un complejo sinaptonémico con marca de oro coloidal sobre los brazos laterales (l), el brazo medial (m), y las fibrillas látero-mediales (lm). Las puntas de flechas indican una posible superposición de cromatina sobre el complejo sinaptonémico, las flechas indican los gránulos de oro coloidal (ADN) que se encuentran en el espacio de apareamiento de los cromosomas homólogos. La cromatina que rodea al complejo (cr) está fuertemente marcada. acetato de uranilo-citrato de plomo. X 70 000.

FIGURAS



FIGURAS



Fig.5. Núcleo en estadio paquíteno de testículo de rata, mostrando la ubicación del ADN sobre un nódulo de recombinación, en el espacio de apareamiento de los cromosomas homólogos (flecha). Se observan los brazos laterales (l), el brazo medial (m), y las fibrillas látero-mediales (lm). Contraste general con acetato de uranilo-citrato de plomo. α ADN 1/60, GAMIGM 1/40. X 87 500.

FIGURAS

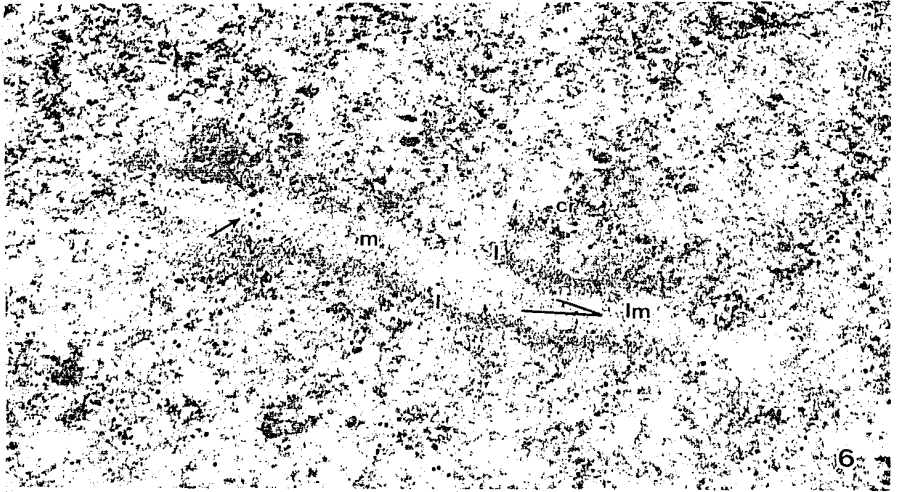


Fig.6. Complejo sinaptonémico de espermatocito I de rata, mostrando alineamiento de partículas de oro coloidal (flechas) señalando un posible entrecruzamiento de los cromosomas homólogos. en un punto específico. Brazos laterales (l), brazo medial (m), y fibrillas látero-mediales (lm), cromatina (cr). α ADN 1/15, GAMiG 1/20. Contraste general con acetato de uranilo-citrato de plomo. X 87 500.

FIGURAS

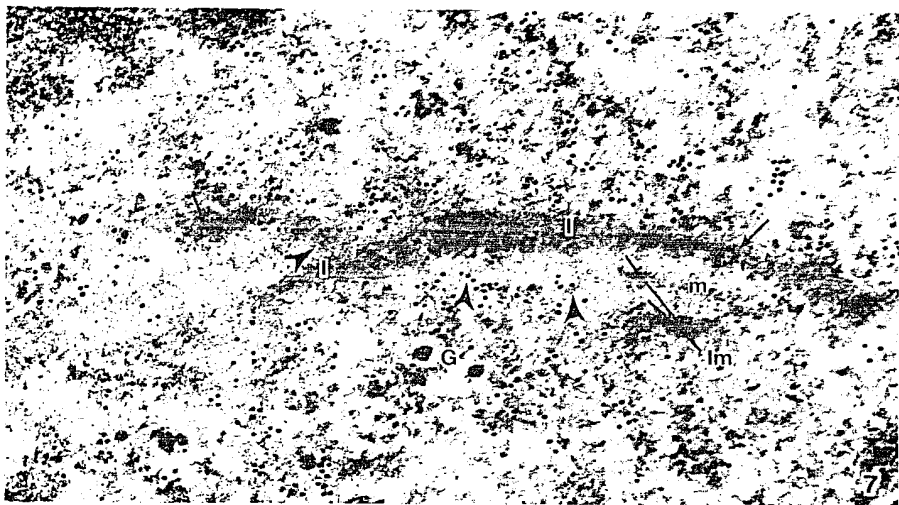


Fig.7. Complejo sinaptonémico de un núcleo en un estadio paquíteno de testículo de rata, presentando un giro sobre su propio eje. Brazos laterales (l), medial (m), fibrillas latero-mediales (lm). Las puntas de flechas indican partículas de oro coloidal (ADN) debido a la posible superposición de la cromatina sobre el complejo sinaptonémico, las flechas indican la localización del ADN sobre los brazos laterales. Es interesante señalar que las dos esferas radiadas de halo claro (gránulos pericromatinianos) marcados con una G, son de naturaleza ribonucleoproteica y carecen de marca mientras que la cromatina que las rodea está marcada. α ADN 1/60 GAMiGm 1/60. Contraste general con acetato de uranilo-citrato de plomo. X 87500.

FIGURAS

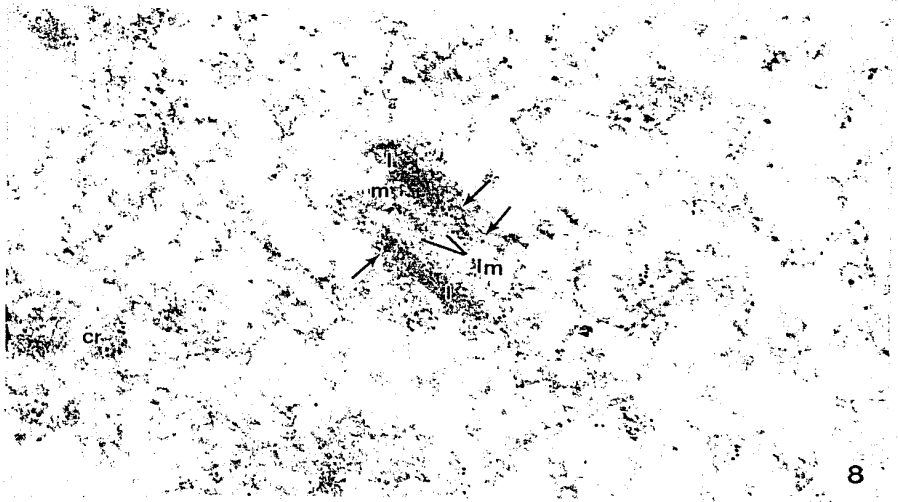


Fig.8. Núcleo de ovario de pollo de un día de nacido, mostrando la localización de moléculas de ADN en el brazo lateral (flechas). El contraste preferencial para ribonucleoproteínas muestra los brazos laterales (l), el medial (m), y las fibrillas látero-mediales (lm) teñidos oscuros. En la región de la cromatina que rodea al complejo se advierten algunas fibras y pequeños gránulos ribonucleoproteicos. α ADN 1/15 GAMiG 1/20. X87500

FIGURAS

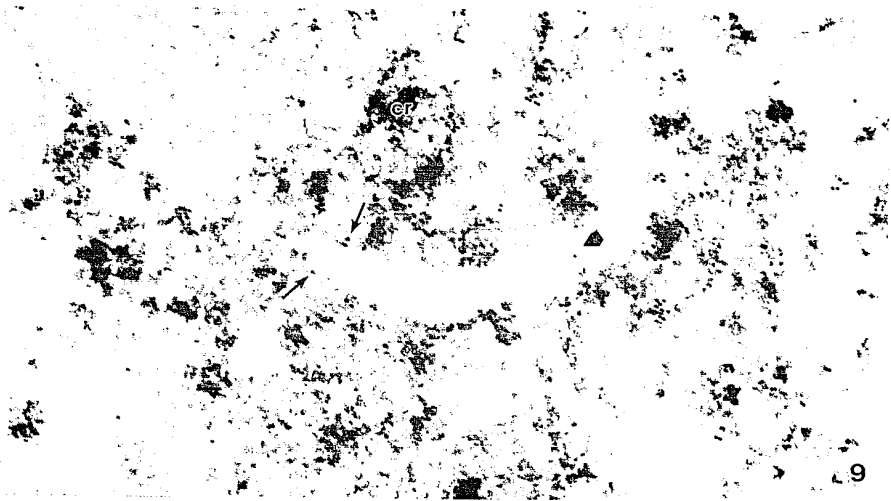


Fig.9. Complejo sinaptonémico de espermatocito I de rata, teñido con contraste preferencial para ADN con ácido fosfotungstico (PTA), mostrando la cromatina (cr) y gránulos de oro coloidal (flechas). Obsérvese la estricta colocación del contraste y los gránulos de oro. Nótese que uno de estos gránulos está situado en el espacio sináptico sobre una delgada fibra de ADN que se encuentra en la ranura sináptica (punta de flecha). α ADN 1/60, GAMiGM 1/60. X70000.

DISCUSION

Las micrografías anteriores demuestran la presencia de ADN, sobre los brazos laterales, como había sido sugerido por Vázquez-Nin y Echeverría (1976), Coll y col. (1986) y Latos-Bielecka y col. (1990). La concentración de la marca es más baja que la de la cromatina porque estos brazos contienen abundantes ribonucleoproteínas que se verifica con la tinción de EDTA que había sido sugerido por Esponda y Stockert (1971), Vázquez-Nin y Echeverría (1976) y Sakaguchi y col. (1983).

También se encontró que el ADN está presente entre los brazos laterales y tiende a formar puentes del uno al otro. Este hecho no es frecuente, ya que no todas las fibrillas latero-mediales, ni todo el brazo medial tienen ADN.

Sin embargo, su manifestación es constante tanto en espermatoцитos como en ovocitos.

Muchas de las observaciones están lejos de los lugares en donde los complejos sinaptonémicos giran sobre su eje y uno de sus brazos ó aún el área cromatínica externa pudiera estar superpuesta en el espesor del corte, que es menor o a lo sumo igual a la distancia entre los elementos laterales.

La claridad del espacio entre los brazos laterales aún en preparaciones contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo, indica que no existen elementos superpuestos en este espacio.

Según la teoría de preselección de Stern y col. (1975), la porción de ADN que es atrapada por los brazos laterales puede ser provechosa para unir las contrapartes homólogas del complejo sinaptonémico. Nuestros resultados demuestran que las moléculas de ADN que se localiza en el complejo sinaptonémico forman puentes de un brazo lateral al otro, abarcando el brazo medial y las fibrillas latero-mediales, comunicando los cromosomas homólogos y por lo tanto el ADN se encuentra entre los brazos laterales únicamente en los lugares correspondientes a los quiasmas.

Como se ha observado, los nódulos de recombinación están marcados con oro coloidal, indicando la presencia de ADN sobre éstos. Dando soporte a la idea de que en ellos median cambios recíprocos entre los cromosomas homólogos, como ha sido sugerido por Carpenter (1981).

Otras evidencias de que los nódulos de recombinación tienen esta función, es la correlación entre el número y distribución de los nódulos de recombinación y los quiasmas (Alberts y col. 1989).

El incremento en el radio de los nódulos de recombinación durante paquiteno y el número constante de éstos y de quiasmas durante el paquiteno temprano al paquiteno tardío son compatibles con una relación de los nódulos de recombinación con la formación y mantenimiento de los quiasmas (Holm y Rasmussen 1981).

Posiblemente las marcas de oro coloidal sobre los nódulos de recombinación se deban a quiasmas en proceso, y las marcas entre los brazos laterales sin nódulos de recombinación podrían deberse a quiasmas ya establecidos.

CONCLUSIONES

Con los datos obtenidos con la utilización de las técnicas de inmunolocalización y contrastes preferenciales para cromatina y ribonucleoproteínas, para microscopía electrónica, se resalta la localización de ADN, en los brazos laterales, con una concentración de marcado más baja que en la cromatina.

También la presencia de ADN en el complejo sinaptonémico, formando puentes de un brazo lateral al otro, abarcando el brazo medial y las fibrillas látero-mediales, comunicando a los cromosomas homólogos.

El ADN se encontró entre los brazos laterales en unos pocos lugares que por su frecuencia pueden corresponder a los quiasmas.

Los nódulos de recombinación se encontraron con gránulos de oro coloidal, indicando una posible mediación entre los cromosomas homólogos y la relación de los nódulos de recombinación con la formación de quiasmas.

REFERENCIAS

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J. 1989. Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York & London. Capítulos 5 y 15
- Ashley, T. 1987. G-Bands position effects on meiotic synapsis and crossing over. Genetics 118: 307-317.
- Ashley, T., Cacheiro, L.A. 1990. Correlation between meiotic behavior and breakpoint with respect to G-bands in two X-4 mouse translocations: T(X;4)7R1 and T(X;4)8R1. Cytogenet Cell Genet 53:178-184.
- Bennett, M.D. 1984. Premiotic events and meiotic chromosome pairing. Society for Experimental Biology. 87-121.
- Bernelot-Moens, C., Moens, B.P. 1986. Recombination nodules and chiasma localization in two Orthoptera. Chromosoma (Berl) 93:220-226.
- Bernhard, W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. J. Ultrastruct. Res. 27:250-265.
- Carpenter, A.T. 1979. Recombination nodules and synaptonemal complex in recombination defective females of Drosophila melanogaster. Chromosoma 75: 259-292.
- Carpenter, A. T. 1981. EM autoradiographic evidence that DNA synthesis occurs at recombination nodules during meiosis in Drosophila melanogaster female. Chromosoma 83:49-80.
- Coll, D., Clavaguera, A., Querol, E. 1986. Studies on the cytochemical nature of the synaptonemal complex in *Mus musculus*. Cell. Molec. Biol. 32:441-447.

- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore. 1990. Molecular Cell Biology. Scientific American Books. Inc. Capitulo 23.
- De Robertis, E., De Robertis, E. 1989. Cell and molecular biology. Lea & Febegr. Philadelphia. Edición nueve. Capitulo 16.
- Esponda, P., Stockert, J.C. 1971. Localization of RNA in the synaptinomal complex. J. Ultraestruct. Res. 35:411-417.
- Fakan, S., Leser G. y Martin, T.E. 1984. Ultraestructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by inmunocytochemistry on thin sections. J. Cell Biol. 98:358-363.
- Heyting, C., Dettmers, R.J., Dietrich, A.J., Redeker, J.W. 1988. Two major components of synaptonemal complexes are specific for meiotic prophase nuclei. Chromosoma 96:325-332.
- Holm, P.B., Rasmussen, S.W. 1981. International Cell Biology -Chromosome pairing, crossing over, chiasma formation and disjunction as revealed by three dimensional reconstructions. (Ed. H.G. Schweiger). Springer Verlag. Berlin. 195-204.
- Ierardi, L.A., Moss, S.B. y Bellvé, A.R. 1983. Synaptonemal complex are integral components of the isolated mouse spermatocyte nuclear matrix. J. Cell Biol. 96:1717-1726.
- Jones, H. 1973. Light and electron microscope studies of chromosome pairing in relation to chiasma localization in Stethophyma grossum (Orthoptera: Acrididae). Chromosoma 42: 145-162.
- Kurata, N., Ito, M. 1978. Electron-Microscope Auto-radiography of thymidine H³ Incorporation during the zygotene stage in microsporocytes of Lily. Cell Struct. 3:349-356.
- Latos-Bielaska, A., Trautmann, T., Vogel, W. 1990. Visualization of DNA in pachytene by monoclonal antibodies against BrdU reveals synaptonemal complex-like structures. Cytogenet. Cell Genet. 54:24-28.
- Leblond, C.P., Clermont, Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Ann. N. Y. Acad. Sci. 55: 548-569.
- Loidl, J. 1991. Coming to grips with a complex matter. Chromosoma 100: 289-292.

- Moens, P.B. 1990. Unravelling meiotic chromosomes: topoisomerase II and other proteins. *J. Cell Sci.* 97:1-3.
- Moens, P.B., Pearlman, R.E. 1989. Satellite DNA I in chromatin loops of rat pachytene chromosomes and in spermatids. *Chromosoma* 98:287-294.
- Moens, P.B., Pearlman, R.E. 1990. Telomere and centromere DNA are associated with the cores of meiotic prophase chromosomes. *Chromosoma* 100:8-14.
- Moens, P.B., Heyting, C., Dietrich, A. J., van Raamsdonk, W. 1987. synaptonemal complex antigen location and conservation. *J. Cell Biol.* 105:93-103.
- Sakaguchi, K., Takagami, M.H., Ito, M. 1983. Inhibition of RNA synthesis in meiotic cells and its effect on meiotic development. *Cell Structure and Function* 8:127-135.
- Schulz-Schaeffer, J. 1980. *Cytogenetics: Plants, Animals, Human.* Springer-Verlag, New York.
- Solari, A. J. 1972. Ultrastructure and composition of the sinaptonemal complex in spread and negatively stained spermatocytes of the golden hamster and the albino rat. *Chromosoma* 39:237-263.
- Stern, H., Westergaard, M. y Von Wettstein, D. 1975. Presynaptic events in meocytes of *Lilium longiflorum* and their relation to crossing-over: a preselection hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:961-965.
- Stern, H., Hotta, Y. 1980. The organization of DNA metabolism during the recombinational phase of meiosis with special reference to human. *Molec. Cell Biochem.* 29:145-157.
- Stern, H., Hotta, Y. 1984. The organization of DNA segments undergoing repair synthesis during pachytene. *Chromosoma* 89:127-137.
- Sternberger, L. A. 1985. *Immunocytochemistry.* Churchill Livingstone, New York. Capitulo 1.
- Swanson, C.P., Merz., T., Young, W.J. 1981. *Cytogenetics: the chromosoma in division inheritance and evolution.* Prentice Hall, Englewood Cliffs, New York. 2a. Edición. Capitulo 4.

- Vázquez-Nin, G.H., Chavez, B., y Tomás-Martín, C. 1973. A preferencial staining method for chromatin in electron microscopy. *J. Microscopie* 16:243-246.
- Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M. 1976. Ultraestructural study on the meiotic prophase nucleus of rat oocytes. *Acta Anat.* 96:218-231.
- Villardel, J., Coll, D., Querol, E., Egozcue, J. 1989. Histone electrophoretic pattern in the characterization of synaptonemal complexes. *Cel. Molec. Biol.* 35:207-214.
- Von Wettstein, D. 1977. The assembly of the synaptonemal complex. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 277:235-243.
- Von Wettstein, D., Rasmussen, W., Holm, P.B. 1984. The synaptonemal complex in genetic segregation. *Ann. Rev. Genet.* 18:331-413.
- Westergaard, M., Von Wettstein, D. 1970. Studies on the mechanism of crossing over. IV. The molecular organization of the synaptonemal complex in *Neottiella* (Cooke) Saccardo (Ascomycetes). *C.r. Trav. Lab. Carlsberg.* 37:239-268.
- Westergaard, M., Von Wettstein, D. 1972. The synaptonemal complex. *Ann. Rev. Genet.* 6:71-76.
- Zickler, D., Huynh, A.D., Moreau, P.J. 1988. Genetic control of synaptonemal complex in the ascomycete Sordaria macrospora. *Brandham PE. Kew Chromos conf. III HMSO, London.* p.p. 331-335.