



00341  
1  
24.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL E  
INMUNOCITOQUÍMICO DEL COMPLEJO  
SINAPTONÉMICO AL INICIO DE  
LA SINAPSIS**

**T R A B A J O**

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE  
ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA  
ELECTRÓNICA APLICADA A LAS  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

**P R E S E N T A**

**MA. ERNESTINA FLORES RIVERA**

**DIRECTOR DE TESIS : DR. GERARDO HEBERT VAZQUEZ-NIN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1997



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.

*Una cosa que he aprendido en una larga vida es que toda nuestra ciencia, comparada con la realidad, es primitiva e infantil, pero es lo más precioso que tenemos.*

**ALBERT EINSTEIN.**

*Quiero agradecer:*

*A mis padres porque sin ellos no sería lo que soy, con toda la admiración y amor que siento por ellos.*

*A mi esposo a quien amo y respeto, de quien he aprendido tantas cosas que no las podría numerar. Las palabras no son suficientes para expresar lo que siento por él.*

*A mi hermano y hermanas, que siempre me han brindado su amor y su apoyo.*

*A mis sobrinos porque son una parte esencial de la familia.*

*Al Dr. Gerardo Hebert Vázquez-Nin y a la Dra. Olga M. Echeverría por su ayuda y apoyo*

*A los sinodales por sus importantes aportaciones a la tesina.*

*A mis amigos y compañeros que siempre me han brindado su ayuda desinteresada*

**GRACIAS.**

*Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Microscopia  
Electrónica de la Facultad de Ciencias, bajo la dirección  
del Dr. Gerardo Hebert Vázquez-Nin.*

***I. RESUMEN***

***II. INTRODUCCION***

***III. OBJETIVOS***

***IV. MATERIAL Y METODO***

***V. RESULTADOS***

***VI. DISCUSION***

***VII. BIBLIOGRAFIA***

**RESUMEN**

Los CSs se caracterizan por la presencia de dos elementos laterales y una región central. Los elementos laterales son paralelos y equidistantes. La cromatina de los cromosomas homólogos, se une en una serie de asas a estos elementos. La región central se localiza entre los elementos laterales. Está formada por las fibrillas latero-mediales y el elemento medial. Las primeras se orientan perpendicularmente al eje longitudinal del CS y conectan los elementos laterales con el elemento medial.

Los nódulos de recombinación juegan un papel activo en los procesos de recombinación y formación de quiasmas, se asocian a intervalos con la región central entre los cromosomas homólogos.

La localización y función de los ácidos nucleicos en la formación y apareamiento del complejo sinaptonémico es poco conocida, por lo que se buscan alternativas metodológicas para resolver este tipo de problemas.

En el presente trabajo se estudió, la distribución de ADN en ovocitos de pollo en cigoteno utilizando técnicas para microscopía electrónica de inmuno-oro. Además se emplearon técnicas citoquímicas como; contraste preferencial para ADN o preferencial para ribonucleoproteínas (RNPs).

La combinación de tinción preferencial para RNPs e inmunolocalización de ADN nos demuestran que la cromatina se acumula conjuntamente con las ribonucleoproteínas en los elementos laterales no apareados y la presencia de numerosas fibrillas RNPs distribuidas laxamente alrededor de los elementos laterales.

Se encontraron nódulos de recombinación entre los elementos laterales durante el apareamiento, estos nódulos son PTA positivos lo que nos indica la presencia de ADN en éstos y por lo tanto la presencia de ADN entre los elementos laterales.

La presencia de un puente de fibrillas marcadas con oro coloidal (ADN) uniendo a los elementos laterales no apareados, sugeriría al ADN como una especie de macromolécula formadora de sitios de sinapsis.

**II**

**INTRODUCCION**

Muchos eucariontes inferiores como algunos protoctistas, algas y hongos proliferan por división celular simple o mitosis, otros tales como la Hydra que 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 esta última, con la consiguiente diversificación genética, ha presentado grandes ventajas, dado que es la única existente en la mayoría de las plantas y animales (Bemelot-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 en el momento de la fertilización, dando lugar a una célula diploide o cigoto que a través del proceso de mitosis, se multiplica y se diferencia.

En el sexo femenino, la primera etapa de desarrollo de los gametos empieza cuando 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.

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:

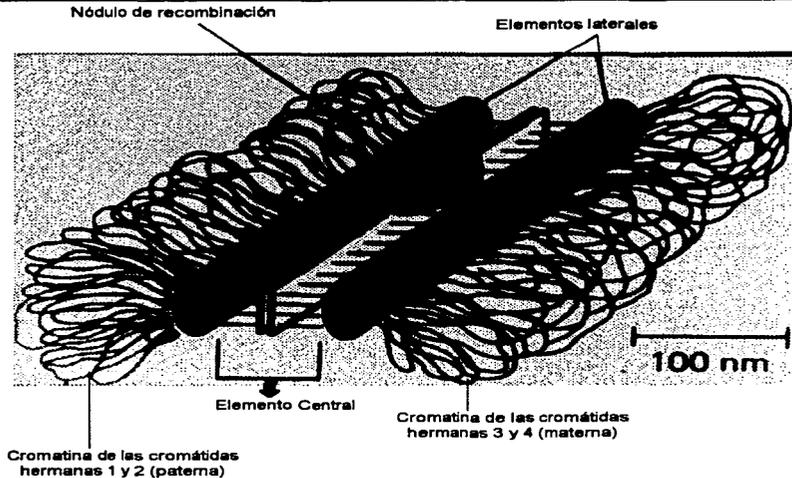
- \* Reducción en el número cromosómico
- \* Recombinación con intercambio de segmentos cromosómicos (bloques de genes) por medio de crossing-over.

La duración de los diferentes estadios o subestadios de la meiosis varia 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.

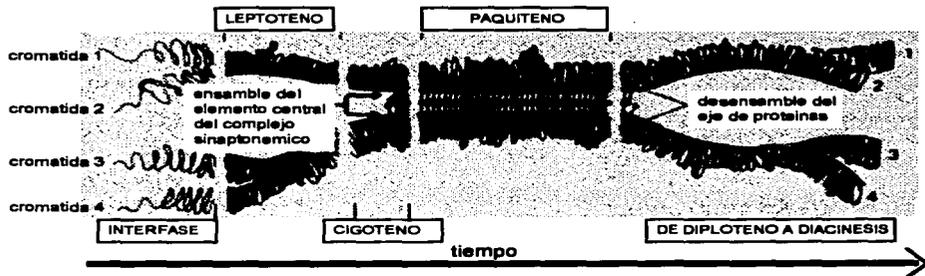
Durante la profase meiótica I, los cromosomas homólogos se aparean pero no se fusionan, puesto que permanecen separados por un espacio de 60 nm o más, que es ocupado por el complejo sinaptonémico (CS). Éste es una estructura tripartita típica de las células en profase meiótica, descubierta por Moses (1956) en espermatocitos de una especie de cangrejo. Desde entonces, el CS ha sido objeto de varios tipos de estudios, ya que se ha observado en meiocitos de toda clase de eucariontes (Moses 1968; Sotelo 1969; Westergaard y von Wettstein 1972; Gilles 1975; von Wettstein y col. 1984; Loidl 1990, 1991). Ahora es claro que el complejo sinaptonémico está involucrado en el apareamiento de los cromosomas homólogos, como se ha demostrado por medio de reconstrucción tridimensional del núcleo de espermatocitos I (Sotelo 1969; Moses 1969; Comings y Okada 1970).

Esta estructura está formada por dos gruesos elementos laterales, uno delgado medial y finas fibrillas látero-mediales.



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

Las cromátidas hermanas son estrechamente empaquetadas, extendiéndose a lo largo de los elementos laterales en una serie de bucles. Las asas de cromatina tienden a la coalescencia en ciertas regiones o focos de los elementos laterales que tienen un centro electrodenso. Los extremos de los elementos laterales relacionados a los telómeros se unen a la envoltura nuclear, constituyendo 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).



**FORMACION DEL COMPLEJO SINAPTONEMICO**

El estadio cigoténico se inicia con la sinapsis de los cromosomas homólogos, el alineamiento de un cromosoma materno con un cromosoma paterno, la distancia entre éstos es aproximadamente de 100 nm o más. El elemento central es transportado hacia el borde de los cromosomas, organizándose sobre los elementos laterales, subsecuentemente el complejo sinaptonémico es completado al unirse el elemento lateral libre (von Wettstein y col. 1984).

En el elemento central se ensamblan los nódulos de recombinación (Westergaard y von Wettstein 1970,1972), localizados como pelotas sobre una escalera entre los dos cromosomas homólogos (Alberts y col. 1989). Stern y Hotta (1984) han observado una pequeña síntesis de ADN en estado cigoténico que puede estar relacionado al reconocimiento de los cromosomas homólogos (ADN-cigoténico) y con el crossing over (ADN-paquiténico).

El apareamiento puede comenzar en cualquier sitio de los cromosomas, pueden unirse por sus extremos polarizados (telómeros) y continuar apareándose hacia el otro extremo, o empezar en las regiones internas y avanzar 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). Éste 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 (Stern y Hotta 1978). 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 menor que la longitud ocupada en cromosomas mitóticos. La baja cantidad de heterocromatina puede ser causada por una gran compactación comparada con la eucromatina, proporcionando una restricción física sobre los procesos de crossing over en regiones heterocromáticas (Ashley 1988).

Se piensa que en la recombinación 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 (Alberts y col. 1989). Westergaard y von Wettstein (1970, 1972) describen los nódulos de recombinación, como estructuras esféricas o elipsoidales situadas entre los elementos laterales del complejo sinaptonémico en *Neotiella*. Carpenter (1975) encuentra esas estructuras en los oocitos de *Drosophila melanogaster* y correlaciona la frecuencia y la distribución de estos nódulos con el crossing over.

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 (Von Wettstein 1977). A éstos 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. Al mismo tiempo se observan fibras cromatinianas en el área de

la cromatina extendida, y los gránulos pericromatinianos son pocos y siempre están en contacto con la cromatina (Vázquez-Nin y Echeverría 1976).

En diacinesis las tétradas se distribuyen más homogéneamente en el núcleo y el nucleolo desaparece. En este estadio se forman pequeñas masas de cromatina compacta en la membrana nuclear. Los gránulos pericromatinianos son prominentes, localizados alrededor de pequeños acúmulos de cromatina densa. La disposición de estos elementos es similar a la del núcleo interfásico (Vázquez-Nin y Echeverría 1976).

Durante la prometafase I los cromosomas continúan su 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.

En la anafase I las cromátidas hermanas de cada homólogo, unidas por su centrómero se dirigen a los respectivos polos.

La telofase I inicia cuando los centrómeros 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 (De Robertis y De Robertis 1989).

Las primeras investigaciones sobre el complejo sinaptonémico, fueron principalmente de morfología. Actualmente las investigaciones se dirigen a su determinación química y funcional.

Estudios citoquímicos como contraste preferencial para ADN (PTA) y para ribonucleoproteínas (EDTA) así como hidrólisis enzimáticas con DNAsa y RNAsa demostraron la presencia de ARN en los elementos laterales, en las fibras látero-laterales en cigoteno y paquiteno temprano. Y la presencia de ADN en los elementos laterales pero no entre ellos (Vázquez-Nin y Echeverría 1976). Estos resultados fueron confirmados por métodos bioquímicos; aislando

el complejo sinaptonémico se obtuvieron ARN y ADN de los elementos laterales (Heyting y col. 1988).

Los elementos laterales están compuestos, antes y después de la sinapsis, en su mayoría por proteínas histónicas y no histónicas (Villardel y col. 1989). Coll y col. (1986) concluyen en su trabajo que las proteínas son fundamentales para mantener la sinapsis de los brazos laterales.

Cada elemento lateral se ve como un filamento sencillo pero está formado por la reunión de dos cromátidas hermanas, es decir de dos dobles hélices de ADN. Con respecto a estudios de inmunoreacción de polipéptidos con anticuerpos policlonales desarrollados contra diferentes componentes del complejo sinaptonémico, se han 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).

También se ha encontrado en núcleos en estadio paquiteno la proteína SC48 localizada, con inmuno-oro, en la región central del complejo sinaptonémico. La SC48 es una proteína estructural específica de la división meiotica, que probablemente está involucrada en el apareamiento de los cromosomas homólogos (Smith y Benavente 1992).

El ADN es parte fundamental del complejo sinaptonémico. Del 0.3 al 0.1% de éste es sintetizado durante cigoteno y se le encuentra relacionado con el apareamiento cromosómico. Kurata e Ito (1978) concluyen en su trabajo realizado con incorporación de timidina tritiada en células de cigoteno, que el ADN se encuentra localizado en los elementos laterales y representa sitios de unión para la formación del complejo sinaptonémico.

Al suprimir parcialmente la síntesis de ADN con 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 toyocamina, 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 sugiere que el ARN es esencial para el desarrollo meiótico (Sakaguchi y col. 1983).

Los elementos laterales contienen altas concentraciones de ribonucleoproteínas en los primeros estadios de la profase meiótica, los que escasean en paquiteno avanzado, y están ausentes en diploteno.

La localización y función del ADN en la formación y apareamiento del complejo sinaptonémico es poco conocida, por lo que se buscan alternativas metodológicas para poder resolver este tipo de problemas.

Una de las técnicas que nos permiten la localización de diferentes tipos de moléculas "in situ", es la inmunocitoquímica.

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, consiste en marcar el anticuerpo con un colorante o una enzima, el segundo es el indirecto, 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 los marcadores deben tener 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 osmiófilo (Sternberger 1985).

En el presente trabajo, se estudia la distribución del ADN en ovocitos de pollo en cigoteno utilizando la técnica indirecta de inmuno-oro post-inclusión. Como

**complemento a la inmunocitoquímica se llevaron a cabo métodos de contraste preferencial para ADN y ribonucleoproteínas (RNP).**

**III**

**OBJETIVOS**

- ⚡ Demostrar la presencia de ácidos nucleicos en el complejo sinaptonémico, en la sinapsis.**
  
- ⚡ Analizar la importancia del ADN y ARN en la sinapsis como elementos determinantes de ésta.**

## **IV**

### **MATERIAL Y METODO**

En el presente trabajo se emplearon ovarios de embrión de pollo (*Gallus domesticus*) de 20 días de desarrollo. Las gónadas fueron extraídas bajo anestesia y fueron fijadas por inmersión en glutaraldehído al 2.5% en buffer de fosfatos 0.2 M a pH 7.2 durante dos horas, posteriormente se realizaron lavados de las muestras con el mismo buffer. Se deshidrató con alcoholes graduales (70, 80, 90 y 100%). Se utilizó óxido de propileno como una sustancia de enlace, intermedia entre la deshidratación y la preinclusión.

La preinclusión se realizó en una solución de óxido de propileno al 50% más 50% de resina epóxica (Glycidether 100, MERCK), a temperatura ambiente. Se polimerizó a 60°C durante 24 hrs en resina epóxica al 100% (tabla I).

Para hacer las reacciones inmunocitoquímicas se utilizó muestras fijadas con glutaraldehído al 1% más paraformaldehído al 4% o con paraformaldehído al 4% disueltos en buffer de fosfatos 0.2M a pH 7.2. La deshidratación se realizó con alcoholes graduales (50, 60, 70, 80, 90, 100%) una hora en cada alcohol. Los tejidos se incluyeron en una resina acrílica relativamente hidrosoluble (LR-White). La infiltración de la resina se llevó a cabo en tres pasos; una mezcla de dos partes de alcohol por una parte de resina, después en una parte de alcohol por dos partes de resina y por último en resina toda la noche. La polimerización se realizó en una estufa a 50° por 20 horas. La inclusión, la fijación y la deshidratación se llevó a cabo a 4° C (tabla II).

### **MICROSCOPIA OPTICA**

De las muestras incluidas tanto en la resina epóxica como en la resina hidrosoluble se hicieron cortes semifinos de aproximadamente 1µm de grosor, estos cortes fueron coloreados con azul de toluidina y observados en un microscopio óptico Carl Zeiss.

Al ser revisados, se encontraron zonas que contenían parte de corteza y parte de médula del ovario, otros que contenían corteza o únicamente médula. Se escogieron los bloques que contenían la corteza del ovario.

---

**MICROSCOPIA ELECTRONICA**

Para obtener cortes para microscopía electrónica, los bloques fueron rebajados, hasta tener una pequeña cantidad de ovocitos I.

En el caso de los bloques incluidos en resina epóxica, los primeros cortes fueron de aproximadamente 120 nm para observar con claridad el estadio cigoteno. Posteriormente los cortes se obtuvieron de 60nm aproximadamente. Se montaron en rejillas de cobre de 150 mesh previamente cubiertas con formvar. También se realizaron cortes seriados de ambas resinas, éstos fueron montados en anillos de Sjöstrand.

Algunos cortes ultrafinos, tanto de resina epóxica como de resina acrílica se contrastaron con acetato de uranilo-citrato de plomo, Otros con el contraste de Bernhard (1969), preferencial para ribonucleoproteínas (EDTA).

Las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico EM10 Carl Zeiss.

**INMUNOLocalización**

La inmunolocalización se realizó sobre los cortes de resina acrílica (LR-White), en el siguiente orden:

Primero los cortes fueron incubados 3 min con NGS (suero normal de cabra) 1:60 en PBS (buffer salino de fosfatos) para bloquear los sitios de unión inespecíficos, después son incubados toda la noche a 4° C, en una cámara húmeda con anti-DNA (anticuerpo monoclonal producido en células de ratón) en las siguientes diluciones; 1:20, 1:30 y 1:60 (5µg/ml, 3.33µg/ml, 1.66µg/ml, respectivamente) en PBS-BSA 0.01 % (albumina de suero de bovino)-tween.

Posteriormente se enjuagaron con una solución de PBS-tween (0.05%) y con PBS, después colocados 3 min en NGS e incubados 20 min en GAMiGM (suero de cabra antigama globulina M de ratón), marcado con gránulos de oro coloidal de 10nm de diámetro. La dilución del segundo anticuerpo fué de 1:20 en PBS (tabla III).

Los contrastes utilizados fueron; a) contraste general con acetato de uranilo-citrato de plomo, b) contraste preferencial para ribonucleoproteínas con acetato

## **MICROSCOPIA ELECTRONICA**

---

de uranilo-EDTA-citrato de plomo (Bernhard, 1969), c) preferencial para cromatina con ácido fosfotúngstico (PTA) a pH 2.4 (Vázquez-Nin y col., 1973).

**INCLUSION EN  
RESINA EPOXICA HIDROFOBICA**

**OVARIO DE EMBRION POLLO**



**FIJACION**  
(GLUTARALDEHIDO 2.5%)



**ENJUAGUES**



**DESHIDRATAACION**  
(ETANOL 70,80,90,100%)



**OXIDO DE PROPILENO**



**PREINCLUSION**

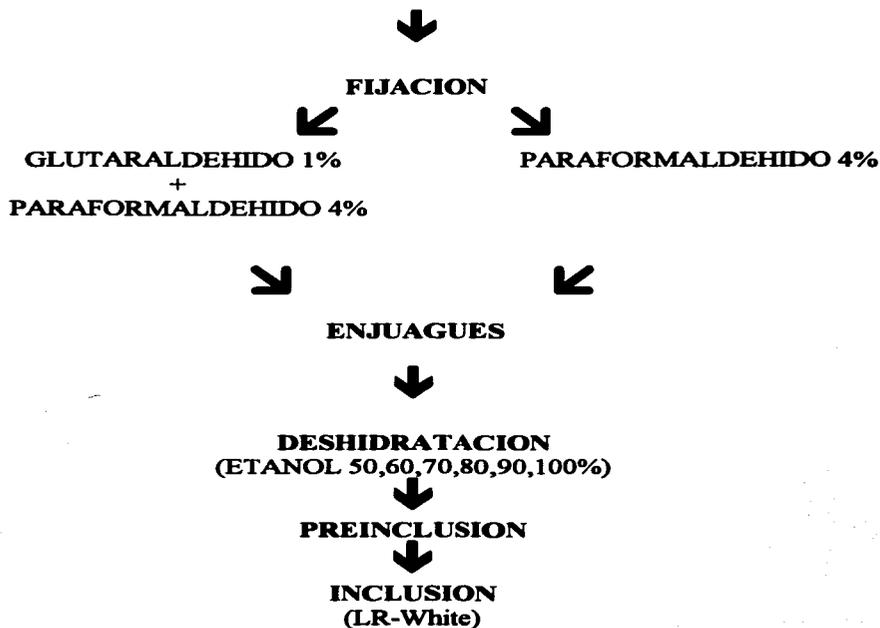


**INCLUSION**  
(GLYCIDETHER 100)

**TABLA I**

**INCLUSION EN  
RESINA ACRILICA**

**OVARIO DE EMBRION DE POLLO**



**TABLA II**

**INMUNOLOCALIZACION**



**TABLA III**

**V**

**RESULTADOS**

La morfología del sitio de apareamiento cigoténico se muestra a pequeño aumento en la figura 1. Los elementos laterales pueden estar bastante separados en la región no apareada como lo indican las flechas y converger en un ángulo pronunciado hasta la distancia típica del complejo sinaptonémico (observándose una forma de "Y"). La región situada entre los elementos convergentes aparece ocupada por delgadas fibrillas y pequeños acúmulos de fibrillas más gruesas que se han señalado con las cabezas de flechas.

En cortes seriados contrastados con la técnica preferencial para ribonucleoproteínas (EDTA), se pone de manifiesto la presencia de delgadas fibrillas ribonucleoproteicas (RNP) entre los elementos que se aparean que se tiñen mucho más densamente con esta técnica (Figs. 2 y 3 flechas). Tanto en cortes transversales como longitudinales de los complejos se puede ver que las fibras contrastadas con esta técnica no forman aún un elemento medial y los puentes látero-mediales, sino que se disponen un tanto irregularmente entre los elementos laterales. En la figura 3B se observan largos puentes contrastados positivamente tendidos entre elementos bastante distantes (cabezas de flecha).

El utilizar la inmunolocalización indirecta nos permitió la localización precisa del ADN en el complejo sinaptonémico en la sinapsis y al inicio de ésta, los granos de oro coloidal que nos indican, en este caso, el ADN pueden verse en algunos sitios de los elementos laterales, pero no sobre la placa adhesiva ni sobre la parte central (fig 4).

La inmunolocalización del ADN en un corte transversal de un complejo sinaptonémico en formación muestra que los elementos laterales aún no apareados están rodeados de cromatina ligeramente compactada salvo en el espacio que constituirá la ranura sináptica, en donde predominan las fibrillas delgadas (Fig. 5). Un corte longitudinal muestra muy claramente que en el espacio de apareamiento existen algunos pequeños acúmulos de cromatina poco compacta salvo en la zona más cercana a la región donde los elementos laterales se disponen paralelamente. En esta región de apareamiento cercano o final sólo existen fibrillas muy finas, muchas de las cuales se marcan con

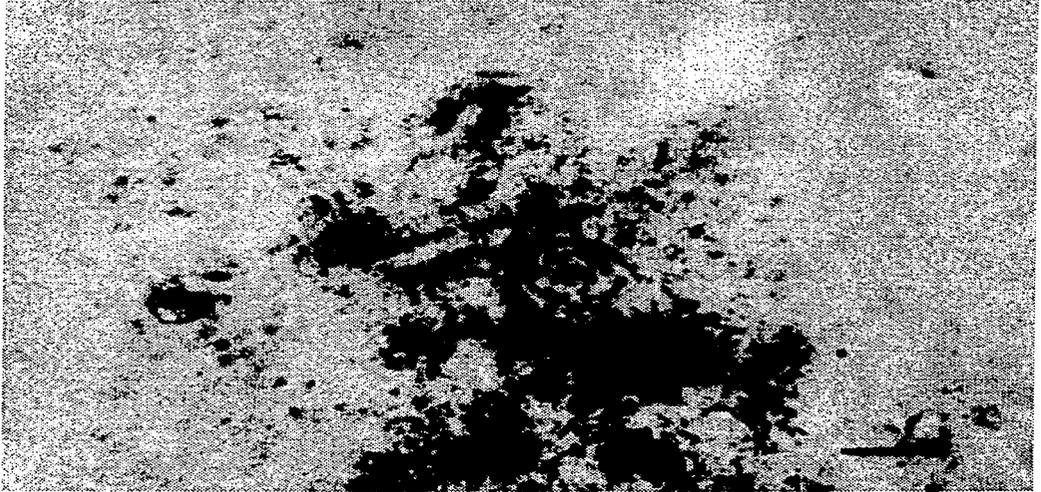
## **MICROSCOPIA ELECTRONICA**

gránulos de oro coloidal (ADN) que son señaladas con las flechas en la figura 6.

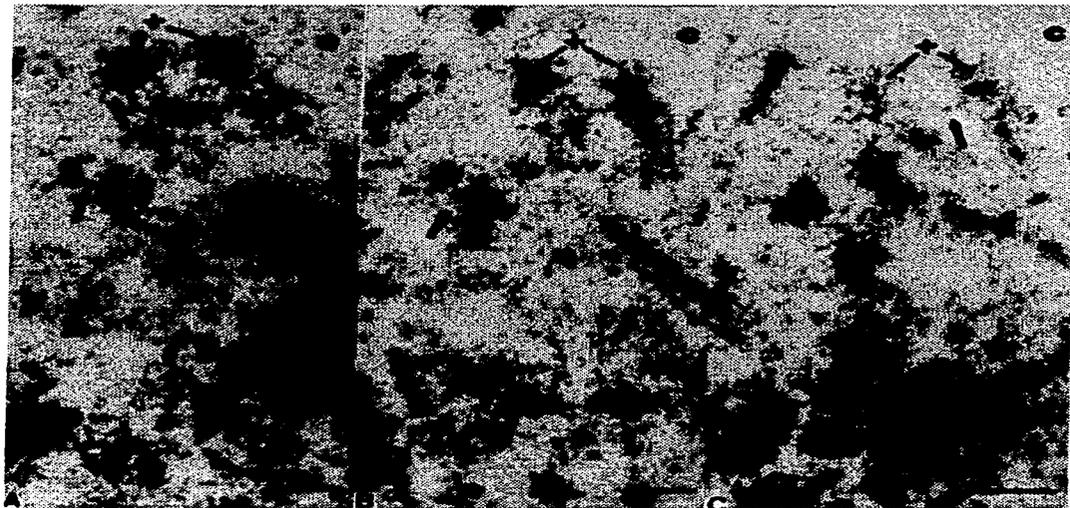
La combinación de tinción preferencial para RNP e inmunolocalización de ADN nos muestra que la cromatina se acumula conjuntamente con las ribonucleoproteínas en los elementos laterales no apareados y la presencia de numerosas fibras RNP que no contienen ADN distribuidas laxamente alrededor de los elementos laterales (Fig. 7). También se puede observar un puente de fibrillas marcadas con el anticuerpo anti-ADN y contrastadas con la técnica preferencial para ribonucleoproteínas (EDTA), entre los elementos laterales bastante separados en la zona no apareada (Fig. 7, flechas).

La acumulación de la cromatina alrededor de las ribonucleoproteínas de los elementos laterales se encuentra también al comienzo del apareamiento como se puede ver a pesar de la tinción inespecífica de la figura 8. En esta figura la flecha señala numerosos filamentos delgados que se extienden desordenadamente de un elemento lateral a otro en la zona de apareamiento. Dichos filamentos no están marcados por el anticuerpo.

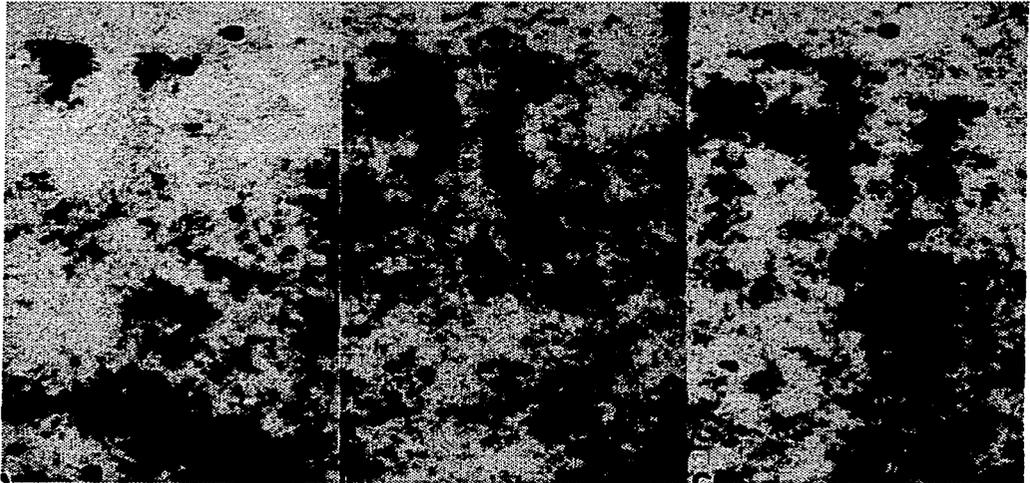
La utilización de la tinción de ácido fosfotúngstico (PTA) para ADN y el anticuerpo monoclonal anti-ADN muestra que los granos de oro se sitúan sobre elementos teñidos por el PTA, pero existen muchas estructuras PTA+ que no están marcadas con el anticuerpo (Fig. 9), lo que demuestra que aún las inmunolocalizaciones nunca marcan todos los elementos de la misma composición. La tinción corrobora la presencia de fibrillas conteniendo ADN entre los brazos laterales durante el proceso cigotónico de apareamiento (Fig 9, flecha). Así como la presencia de un nódulo de recombinación PTA+ localizado entre los elementos laterales (Fig. 9, cabeza de flecha).



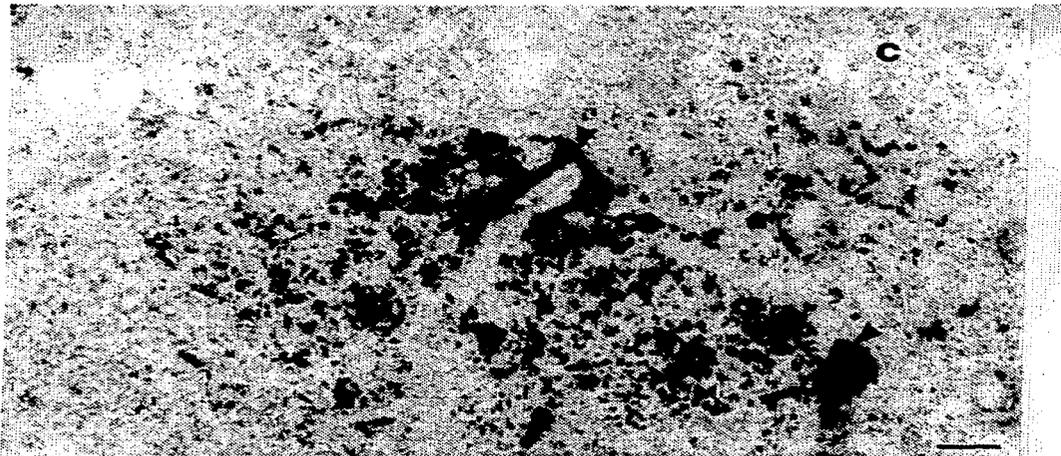
**Fig. 1.** Ovocito I de pollo de 20 días de desarrollo, en estado cigoteno. Se observan los elementos laterales en la región no apareada (flechas) y en la zona de convergencia (\*). Contraste general con acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra = 0.27  $\mu\text{m}$



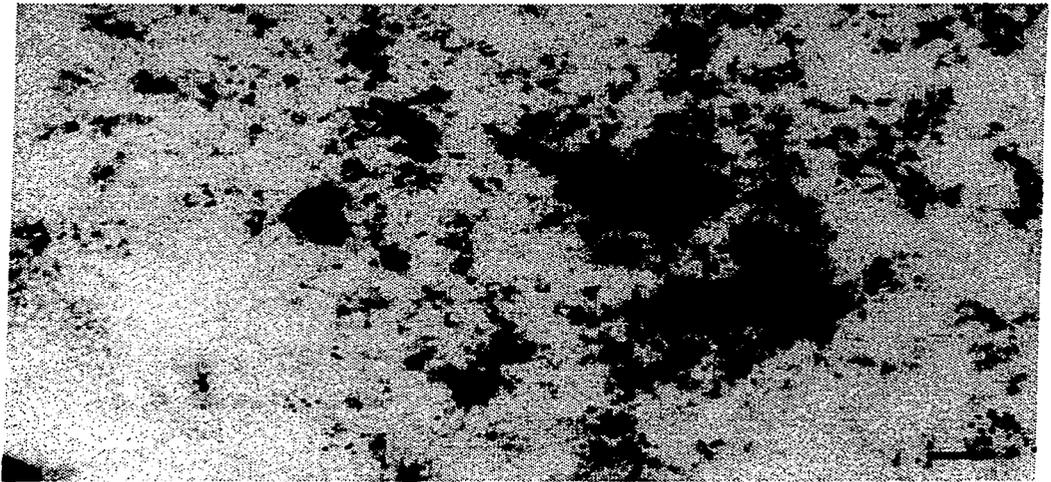
**Fig. 2.** Cortes seriados de ovocito I de pollo. Se muestra dos complejos sinaptonémico en diferentes cortes (\*) (+) así como el citoplasma (c) y la cromatina (cr), Contraste preferencial para ribonucleoproteínas (EDTA). Barra = 0.24 $\mu$ m.



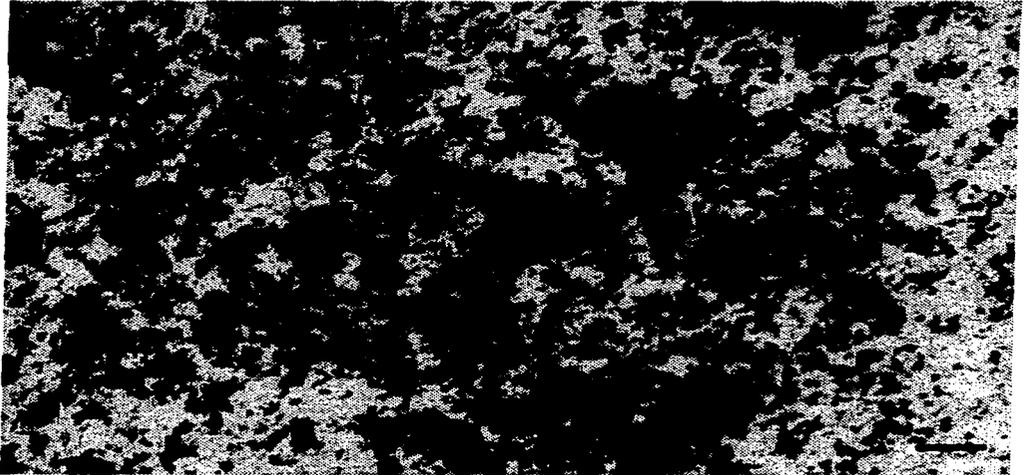
**Fig. 3.** Ovocito I mostrando un seguimiento de un complejo sinaptonémico (\*) en cortes seriados en donde se observan el citoplasma © y fibras EDTA+ (cabezas de flecha). Contraste preferencial para RNP (EDTA). Barra=0.24 $\mu$ m.



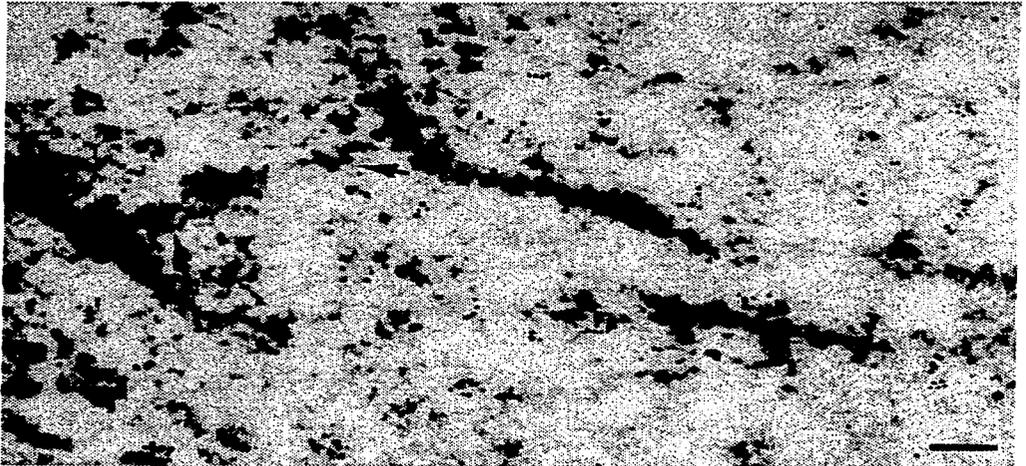
**Fig. 4.** Ovocito de pollo de 20 días de incubación, con anti-ADN (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y contrastada con acetato de uranilo-citrato de plomo, en donde se observa el citoplasma (C), y el núcleo con un complejo sinaptonémico (CS) y un elemento lateral (\*), se encuentran gránulos de oro coloidal en algunos sitios de los elementos laterales (flechas) y ausentes en la placa adhesiva (cabeza de flecha). Barra=20nm.



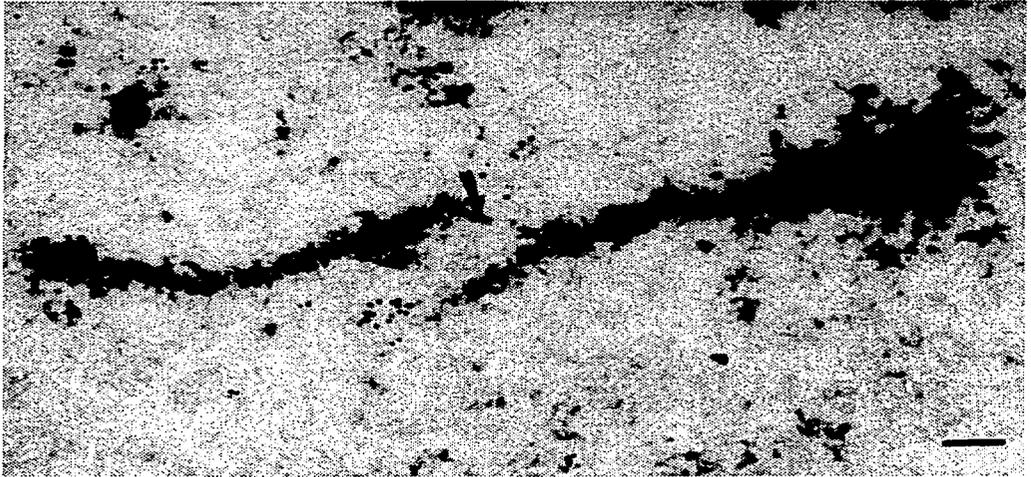
**Fig. 5.** Micrografía electrónica de un complejo sinaptonémico cortado transversalmente, se observa la cromatina lateralizada (Cr) con abundantes granos de oro coloidal. Contraste general con acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra = 0.1 $\mu$ m.



**Fig. 6.** Complejo sinaptonémico en estado cigoteno en donde se observan partículas de oro coloidal sobre los brazos laterales (L), y sobre la parte medial (\*). Anti-ADN en una concentración de 1.66  $\mu\text{g/ml}$ , con un contraste general. Barra=0.11  $\mu\text{m}$ .

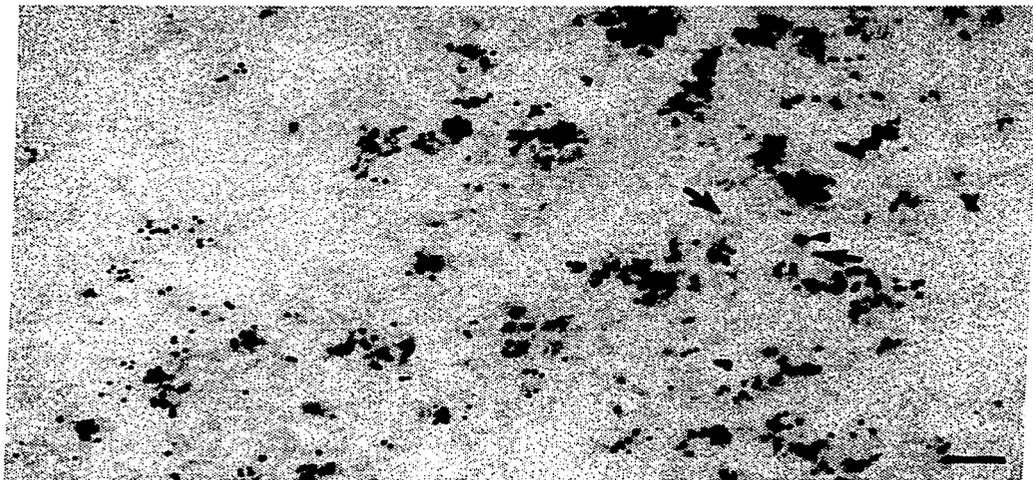


**Fig. 7.** Inmunolocalización y contraste preferencial para ribonucleoproteínas de un núcleo de ovario. Se muestra un puente de fibras marcadas con oro (flechas) entre los elementos laterales no apareados. Barra = 6 nm.



**Fig. 8.** Micrografía electrónica de un complejo sinaptonémico al inicio de la sinapsis con numerosas fibras que van de un elemento lateral a otro (flecha) y con un elemento lateral (E) rodeado por cromatina (Cr). Inmunolocalización y contraste con acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra = 6 nm.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**



**Fig. 9.** Micrografía electrónica de un ovocito I contrastado con ácido fosfotúngstico (PTA). Se observan los granos de oro coloidal colocalizado con el contraste, además fibras PTA positivas uniendo ambos brazos laterales (↑). La parte central esta ocupada con un nódulo de recombinación (cabeza de flecha). Barra = 6 nm.

**VI**

**DISCUSION**

Los resultados inmunocitquímicos demuestran la presencia de cromatina en los elementos laterales no apareados, que se acumula conjuntamente con fibras de ribonucleoproteínas y se distribuye como estas últimas alrededor de los elementos laterales.

Un resultado importante es la presencia de un puente de fibrillas marcadas con oro (ADN), entre los elementos laterales separados. Este puente se encuentra uniendo a los cromosomas homólogos antes del apareamiento cuando ya se encuentra formado el complejo sinaptonémico. Kurata e Ito (1978) con estudios autoradiográficos con timidina tritiada para microscopía electrónica han demostrado la presencia de ADN cigoténico (ADNc). Este ADN se requiere antes de que se complete el complejo sinaptonémico durante la formación del eje axial (antes de la lateralización de la cromatina). La presencia del ADN al iniciar la sinapsis podría indicar que es una especie de macromolécula formadora de sitios de unión.

Alberts y col (1989) mencionan que se desconoce por que las zonas homólogas de los cromosomas se alinean de manera precisa durante el cigoteno, siendo poco probable que sea necesario un apareamiento homólogo de bases a lo largo de los cromosomas interactuantes, ya que la cromatina de un homólogo está situada lejos de la de su compañero en el complejo sinaptonémico. Una posibilidad es que el apareamiento inicial entre cromosomas esté mediado por ADN complementario mediante interacciones de pares de bases confinadas en regiones específicas de cada cromosoma.

Muchos han sido los escenarios propuestos para el primer encuentro de los cromosomas homólogos. Para Loidl (1990) existe un reconocimiento de los homólogos independientemente de la formación del complejo sinaptonémico. A partir de una etapa de reconocimiento primario de los homólogos se forma el CS entre los ejes preseleccionados y finalmente con la estabilización de éste se lleva a cabo el crossing over.

En nuestros hallazgos podemos ver que los elementos laterales del complejo sinaptonémico se encuentran adheridos a su homólogo no apareado (separados por una gran distancia). Indicándonos que la formación del CS es

determinante para el inicio de la sinapsis y que el ADN es el puente de unión para el inicio de la sinapsis.

Los estudios hechos con el ascomicete *Sordaria* por Zickler y col (1988) proponen que el reconocimiento de los homólogos ocurre como una recondición para la sinapsis, teniendo una semejanza precisa en los sitios de recombinación dentro del CS. Ya que el apareamiento recombinacional requiere de un mayor grado de homología, ayuda a prevenir recombinación recíproca (crossing over entre regiones homólogas y no homólogas del cromosoma).

En contraste con los autores anteriores Carpenter (1987) propone que en la formación del complejo sinaptonémico la clave es la homología cromosómica. Este se forma entre los cromosomas seguido por una corroboración de las secuencias homólogas. Si la homología se encuentra, la formación de la estructura tripartita se continúa, si no, el complejo sinaptonémico se disuelve.

Si el ADN se ha encontrado sobre los ejes axiales (antes de la formación de los elementos laterales) y las fibrillas de ADN se encuentran uniendo a los elementos laterales que están muy separados nos indicaría que es necesaria la presencia del complejo sinaptonémico para el reconocimiento de los homólogos así como la presencia del ADN.

También pudimos observar la cromatina alrededor de los ejes axiales al inicio del apareamiento, y la acumulación de ésta conjuntamente con RNPs en los elementos laterales no apareados, así como fibras de RNPs distribuidas alrededor de los elementos laterales.

Las fibras de ribonucleoproteínas (EDTA +) presentes entre los elementos laterales son esenciales para la formación del complejo sinaptonémico antes de la sinapsis, además de la estabilidad de éste. Algunos autores como Villardel y col (1989) consideran al complejo sinaptonémico como un armazón, que mantiene el apareamiento de los cromosomas homólogos para que se lleve a cabo la recombinación y los principales componentes de éste son proteínas de alto peso molecular y ribonucleoproteínas.

Con el contraste preferencial para ADN con ácido fosfotúngstico (PTA) se observaron fibras PTA+ que emergían de los elementos laterales conectandose con un nódulo de recombinación PTA+ y probablemente lo penetren. Esto apoya el concepto de que los nódulos de recombinación están involucrados con la formación de los quiasmas.

Los nódulos de recombinación juegan un papel activo en los procesos de recombinación y formación de quiasmas, se asocian a intervalos en la región central entre los cromosomas homólogos.

La presencia de fibras de ADN que no se encuentran relacionadas con los nódulos de recombinación uniendo ambos elementos laterales pueden estar relacionadas con los procesos de apareamiento y recombinación de los cromosomas homólogos, ya que han sido observadas en el estadio paquitenio (Vázquez-Nin y col. 1993).

También se ha observado que esas conexiones físicas (quiasmas) son requeridas para la orientación de los cromosomas homólogos con respecto al huso meiótico en metafase I.

La presencia del ADN en los elementos laterales en el complejo sinaptonémico al inicio de la sinapsis, en cigoteno, es semejante a lo encontrado por Vázquez-Nin y col (1993) en los brazos laterales en el estadio paquitenio, en donde se realizó un análisis morfométrico concluyéndose que el ADN es mayor en los elementos laterales que el elemento central.

Y no observamos mayor concentración de ADN en la parte interior entre los elementos laterales como lo observa Latos-Bielecka y col (1990).

VI

BIBLIOGRAFIA

1. Alberts B, Bray D, Lewis J. 1989. Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York & London. Capítulos 5 y 15.
2. Ashley T. 1988. G-Bands position effects on meiotic synapsis and crossing over. *Genetics* 118: 307-317.
3. Bernelot-Moens C, Moens BP. 1986. Recombination nodules and chiasma localization in two Orthoptera. *Chromosoma* 93: 220-226.
4. Bernhard W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J Ultrastruct Res* 27: 250-265.
5. Carpenter AT. 1975. Electron microscopy of *Drosophila melanogaster* females. II. The recombination nodule a recombination associated structure at pachytene? *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3186-3189.
6. Carpenter AT. 1987. Gene conversion, recombination nodules e initiation of meiotic synapsis. *Bioessays* 6: 232-236.
7. Coll M D, Clavaguera A, Querol E, Egozcue J. 1986. Studies on the cytochemical nature of the synaptonemal complex in *Mus musculus*. *Cell Mol Biol* 32(4): 441-447.
8. Comings DE, Okada TA 1970. Mechanisms of chromosome pairing during meiosis. *Nature* 227: 451-456.
9. De Robertis E y De Robertis E. 1989. Cell and molecular biology. Lea & Febegr. Philadelphia. Edición nueve. Capítulo 16.
10. Gillies CB. 1975. Synaptonemal complex and chromosome structure. *Annu Rev Genet* 9: 91-109.

- 11. Heyting C, Dettmers RJ, Dietrich AJ, Redeker J W. 1988. Two major components of synaptonemal complexes are specific for meiotic prophase nuclei. Chromosoma 96: 325-332.**
- 12. Kurata N, Ito M. 1978. Electron-Microscope autoradiography of thymidine H3. Incorporation during the zigotene stage in microsporocytes of Lily. Cell Struct 3: 349-356.**
- 13. Latos-Bieleska 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.**
- 14. Loidl J. 1990. The initiation of meiotic chromosome pairin: the cytological view. Genome 33: 759-778.**
- 15. Loidl J. 1991. Coming to grips with a complex matter. Chromosoma 100: 289-292.**
- 16. Moens PB, Heyting C, Dietrich, AJ, Van Raamsdonk W. 1987. Synaptonemal complex antigen location and conservation. J Cell Biol 105: 93-103.**
- 17. Moses MJ. 1956. Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. J Biophys Biochem Cytol 2: 215-218.**
- 18. Moses MJ. 1968. Synaptonemal complex. Annu Rev Genet 2: 363-412.**
- 19. Moses MJ. 1969. Structure and function of the synaptonemal complex. Genetics 67: 41-51.**
- 20. Sakaguchi K, Takagami M H, Ito M. 1983. Inhibition of RNA synthesis in meiotic cells and its effect on meiotic development. Cel Struct Func 8: 127-135.**
- 21. Schulz-Schaeffer J. 1980. Cytogenetics: plants, Animals, Human. Springer-Verlag, New York.**

- 22. Smith A, Benavente R. 1992. Identification of a structural protein component of rat synaptonemal complexes. Exp Cell Res 198: 291-297.**
- 23. Sotelo JR. 1969. Ultrastructure of chromosomes at meiosis. In: Lima de Faria A (de) Handbook of molecular cytology. North-Holland, Amsterdam, pp 412-434.**
- 24. Stern H, Hotta Y. 1978. Regulatory mechanisms in meiotic crossing-over. Ann Rev Plant Physiol 29: 415-436.**
- 25. Ster H, Hotta Y. 1984. The organization of DNA segments undergoing repair synthesis during pachytene. Chromosoma 89: 127-137.**
- 26. Sternberger LA. 1985. Immunocytochemistry. Churchill Livingstone, New York. Capitulo 1.**
- 27. Swanson CP, Merz T, Young WJ. 1981. Cytogenetics: the chromosoma in division inheritance and evolution. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New York. 2a. Edición. Capitulo 4.**
- 28. Vázquez-Nin GH, Chávez B, Tomás-Martín C. 1973. Apreferencial staining method for chromatin in electron microscopy. J Microscopie 16: 243-246.**
- 29. Vázquez-Nin GH, Echeverría OM. 1976. Ultrastructural study on the meiotic prophase nucleus of rat oocytes. Acta Anat 96: 218-231.**
- 30. Vázquez-Nin GH, Flores E, Echeverría OM, Merkert H, Wettstein R, Benavente R. 1993. Immunocytochemical localization of DNA in synaptonemal complexes of rat and mouse spermatocytes, and of chick oocytes. Chromosoma 102: 457-463.**
- 31. Villardel J, Coll D, Querol E, Egozcue J. 1989. Histone electrophoretic pattern in the characterization of synaptonemal complexes. Cel Molec Biol 35: 207-214.**

- 32.** von Wettstein D. 1977. The assembly of the synaptonemal complex. Phil. Trans R Soc Lond B 277: 235-243.
- 33.** von Wettstein D, Rasmussen W, Holm PB. 1984. The synaptonemal complex in genetic segregation. Ann Rev Genet 18: 331-413.
- 34.** Westergaard M, Von Wettstein D. 1970. Studies on the mechanisms of crossing over. IV. The molecular organization in *Neotiella* (Cooke) Saccardo (Ascomycetes). C R Trav Lab Carlsberg 37: 239-268.
- 35.** Westergaard M, Von Wettstein D. 1972. The synaptonemal complex. Ann Rev Genet 6: 71-76.
- 36.** Zickler D, Huynh AD, Moreau PJ. 1988. Genetic control of synaptonemal complex in the ascomycete *Sordaria macrospora*. Brandham PE. Kew Chromos conf. III HMSO, London. pp 331-335.