

70



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFEECTO DE LA EDAD EN EL APAREAMIENTO X-Y DURANTE LA MEIOSIS MASCULINA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
ELVIRA GALVEZ GALICIA



DIRECTORA DE TESIS: O.F.B. ALICIA CERVANTES PEREZ

2002



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



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.



INSTITUTO NACIONAL  
 DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
 DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
 DE LA UNAM

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**  
 Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
 Facultad de Ciencias  
 Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: Efecto de la edad en el  
 apareamiento X-Y durante la meiosis masculina.

realizado por Elvira Gálvez Galicia

con número de cuenta 9052246-2 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Q.F.B. Alicia Cervantes Peredo

Propietario Dra. Sara Frias Vázquez

Propietario M. en C. Bertha Molina Alvarez

Suplente M. en C. Christian Humberto Guerra Araiza

Suplente Biól. Rebeca Gutierrez Ordoñez

*[Handwritten signatures and initials]*  
 Rebeca 6770.

Consejo Departamental de Biología

*[Handwritten signature]*

Dr. Eberto Novelo Maldonado

FACULTAD DE CIENCIAS  
 U N A M.



DEPARTAMENTO  
 DE BIOLOGIA

## **DEDICATORIA**

**A TI** que siempre me cuidas y vigilas que todo esté bien.

**A MIS PADRES.** Por su apoyo incondicional, por enseñarme a seguir el camino correcto a través de su ejemplo y por quererme y procurarme tanto. **LOS AMO**

**PAPÁ.** Gracias por tu apoyo incondicional. Por lo que hiciste en el pasado, ya que si no lo hubieras hecho probablemente no estaría escribiendo estas líneas. Lo que hiciste muy bien y te lo agradezco. Gracias por quererme y cuidarme tanto como si fuera tu **conse**.

**MAMÁ.** Gracias por la forma tan sutil en que corriges mis errores, por todos los momentos que pasamos juntas y por ser mi mejor amiga.

**A MIS HERMANOS.** Rafael, Memo, Caro, Itzet, Aldo, Mariana y Daniel por hacer de mi vida una aventura: Rafa con sus buenos detalles, Memo con sus hazañas y preocupaciones, Caro con sus abrazos y cariños, Itzet con un poco de su tiempo y charlas amenas, Aldo con sus juegos domingueros, Mariana la niña más linda y Daniel con su ternura y mala suerte.

**A MIS ABUELOS.** Por su amor a la vida y por enseñarme que "Todo se puede con constancia y trabajo". En especial a mi **tesoro**, que es como mi segundo padre. Te amo abuelo.

**A MI PAREJA ETERNA.** Enrique por darle a mi vida un toque de alegría y de locura. Te amo.

## **AGRADECIMIENTOS**

**ALICIA.** Gracias por tu apoyo, paciencia y conocimientos. Por todos tus sábados y tus asesorías técnicas. Por los gratos momentos que pasamos en la realización de este trabajo y por los momentos en que siento que no gritas. Gracias por Todo ¡está lista al fin!

**ROSY.** Gracias por ser mi amiga y por tener siempre tiempo para mí, a pesar de que tu vida corre muy deprisa. Gracias por tus pequeños detalles como una llamada en un momento de crisis o tu vocecilla diciendo "si tienes problemas voy para allá".

**MADRID.** Gracias por ser más que una compañera de trabajo. Por tus palabras de aliento, tus puntos de vista y por ser parte de mí (aunque no te lo merezcas)

**MARIANA.** Gracias por brindarme tu amistad, apoyo incondicional y tu ayuda en los momentos que más me hacía falta.

**A MIS SINODALES Y ASESORES.** Gracias por las críticas constructivas del presente trabajo, por su tiempo y dedicación.

**A MIS AMIGUITOS DE VIAJE.** Gracias por mostrarme una perspectiva diferente de la vida; por enseñarme a compartir, querer, tolerar y disfrutar todas aquellas bellezas que tiene la naturaleza.

**A TI** que compartiste un día de mi vida en un viaje o en la escuela, que me hiciste reír y disfrutar agradables y desagradables momentos.

**A LA FACULTAD DE CIENCIAS Y PROFESORES** por ser parte de mi formación y una de las etapas más bellas de mi vida.

## INDICE

	Página
RESUMEN .....	1
I ANTECEDENTES	
I.1 Meiosis .....	3
I.1.1 Leptotene: Apareamiento homólogo y Formación de bouquet .....	6
I.1.2 Zigoteno: Sinapsis y Complejo sinaptonémico .....	15
I.1.3 Transición zigotene-paquítene: Nódulos de recombinación .....	22
I.1.4 Paquítene: Recombinación homóloga .....	27
I.1.5 Diplotene: Quiasmas .....	37
I.1.6 Interferencia .....	40
I.1.7 Diacinesis y Metafase I .....	44
I.1.8 Anafase I y Telofase I .....	47
I.1.9 Segunda división meiótica .....	48
I.1.10 Regulación de la meiosis .....	49
I.2 Gametogénesis humana .....	52
I.3 Comportamiento de los cromosomas X-Y durante la meiosis .....	55
I.4 Aneuploidía en espermatogénesis y Efecto de la edad paterna .....	61
II OBJETIVOS .....	68
III MATERIALES Y MÉTODOS .....	69
IV RESULTADOS .....	73
V DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	76
VI REFERENCIAS .....	83
VII APÉNDICE. PREPARACIÓN DE REACTIVOS .....	90

## RESUMEN

La meiosis es el proceso de división que se realiza en las células germinales, partiendo de una célula diploide para obtener células haploides. La formación de estas células permite después de la fecundación mantener la diploidia en la siguiente generación y crear variabilidad entre los individuos.

La división meiótica a través de su peculiar profase I, promueve el intercambio de material genético entre los cromosomas homólogos que se manifiesta con la formación de quiasmas. Estos junto con la cohesión establecida a nivel del centrómero entre las cromátidas hermanas mantienen a los bivalentes unidos y aseguran su alineamiento correcto en la placa ecuatorial, permitiendo una distribución reduccional equitativa del material genético entre las 2 células hijas. El punto de control de paquitene, aunado a los puntos presentes en las transiciones metafase-anafase, evita una segregación incorrecta permitiendo la culminación exitosa de la meiosis.

Los errores en la segregación cromosómica durante la meiosis, genéricamente referidos como no-disyunción, originan gametos aneuploides. Se ha establecido una correlación entre la presencia de cromosomas aquiasmáticos y la frecuencia de no-disyunción. El efecto de edad materna en la incidencia de no-disyunción ha sido documentado; sin embargo, un efecto de la edad paterna en la producción de gametos aneuploides es aún controversial y sólo ha sido demostrado para el par XY. El estudio de los cromosomas meióticos en el estadio de diacinesis permite observar el apareamiento de los cromosomas sexuales y la formación del quiasma obligado en la región pseudoautosómica que conlleva a una segregación correcta.

En el presente trabajo se estudio el comportamiento meiótico de los cromosomas sexuales en tres individuos fértiles de 70 a 86 años a quienes se les realizó una orquidectomía profiláctica. Las células meióticas del testículo se obtuvieron por el método de secado al aire, se tñieron con Giemsa y se localizaron los diferentes estadios de la meiosis. En un caso, se realizó el análisis en preparaciones hibridadas con una sonda para pintado total del cromosoma Y. Además en las preparaciones teñidas con

Giemsa, se observaron 100 diacinesis-metafases I de cada individuo para evaluar la presencia de cromosomas univalentes con especial atención en los cromosomas sexuales.

El análisis de la meiosis masculina reveló que la cromatina del cromosoma Y se encontraba condensada durante los estadios meióticos, a excepción de zigotene, en el cual, se lleva a cabo el apareamiento y la recombinación de los cromosomas XY. A diferencia de las células germinales, la cromatina Y en las células de Sertoli mostraron un patrón inverso de condensación y decondensación; esto es, cuando en las células germinales en zigotene la cromatina del cromosoma Y estaba decondensada, en las células de Sertoli se encontraba condensada y viceversa, lo que sugirió un control de las células de Sertoli sobre los meiocitos.

Al observar el apareamiento XpYp en diacinesis se encontró una asociación entre Xp-Yp en 86-96% de las células, la asociación en ambas regiones Xp-Yp/Xq-Yq sólo se encontró en 0-3% y la separación entre XY, ausencia de quiasma, estuvo presente en 4-14% de las células. Para los autosomas la presencia de univalentes; generalmente del grupo G, se observó en 3-11% de las diacinesis. Estos datos sugieren que la separación de los bivalentes formados por los cromosomas sexuales ocurre con mayor frecuencia que entre los pares de autosomas, seguida por la de los cromosomas del grupo G, que por su reducido tamaño presentan sólo un quiasma al igual que los cromosomas XY. Esto coincide con lo reportado en la literatura.

## I ANTECEDENTES

### I.1 MEIOSIS

El elemento central de la reproducción sexual es la meiosis, el programa de división celular especializado a partir del cual los organismos diploides pueden reducir su número cromosómico a la mitad generando células haploides. El objetivo principal de la meiosis es mantener la diploidía aún después de la fusión de dos gametos para proporcionar variabilidad a la siguiente generación asegurando así la continuidad de la especie (Alberts y cols, 1996).

La meiosis es un tipo especial de división celular que da origen a los gametos o células sexuales a partir de las células germinales. Una célula germinal premeiótica tiene 2 copias de cada uno de los cromosomas ( $2n$ ), uno es de origen materno y el otro de origen paterno; estos cromosomas reciben el nombre de cromosomas homólogos (Alberts y cols, 1996). La segregación de los cromosomas homólogos paterno y materno proporcionan las bases físicas de la segregación mendeliana de los alelos en cada *locus* y aseguran la distribución independiente de los alelos localizados en *loci* en cromosomas diferentes. En organismos en los cuales la información genética está contenida en múltiples cromosomas, el reparto al azar de los homólogos genera por sí mismo una gran variabilidad genética (Miller y Therman, 2001).

El número cromosómico se reduce durante la meiosis debido a que el DNA se replica una sola vez seguido por dos segregaciones cromosómicas. La segunda división de la meiosis, división ecuacional, se parece a la mitosis en donde las cromátidas hermanas se separan. Sin embargo, la primera división, etapa reduccional, es única. La segregación cromosómica reduccional en la meiosis I, difiere significativamente de la mitosis y de la meiosis II en varios eventos. Primero: las cromátidas hermanas permanecen asociadas unas a otras. Segundo, las dos unidades de cada par cromosómico, los cromosomas homólogos, se comportan de manera coordinada de forma tal que cada cromosoma homólogo se mueve hacia uno de los polos de la célula a través del huso (Figura 1) (Roeder, 1997).

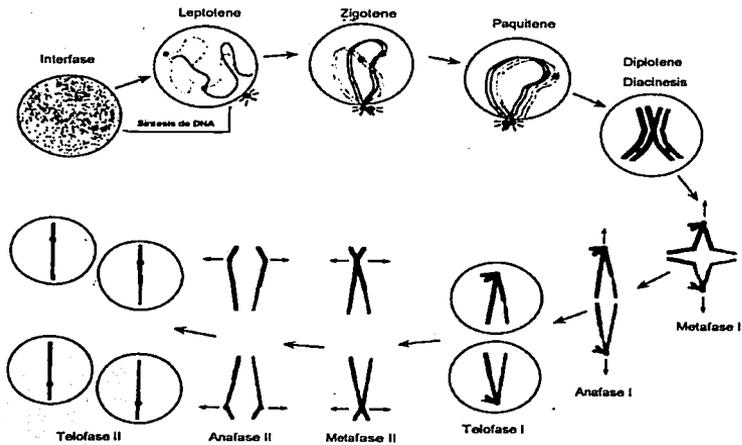


Figura 1. División celular meiótica que parte de una célula diploide para generar células haploides (Tomada de Miller y Therman, 2001).

La meiosis puede ocurrir en una gran variedad de condiciones fisiológicas, pero en casi todos los casos una correcta segregación en la primera división meiótica depende de los eventos de recombinación entre las moléculas de DNA de los cromosomas homólogos que resultan en entrecruzamientos. El entrecruzamiento a nivel de DNA requiere de la colaboración de la cohesión entre las cromátidas hermanas para formar las conexiones temporales, los quiasmas, entre los cromosomas homólogos que les permitan orientarse hacia los polos opuestos del huso en la meiosis I (Villeneuve y Hillers, 2001). Así, la recombinación meiótica constituye la esencia del sexo al asegurar el reparto cromosómico para mantener la diploidia a través de originar células haploides (Dresser, 2000).

La coordinación en el comportamiento cromosómico depende de un proceso complejo y de estructuras elaboradas que mantienen juntos a los homólogos desde la primera profase meiótica hasta la transición metafase I- anafase I. En la mayoría de los organismos el proceso incluye: el alineamiento de los cromosomas homólogos, el inicio de la recombinación genética a partir de la producción de rupturas de doble cadena (*double strand break*, DSB), el ensamblado del complejo sinaptonémico (CS), la resolución de los intermediarios de recombinación para producir entrecruzamientos y la formación de los quiasmas. Estos eventos ocurren durante una prolongada profase que es subdividida en una serie de estadios con base a los cambios observados en la morfología y el comportamiento cromosómicos (Tabla 1) (Roeder, 1997).

La recombinación genética ocurre con una frecuencia mucho mayor durante la meiosis que la encontrada en las células vegetativas o en el crecimiento somático. Esta elevación es esencial para asegurar que cada par de cromosomas homólogos presentarán al menos un entrecruzamiento en cada meiosis que conduzca a la formación de un quiasma (Alberts y cols, 1996).

En la mayoría de los organismos pluricelulares, las células germinales se dividen sucesivamente por mitosis, antes de comprometerse a entrar en la fase terminal de división meiótica. La fase S premeiótica es generalmente dos veces más larga que la fase S mitótica. Una vez que los meiocitos han completado la replicación de su material genético inician los eventos característicos de la primera profase meiótica

(Roeder, 1997). Por ser esta la etapa más relevante de la meiosis, al constituir el intervalo más complejo, prolongado (puede ocupar hasta el 90% o más de la meiosis) y genéticamente significativo, cada uno de sus elementos característicos serán analizados en detalle.

Tabla 1. Eventos de la primera profase meiótica (Roeder, 1997).

ESTADIO	MORFOLOGÍA CROMOSÓMICA Y MORFOGÉNESIS DEL CS	FORMACIÓN DEL <i>BOUQUET</i>	REPARACIÓN DSB	EVIDENCIAS DE LA RECOMBINACIÓN
Leptotene	Aparecen elementos axiales	Inicia	Aparecen DSB	Nódulos tempranos
Zigotene	Inicia la sinapsis	Agrupamiento de telómeros	Desaparecen DSB	Nódulos tempranos
Paquitene	Complejo sinaptonémico tripartita	Dispersión de telómeros	Intermedarios de Holliday dobles	Nódulos tardíos
Diploiene	Desensamblado del CS, cromosomas condensados		Recombinantes	Quiasmas
Diacinesis	Máxima condensación cromosómica			Terminalización de quiasmas

### I.1.1 LEPTOTENE: APAREAMIENTO HOMÓLOGO Y FORMACIÓN DE BOUQUET

El paso inicial en el primer estadio de la profase meiótica es la búsqueda de homología o apareamiento homólogo (AH), pero a pesar de que se ha realizado una investigación intensiva para conocer los mecanismos que llevan a éste, aún no ha surgido una descripción clara. Esto es probablemente atribuido, al hecho de que las células emplean diferentes estrategias para efectuar el apareamiento y a que existen variantes en cada una de ellas (Roeder, 1997).

Weiner y Kleckner (1994) han sugerido que en la interfase premeiótica, los cromosomas ya presentan un apareamiento establecido por uniones paranémicas inestables entre el DNA dúplex intacto. Este apareamiento premeiótico se pierde al iniciar la replicación, pero se plantea que puede servir para fortalecer la interacción global de los cromosomas homólogos trazando un dominio topológico favorable, facilitando el reestablecimiento del apareamiento al iniciar la meiosis. Sin embargo, este pre-apareamiento sólo se ha observado en las levaduras y no está presente en las células del maíz, ratón y humano (Scherthan y cols, 1996).

Los términos apareamiento y sinapsis generalmente se confunden, por lo que es necesario definirlos. El apareamiento se refiere al alineamiento o yuxtaposición de los cromosomas homólogos a cierta distancia, mientras que la sinapsis es la íntima asociación de los cromosomas homólogos en el contexto de una estructura proteica denominada complejo sinaptonémico (Roeder, 1997). En la mayoría de los organismos, los cromosomas homólogos se alinean a todo lo largo de su longitud previo a la iniciación de la sinapsis; en muchos otros, el apareamiento y la sinapsis ocurren segmento a segmento (Haber, 1998).

En diversos organismos se ha observado que el apareamiento no sólo precede a la sinapsis, sino que es independiente de ella. Las principales evidencias que apoyan esto son:

- Los dos tipos de asociación presentan diferencias en cuanto a tiempo y distancia: El apareamiento se realiza en leptotene y los cromosomas se encuentran alineados a una distancia de 4 000 nm. La

sinapsis en cambio, se presenta durante zigotene acompañada del CS que permite a los cromosomas un acercamiento a 100 nm (Moens, 1994; Cook, 1997).

- En ciertos mutantes meióticos, puede presentarse apareamiento y faltar la sinapsis. Por ejemplo; mutaciones en *zip1* en levaduras permiten el apareamiento entre los cromosomas, pero no se forma el CS (Nag y cols, 1995; Roeder, 1997; Lewin, 2000). En organismos triploides o trisómicos, los tres homólogos se alinean lado a lado, pero sólo 2 cromosomas se acoplan en sinapsis en cualquier región (Roeder, 1997; Miller y Therman, 2001).
- El CS puede formarse entre cromosomas no homólogos mientras que el apareamiento, por definición sólo implica cromosomas homólogos (Roeder, 1997).
- Los cromosomas en muchos organismos se alinean a pesar de que subsecuentemente el CS no se forme. Por ejemplo, en las mutantes de *hop1*, *mer1* y *zip1* de levadura los cromosomas se pueden alinear, pero el CS no puede ser ensamblado (Weiner y Kleckner, 1994; Nag y cols, 1995).

Quizás por la confusión entre el apareamiento y la sinapsis se asumía que el primero precedía a las DSB. Sin embargo, existen evidencias que indican que las interacciones entre los homólogos son independientes de la recombinación, ya que, las levaduras mutantes defectuosas en la formación o procesamiento de las DSB carecen de un extremo libre de DNA que inicie la búsqueda de homología, pero a pesar de ello presentan una cantidad significativa de apareamiento meiótico (Weiner y Kleckner, 1994). No se ha confirmado que la recombinación apoye el apareamiento en *Drosophila sp.*, pero si se ha demostrado que el apareamiento es importante para la recombinación, mutaciones que impiden el apareamiento también impiden la recombinación (Lewin, 2000).

Relacionado con esto se propuso a la conversión génica, como un posible mecanismo para la búsqueda de homología; la invasión de un extremo de DNA de cadena sencilla hacia un DNA dúplex intacto, establecería una similitud entre las cadenas de DNA y por ende reconocimiento homólogo, apareamiento y sinapsis. Ahora, sin embargo, parece improbable que esto ocurra al menos en las levaduras, ya que, análisis físicos de intermediarios de recombinación y sus productos indican que la conversión génica y la

recombinación se llevan a cabo al mismo tiempo y ambas se inician con DSB; por lo que la vía de la conversión génica no puede ser una vía específica de apareamiento (Storlazzi y cols, 1995).

El apareamiento meiótico temprano puede implicar, al igual que el apareamiento premeiótico, la formación de uniones paranémicas inestables entre el DNA dúplex intacto. Tales asociaciones reversibles proveerían un mecanismo de ensayo y error para "negociar" los enrollamientos intercromosómicos que se espera resulten cuando los cromosomas descondensados, serpenteando a través de los núcleos, inicien el apareamiento en sitios múltiples. Las interacciones inestables podrían ser suficientes para alinear a los cromosomas debido a que los homólogos serían mantenidos juntos en múltiples sitios a lo largo de su longitud. Las interacciones entre repeticiones ectópicas serían usualmente desplazadas por interacciones homólogas tal como las uniones paranémicas son rotas y reformadas (Kleckner, 1996; Roeder, 1997).

La búsqueda de homología se da a través de todo el genoma, el cual es capaz de "probar" cada una de sus secuencias, hasta encontrar la correcta. La habilidad para iniciar tal búsqueda no se restringe a un pequeño número de sitios por cromosoma, más bien, los sitios de búsqueda están ampliamente distribuidos entre las secuencias cromosómicas, aunque existe un pequeño número de sitios preferenciales, correspondientes a las manchas calientes de recombinación o *hot spots* (Hawley y Arbel, 1993; Roeder, 1997). Esta afirmación se apoya en diversos trabajos entre los que se encuentran:

- Los cromosomas meióticos que han pasado de zigotene a paquitene en individuos heterocigotos para inversiones y translocaciones balanceadas, presentan asas o figuras tetrarradiales que indican apareamiento homólogo punto a punto (Miller y Therman, 2001).
- El apareamiento ha sido visualizado en varias especies de plantas por análisis de microscopía electrónica y tinción argéntica en núcleos esparcidos. Antes de que se inicie la formación del CS, núcleos o aglomerados de cromosomas paralelos parecen estar conectados unos a otros en múltiples sitios a lo largo de cada par cromosómico (Tomado de Moens, 1994). También en levaduras se ha observado que los sitios capaces de apareamiento, son numerosos y están ampliamente

distribuidos a lo largo de la longitud de los cromosomas y muchos de estos segmentos pueden aparearse en la profase independientemente de la condensación y la formación del CS (Klein, 1994).

Aunque los sitios de apareamiento meiótico parecen ser numerosos y estar ampliamente distribuidos; existen organismos en los cuales sólo sitios particulares de los cromosomas pueden promover apareamiento homólogo. En ningún sistema es más obvio, que en los nemátodos, como *Caenorhabditis elegans*. Estudios de rearreglos cromosómicos en estos organismos han demostrado que cada cromosoma contiene un sitio único que es necesario para promover la recombinación y la sinapsis a lo largo de la longitud de los cromosomas. Estos sitios son referidos como una región de reconocimiento homólogo o RRH y se localizan en el extremo de cada cromosoma. En modelos en los cuales la región RRH se presenta sólo en uno de los dos homólogos, el apareamiento se da de una manera eficiente. La explicación más probable para la actividad de las RRH es que estas regiones promueven el AH, quizás actuando como un sitio de anclaje para un complejo proteico que está implicado en la búsqueda de homología y que es capaz de moverse a lo largo de los cromosomas. Sin embargo, no puede ser excluida la posibilidad de que las RRH sirvan para promover recombinación y/o sinapsis entre los homólogos una vez que éstos han apareado (Zetka y Rose, 1995). Al igual que en los nemátodos, en la *Drosophila sp.* el apareamiento se da en ciertas regiones denominadas "sitios de apareamiento" (Haber, 1998).

A pesar de lo dicho anteriormente, Sybenga (1999) cuestiona el hecho de que la interacción DNA-DNA sea suficiente para buscar homología. Menciona que a pesar de que existe movimiento cromosómico en etapas tempranas de la meiosis para iniciar la búsqueda de homología, es altamente improbable que aquellos segmentos cruciales de DNA entren en contacto con su homólogo; sobre todo en organismos eucariontes con complejos DNA-proteína y grandes núcleos y aún en organismos relativamente simples como las levaduras. Por lo que sugiere la participación de intermediarios adicionales al inicio del apareamiento.

En organismos como la *Drosophila sp.* se propone que el apareamiento es dependiente de elementos transcripcionales en los cromosomas autosómicos, en los cromosomas sexuales X-Y en los machos y en el cromosoma 4 en las hembras. Este modelo se basa en el arreglo de elementos de la transcripción a lo largo de cada fibra de cromatina. Cada fibra de cromatina en un grupo haploide presenta un arreglo único de unidades de transcripción a todo su largo. Por lo tanto, un cromosoma 1 materno y un cromosoma 2 materno tendrán un arreglo diferente, pero un cromosoma 2 materno y un cromosoma 2 paterno tendrán un arreglo similar, y cada uno estaría unido a un factor de transcripción específico para cada arreglo de cromatina. Sólo los homólogos aparearían por presentar un arreglo similar, lo que permitiría el acceso a proteínas que estén relacionadas con el apareamiento. Así, en las moscas macho, el apareamiento en los cromosomas sexuales y en los autosomas, parece implicar arreglos en tándem de secuencias transcripcionalmente activas (Cook, 1997; Roeder, 1997).

Otros elementos que pueden estar implicados en la búsqueda de homología son los centrómeros. Estos durante la anafase mitótica se mantienen agrupados en un polo (centrómero-centrómero), con los telómeros orientados hacia el polo opuesto del núcleo (telómero-telómero); denominándose "Orientación Rabl". Una orientación Rabl en la interfase premeiótica facilitaría las interacciones entre los cromosomas homólogos durante la búsqueda de homología por tener a los centrómeros en un área nuclear definida. Esto resultaría en un alineamiento homólogo presináptico a lo largo de su longitud. Una vez que el reconocimiento de homólogos se completara, las células entrarían en meiosis con un cambio en el agrupamiento centromérico (orientación Rabl) a agrupamiento telomérico o *bouquet* (Weiner y Kleckner, 1994; Scherthan y cols, 1996, Kohli y Hartsuiker, 2001).

El agrupamiento telomérico está relacionado con un arreglo especial de los cromosomas; en donde los telómeros se encuentran unidos directamente a la superficie interna de la envoltura nuclear, agrupados todos juntos en un sitio definido. Esto es denominado arreglo en *bouquet* y es una característica universal de todas las células meióticas, que se presenta en la transición leptotene-zigotene (Zickler y Kleckner, 1998). Un análisis estructural reveló que los telómeros en leptotene temprano no están unidos a la envoltura nuclear. Hacia la segunda mitad de leptotene los telómeros comienzan a anclarse con una débil

o quizás ninguna polarización. En leptotene tardío migran hacia la configuración en *bouquet*, en donde los telómeros se unen hacia los centrosomas, concluyendo su formación en zigotene. En paquitene desaparece el *bouquet* y los telómeros se dispersan alrededor de la envoltura nuclear (Bass y cols, 2000).

La formación del *bouquet* al igual que la orientación Rabi quizás esté implicada en los procesos de prealineamiento; al proveer una polarización y conformación favorable que ayude a organizar a los cromosomas antes de la iniciación de la sinapsis. Scherthan y cols (1996) basándose en que los cromosomas premeióticos se organizan en territorios definidos en la mayoría de los organismos (Rabi y *bouquet*), sugieren un modelo de apareamiento en el que los telómeros y los centrómeros estarían localizados en la superficie de estos territorios. El proceso de apareamiento meiótico inicia después de la replicación premeiótica del DNA por el movimiento de los centrómeros a la envoltura nuclear, lo cual asegura el contacto de cada uno de los territorios cromosómicos a ésta. Los telómeros, inicialmente en la superficie de los territorios, se mueven hacia la membrana nuclear interna y se unen a ella. Cuando los telómeros se han unido a la envoltura nuclear, los territorios cromosómicos se elongan y delgados cordones con los centrómeros de los cromosomas se alejan de la envoltura nuclear. Subsecuentemente, los movimientos teloméricos hacia el sitio de agrupamiento producen numerosos encuentros entre los cromosomas ahora elongados, lo cual contribuye a la búsqueda de un sitio de apareamiento expuesto. La convergencia de los extremos cromosómicos incrementaría la eficacia de la búsqueda de homología y conduciría al prealineamiento de los homólogos doblados.

El movimiento de los centrómeros y los telómeros quizá se lleve a cabo por las interacciones de los dominios cromosómicos con los componentes de la matriz nuclear. Además, dos observaciones sugieren que los movimientos teloméricos son mediados por los microtúbulos citoplásmicos: Primero, la base del *bouquet* se encuentra yuxtapuesta con el centro organizador de microtúbulos y segunda, los agentes que desestabilizan a los microtúbulos interfieren con el movimiento telomérico y el apareamiento homólogo (Scherthan y cols, 1996; Roeder, 1997).

Una evidencia adicional para el movimiento cromosómico mediado por los telómeros está dada por estudios en *Schizosaccharomyces pombe*, que presenta un núcleo elongado denominado cola de caballo, originado por un movimiento oscilatorio conspicuo en la primera profase meiótica. Durante este movimiento, los telómeros permanecen agrupados cercanos al cuerpo polar del huso. El arreglo de los microtúbulos emana del cuerpo polar del huso hacia ambos extremos de la célula; coordinando el acortamiento y el alargamiento de los 2 arreglos de microtúbulos que jalan y/o empujan el núcleo hacia atrás y hacia adelante (Hiraoka, 2000).

Los telómeros también tienen una función en el AH en *Saccharomyces cerevisiae*. Estudios recientes sugieren que la interacción entre cromosomas homólogos dispara un punto de control que previene la división meiótica nuclear hasta que todos los cromosomas estén apareados. Un cromosoma circular y su homólogo lineal son incapaces de activar este punto de control, demostrando que un reconocimiento homólogo eficiente requiere que ambos cromosomas tengan extremos libres. La proteína Tam1/Ndj1 en *S. cerevisiae* es una proteína específica de meiosis que quizás sea importante en los primeros pasos del apareamiento cromosómico, promoviendo la unión de los extremos cromosómicos a la membrana nuclear o favoreciendo su subsecuente agrupamiento (Chua y Roeder 1997; Roeder, 1997).

En las levaduras *S. cerevisiae* que presentan Ndj1p silvestre la topología premeiótica (orientación *Rab1*) no se ve afectada, sin embargo, en las levaduras con mutaciones en *ndj1* la redistribución a nivel del *bouquet* se altera debido a que el contacto entre los telómeros y la periferia nuclear se ha perdido. Trelles-Sticken y cols (2000) mencionan que cuando las cepas con Ndj1p silvestre han alcanzado la búsqueda de apareamiento máxima; las mutantes *ndj1* presentan un apareamiento reducido. Al prolongar el tiempo en las mutantes *ndj1* se encuentra que hay un retraso en el apareamiento cromosómico y que este retraso afecta más severamente las regiones teloméricas de los cromosomas más pequeños; por lo que éstos quizás sean más dependientes de la acción del agrupamiento de los telómeros para la búsqueda de homología. A pesar de que el apareamiento se reduce, éste se completa; por lo que se sugiere que existen otras vías para el apareamiento independientes de los telómeros.

Conrad y cols (1997) demostraron que al perderse totalmente la proteína Ndj1p se retrasa la formación de los elementos axiales del CS y existen niveles altos de segregación incorrecta. Sin embargo, la ausencia de Ndj1p no afecta la segregación de anillos cromosómicos y argumentan que esta proteína no se requiere para la separación de los cromosomas *per se*, sino más bien, que es esencial para separar compañeros segregacionales que tienen telómeros, dentro de esa maraña que es el *bouquet*. Por lo que, parecería que la formación del *bouquet* no se requiere para el reconocimiento homólogo y sinapsis *per se*, pero sigue siendo válida la hipótesis de que facilita las interacciones homólogas a través del alineamiento dado por los extremos cromosómicos. Lo anterior apoya el hecho de que se requiera de Ndj1p para una localización de los telómeros en la periferia nuclear en el estado de *bouquet*. Así al perderse o retrasarse la formación del *bouquet* se afecta el apareamiento cromosómico (Trelles-Sticken y cols, 2000).

En humanos la proteína TRF1 se asocia con los telómeros y es homóloga a las proteínas de levaduras necesarias para el agrupamiento de los telómeros y para la recombinación, lo cual sugiere que tenga una función similar (Tomado de Miller y Therman, 2001).

Dentro de las posibles funciones del apareamiento homólogo se encuentran las siguientes:

- Los sitios de intercambio genético deben ser los sitios donde el apareamiento ha sido eficaz, primero manteniendo a los homólogos juntos y más tarde a nivel del DNA; así en *S. cerevisiae*, el número total de sitios de apareamiento por célula meiótica se estimó en aproximadamente 190, número similar al total de eventos de recombinación; 260. Esta correspondencia y otras consideraciones han conducido a la hipótesis de que los sitios de apareamiento temprano sirven más tarde como sitios para el inicio de la recombinación (Weiner y Kleckner, 1994; Sybenga, 1999).
- El apareamiento confiere una reducción de la recombinación ectópica. El proceso de apareamiento en las levaduras reduce la habilidad de que las secuencias homólogas repetitivas dispersas se encuentren (recombinación ectópica); creando una barrera para la recombinación ectópica, pero no para la recombinación alélica. Goldman y Lichten (2000) proponen que la recombinación ectópica ocurre durante los estados tempranos de apareamiento de cromosomas homólogo. Cuando las

asociaciones interhomólogas son pérdidas o pasajeras; los retrasos o defectos en el apareamiento y/o la sinapsis crearían un período más largo para que las secuencias repetitivas dispersas se pudieran encontrar, resultando en un incremento en la frecuencia de recombinación ectópica. El apareamiento entre los cromosomas de las levaduras *Saccharomyces carlsbergensis* y *S. cerevisiae* (cromosomas homeólogos - parcialmente homólogos entre sí) presentan un retraso o defecto en el apareamiento. De igual forma las mutaciones en *ndj1p* originan un retraso en el inicio del apareamiento, incrementando así la interacción entre secuencias homólogas repetitivas dispersas en heterólogos. Esto es válido para *S. cerevisiae* que presenta un apareamiento ligado a la recombinación. Sin embargo, en *Drosophila sp.*, *C. elegans* y *S. pompe* que tienen un mecanismo de alineamiento homólogo independiente de la recombinación, se observa un porcentaje varias veces más bajo de recombinación ectópica; debido a que la recombinación se da cuando los homólogos ya están apareados. Independientemente de las estrategias para el apareamiento, la colocalización de los homólogos, el alineamiento y la sinapsis llevan a cabo una función similar en todos los organismos evitando la recombinación entre secuencias repetidas dispersas, previniendo rearrreglos deletéreos y sobre todo asegurando una transmisión fiel del genoma (Haber, 1998; Goldman y Lichten, 2000).

Una vez concluida la búsqueda de homología y con esto el alineamiento entre los cromosomas homólogos, la mayoría de los organismos forman núcleos meióticos que resultan en la formación del CS. De esta forma los cromosomas homólogos que inicialmente presentaron una débil alineación se estabilizan y el apareamiento se completa durante el siguiente estadio meiótico; zigotene, en el cual se lleva a cabo la sinapsis (Walker y Hawley 2000).

### 1.1.2 ZIGOTENE: SINAPSIS Y COMPLEJO SINAPTONÉMICO

La sinapsis se refiere a la íntima asociación entre los cromosomas homólogos a través del complejo sinaptonémico tripartita o maduro (Roeder, 1997).

El complejo sinaptonémico es uno de los componentes más conspicuos de las células meióticas y se encuentra altamente conservado a través de la evolución en los eucariontes. Esta estructura proteica escalonada se forma de un elemento central y dos barras laterales unidas por filamentos transversos, estructura tripartita del complejo sinaptonémico maduro. Cada CS está rodeado por un halo de asas de cromatina que se encuentran ancladas a los elementos laterales, mientras que poca cantidad de DNA pasa a través de la región central; así, los elementos laterales son ricos en DNA, mientras que la región central es pobre (Figura 2) (Roeder, 1997).

El ensamblado y desensamblado del complejo se correlacionan con los rearrreglos en la cromatina, que incluyen su condensación, la sinapsis, la recombinación y la disyunción de los cromosomas homólogos (Tabla 2). Originalmente se pensaba que el CS establecía las condiciones necesarias para que se diera la recombinación (por aproximar a los cromosomas homólogos); sin embargo, ahora sabemos que ésta se inicia antes de que se complete el ensamblado del CS, en algunos organismos como las levaduras y los mamíferos, por lo cual aparecen nuevas perspectivas que hacen pensar que las funciones del complejo sinaptonémico son otras (Heyting, 1996; Roeder, 1997; Schmekel, 2000, Mahadevaiah y cols, 2001).

Anteriormente se pensaba que la sinapsis era un evento esencial en la iniciación de la recombinación meiótica en cualquier organismo. Sin embargo, en *S. cerevisiae* y otros organismos, incluyendo a los mamíferos, el inicio de la recombinación y el apareamiento ocurren en leptotene temprano, a la par o antes de la sinapsis. Esto se apoya en las siguientes evidencias:

- El evento que inicia la recombinación meiótica es la formación de DSB y aparece antes de la formación del CS (Kleckner, 1996; Dresser 2000).



Figura 2. Estructura del complejo sinaptonémico de *Neotellia*, que mantiene a los cromosomas homólogos asociados durante la sinapsis (Tomado de Lewin, 2000).

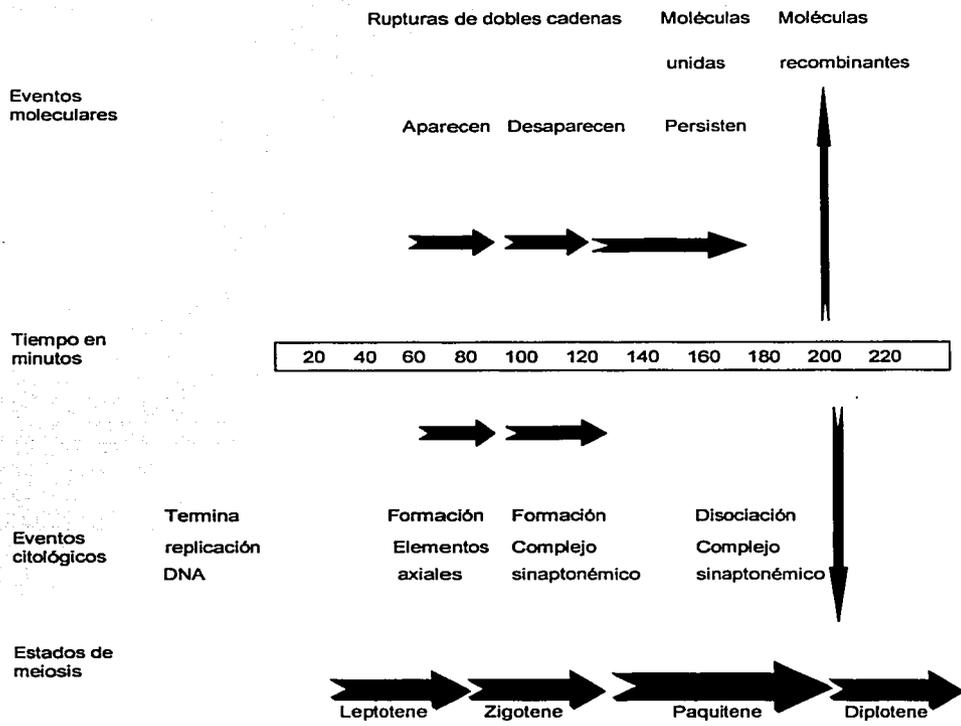


Tabla 2. Ensamblado y desensamblado del complejo sinaptonémico correlacionado con los arreglos de la cromatina que incluyen sinapsis y recombinación durante la primera profase meiótica en *S cerevisiae* (Lewin, 2000).

- Mutaciones en levadura que suprimen la recombinación también bloquean la formación del CS (Dresser, 2000).
- Mutaciones en levadura que bloquean la sinapsis permiten niveles de recombinación cercanos a lo normal (Dresser, 2000).

Por esto, la sinapsis no es esencial para la recombinación, pero los pasos subsecuentes de la recombinación son necesarios para la sinapsis (Walker y Hawley, 2000). La proteína Spo11 se requiere para la formación de las DSB y el ensamblado correcto del CS en las levaduras. Sin embargo, esta dependencia no es universal y en algunos organismos como las moscas y los gusanos, la sinapsis homóloga ocurre en la ausencia de la proteína funcional *SPO11* (Denburg y cols, 1998; McKim y cols, 1998; Villeneuve y Hillers, 2001).

En *Drosophila sp.* no existe una dependencia entre la sinapsis y la recombinación. McKim y Hayashi-Hagihara (1998) estudiaron la relación entre la sinapsis y el inicio de la recombinación en *Drosophila sp.*, a través de 2 mutaciones *mei-W68* (homólogo del gen *spo11* de levaduras) y *mei-P22* que reducen la frecuencia de recombinación meiótica en más de 1000 veces y a pesar de esto se observa la formación de un CS normal por microscopía electrónica. Esto indica que el CS puede formarse a pesar de la ausencia de eventos de recombinación detectables.

En los mamíferos al igual que en las levaduras, las DSB se llevan a cabo antes de que comience la sinapsis; por lo que, los mamíferos siguen el paradigma de las levaduras (Hunter y cols, 2001; Mahadevaiah y cols, 2001). Sin embargo, cabe mencionar que hasta ahora no hay respuesta del por qué las DSB pueden ocurrir antes, después o a la par de la sinapsis en los diferentes organismos (Hassold y cols, 2000).

La sinapsis ocurre preferencialmente entre patrones de secuencias homólogas. Sin embargo, el CS puede también formarse entre los elementos axiales de cromosomas o regiones cromosómicas no homólogas. Esto es poco común y se observa en inversiones y en translocaciones heterocigóticas formando estructuras en "H" o "X", en la sinapsis en los bivalentes que no presentan homología y

también en cromosomas que al no presentar un par homólogo con el cual aparearse se pliegan en sí mismos (Zickler y Kleckner, 1999).

En algunos organismos que presentan rearrreglos heterocigóticos, el patrón de sinapsis puede cambiar. En zigotene y paquitene temprano se presenta CS entre cromosomas no homólogos. Sin embargo, al final de paquitene sólo se observa CS entre las secuencias homólogas gracias a lo que se denomina "un ajuste sináptico". En las inversiones, los cromosomas tienen una longitud similar, sin embargo, en las alteraciones como deleciones, inserciones y duplicaciones la longitud entre los cromosomas varía. En ambos casos a la mitad de paquitene existe un periodo de transición en donde el CS se desestabiliza dentro o en la cercanía de los rearrreglos, seguido por la reformación y alineamiento del CS eliminando la no-homología del DNA. En una inversión en asa, el tamaño del asa disminuye progresivamente sin ningún cambio en su posición dentro del bivalente alineado con su patrón y ajustando su CS. El ajuste sináptico no es universal y se pueden presentar posibles casos de no ajuste en los humanos; lo cual crea rearrreglos cromosómicos (Zickler y Kleckner, 1999).

Inicialmente el CS se observa como pequeñas barras proteicas distribuidas a lo largo del par de cromosomas homólogos en aquellas regiones en donde se ha establecido homología. Estas barras se denominan elementos axiales y representan el alineamiento presináptico. Posteriormente, estos elementos axiales son el punto de anclaje para los filamentos transversos. Conforme progresa la sinapsis entre los cromosomas homólogos, esta configuración proteica se extiende a lo largo de ellos y una vez que los pares cromosómicos se encuentran alineados y unidos en el total de su extensión por el CS, este último adquiere una conformación en espiral, aumentando así el grado de condensación de la tétrada. Dentro del CS maduro los elementos axiales son referidos como elementos laterales, y están separados por una distancia uniforme de aproximadamente 100 nm (Heyting, 1996).

El componente mejor caracterizado de los elementos laterales del CS, es la proteína COR1 en hamsters y su proteína homóloga SCP3 (*synaptonemal complex protein*) en ratas. La proteína meiosis específica COR1/SCP3 está constituida de 250 aminoácidos y en una porción significativa del extremo carboxilo se

predice que forma un dominio cola-cola. Se ha demostrado *in vitro* que interactúa con sí misma; por lo que su región cola-cola es muy importante. En células meióticas, COR1/SCP3 se localiza en los elementos axiales desinapsados y en los elementos laterales de los CS maduros; y no se disocia de los cromosomas cuando el CS se desensambla. De diplotene a metafase I, COR1/SCP3 permanece asociada con los núcleos de cromosomas y aunque el patrón de tinción con anticuerpos antiCor1 llega a ser progresivamente más débil y discontinuo se va acumulando en la región pericentromérica. En anafase I, COR1/SCP3 ya no se detecta a lo largo de los núcleos cromosómicos; sin embargo, la proteína se disocia del centrómero hasta la anafase II. Este patrón de localización sugiere que COR1/SCP3 tiene una función en la cohesión y la segregación cromosómica (Moeny y Spyropoulos, 1995; Roeder, 1997).

En *S. cerevisiae* la proteína meiosis específica Red1 está asociada con elementos axiales desinapsados y con CS maduros. Red1 se localiza de forma discontinua a lo largo de los cromosomas en paquítene. Se encuentra estrechamente relacionada con los núcleos de cromosomas meióticos y se requiere para la formación de los elementos axiales-laterales. Se ha hipotetizado que Red1 es la base para la formación de los elementos axiales, promoviendo el ensamblado de otras proteínas responsables de la formación de los elementos lineales continuos. Se ha sugerido una interacción directa entre las proteínas Red1 y Hop1, la cual es también un componente de los cromosomas meióticos. Red1 y Hop1 se localizan en el mismo sitio y Hop1 requiere de Red1 para su ensamblado a los cromosomas. Además, la sobreproducción de Red1 suprime ciertas mutantes nulas de *hop1*. Red1 se disocia de los cromosomas cuando el CS se desensamba (al mismo tiempo que Zip1), mientras que Hop1 lo hace más tempranamente (Smith y Roeder, 1997).

Otros componentes de los elementos laterales incluyen a una proteína de 170 Kd codificada por el gen *Scp2* en ratas, así como a la Topoisomerasa II; que es un componente del armazón proteico de los cromosomas mitóticos (Heyting, 1996). Sin embargo, estudios realizados en espermatoцитos de ratón, con un inhibidor de topoisomerasas; muestran que el CS se mantiene ensamblado, aunque se inhibe la

condensación de los cromosomas metafásicos; así, el CS puede ser ensamblado y desensamblado en ausencia de actividad de la topoisomerasa II (Cobb y cols, 1997).

El elemento central del CS se localiza paralelo y equidistante entre los dos elementos laterales, permitiendo una relación más estrecha entre los homólogos reduciendo la distancia de 300 nm a sólo 100 nm. Esta región central presenta filamentos transversos espaciados regularmente; los cuales se localizan de manera perpendicular a lo largo del complejo. Muchos de estos filamentos atraviesan completamente el CS; de un elemento lateral al otro, mientras que otros terminan en el elemento central (Roeder, 1997).

Algunos de los genes que codifican para los componentes de los filamentos transversos del CS, los cuales unen a los 2 elementos laterales se han estudiado en las levaduras y en los mamíferos (Dresser, 2000). Estos incluyen a los genes *zip1*, *zip2* y *zip3* de *S. cerevisiae*, cuyos productos forman parte de los filamentos transversos y en asociación con moléculas motoras median la sinapsis actuando como un cierre cromosómico (Roeder, 1997). La proteína Zip3 permite la co-localización de focos discretos de la proteína Zip2 a través de los cromosomas meióticos (Agarwal, 2000). Zip2 se requiere para iniciar la sinapsis y se encuentra en las primeras conexiones axiales. Esta proteína permite la co-localización de la proteína Zip1 a todo lo largo de los cromosomas meióticos ya apareados. Cuando Zip2 se ha unido a los cromosomas requiere a su vez de las proteínas Rad51 y Dmc1; que formarán los nódulos tempranos (Chua y Roeder, 1998). Las proteínas Rad51 y Dmc1 forman parte de un complejo multiproteico que parece estar implicado en la búsqueda de homología y en el establecimiento de la sinapsis y la recombinación (Barlow y cols, 1997).

Los homólogos del gen *zip1* son el gen *Scp1* de ratas y los homólogos llamados *Syn1* en hamsters y ratones y *SYN1* en humanos. Las proteínas codificadas por estos genes contienen entre 875 a 997 aminoácidos y cada una comprende una región central larga con motivos extendidos cola-cola. Las proteínas forman un homodímero que consiste de un dominio en forma de varilla, flanqueado por pequeños dominios globulares, análogos a la estructura de la miosina y de las proteínas de los filamentos

intermedios. A pesar de presentar una estructura y posición similar dentro del CS, *Scp1* y *Zip1* no muestran una secuencia de aminoácidos similar. Los genes *zip1* y *Scp1* se expresan específicamente en células en profase meiótica (Sym y cols, 1993; Meuwissen y cols, 1997). Las siguientes evidencias apoyan a *Zip1* y *SCP1/SYN1* como componentes de los filamentos transversos:

- Estas proteínas se localizan en cromosomas que presentan sinapsis, pero no son detectadas en elementos axiales que no la presentan (Sym y cols, 1993; Meuwissen y cols, 1997).
- En las mutantes nulas de *zip1*, los elementos axiales de los homólogos que ya han sido apareados se ensamblan a lo largo de toda su longitud; sin embargo, éstos no presentan sinapsis (Sym y cols, 1993; Nag y cols, 1995).
- Las mutaciones que incrementan la longitud del dominio cola-cola de *Zip1*, producen alteraciones en el amplitud del CS (Sym y Roeder, 1995). Esto concuerda con la aseveración hecha por Sym y cols (1993) en donde la longitud predicha para la proteína *Zip1* es de 100 nm, medida que representa el ancho del complejo sinaptonémico tripartita.

Estos datos sugieren que 2 dímeros de *SCP1/SYN1* se localizan cabeza a cabeza, y quizás se sobrelapen ligeramente, atravesando el CS de un elemento lateral al otro. Así, el dominio globular, amino terminal de estas proteínas podría constituir el elemento central del CS (Roeder, 1997).

Se han propuesto varias funciones para el CS. En organismos aquiasmáticos como *Bombyx mori* se presenta un CS modificado que no se desensambla en diplotene y mantiene unidos a los dos homólogos hasta la separación de los bivalentes en anafase. Este CS modificado representa una vía alternativa en organismos que no presentan recombinación como un medio para segregar adecuadamente (Rasmussen, 1977). El CS también puede requerirse para convertir los entrecruzamientos en quismas funcionales, asegurando una correcta segregación reduccional durante la meiosis I. Finalmente, el CS puede mediar la interferencia de entrecruzamiento o quiasmática manteniendo un control en la frecuencia y la distribución de los entrecruzamientos (Egel, 1995; Heyting, 1996; Zicker y Kleckner, 1999; Walker y Hawley, 2000).

Durante el establecimiento de la sinapsis se ha observado que existen cuerpos electrodensos que se encuentran asociados con la formación del CS. Estos cuerpos densos son llamados nódulos y pueden apreciarse tempranamente, correspondiendo a los complejos proteicos implicados en la búsqueda de homología o tardíamente (nódulos de recombinación) representando las enzimas responsables del intercambio de material genético entre los cromosomas homólogos (Schmekel, 2000).

### I.1.3 TRANSICIÓN ZIGOTENE-PAQUITENE: NÓDULOS DE RECOMBINACIÓN

Estudios de microscopía electrónica llevados a cabo en células meióticas muestran la presencia de complejos proteicos asociados a los cromosomas meióticos con los elementos axiales o el CS parcial o totalmente formado. Estos complejos reciben el nombre de nódulos de recombinación y se presentan en dos formas difiriendo en el tiempo de aparición, número y distribución (Plug y cols, 1998; Agarwal, 2000).

Los nódulos meióticos tempranos son generalmente llamados nódulos meióticos y se encuentran presentes durante leptotene tardío, zigotene y paquitene temprano. En zigotene se encuentran asociados con los elementos axiales que aún no han apareado o sobre la porción de las conexiones fibrosas de estos mismos elementos que ya se encuentran alineados. Los nódulos tempranos difieren en forma y tamaño (30-200 nm) y son más abundantes que los nódulos tardíos, y desaparecen de manera gradual conforme la célula entra a paquitene (Heyting, 1996; Plug y cols, 1998).

Los nódulos tardíos, generalmente llamados nódulos de recombinación, se presentan durante paquitene y están situados a intervalos regulares en el CS tripartita en asociación con la región central y nunca son vistos en ausencia del CS. Comparados con los nódulos tempranos éstos son más escasos y presentan un tamaño que no rebasa los 100nm (Zickler y Kleckner, 1999; Schmekel, 2000).

Se ha postulado que en la levadura y en los mamíferos dos proteínas; Dmc1 y Rad51 son los componentes principales de los nódulos tempranos. Estas proteínas son análogas a las proteínas RecA de *Escherichia coli*, que interviene en la búsqueda de regiones homólogas e intercambio de cadenas de DNA. Las proteínas Dmc1 y Rad51 se colocan en zonas discretas de los "núcleos" meióticos y probablemente marquen los sitios en que se está realizando el intercambio entre las cadenas. La proteína Rad51 se requiere para la localización de Dmc1 y muchos *foci* contienen ambas proteínas (Bishop, 1994).

Los *foci* de Rad51/Dmc1 aparecen al mismo tiempo que las DSB y éstas son necesarias para el ensamblado de ambas proteínas. Los *foci* desaparecen cuando los cromosomas completan la sinapsis.

En las levaduras silvestres, el número promedio de *foci* (aproximadamente 50) es significativamente menor que el número total de eventos de recombinación (aproximadamente 260). Esta diferencia quizá sea debida a la existencia pasajera del complejo Rad51/Dmc1 (Bishop, 1994; Roeder, 1997; Dresser, 2000).

Los homólogos del gen *Rad51* han sido identificados en el pollo, el ratón y el hombre. La proteína Rad51 de eucariontes superiores no siempre se disocia de los cromosomas cuando completan la sinapsis; en algunos organismos permanece asociada a todo lo largo de los cromosomas en sinapsis; así Rad51 está presente en ejes asinápticos y sinápticos, de zigotene a paquitene (Roeder, 1997; Thacker, 1999).

En estudios con inmunotinción en meiocitos de mamíferos, se han observado *foci* discretos de RAD51 y DMC1 en asociación con los elementos axiales. Los *foci* son abundantes en profase temprana, en leptotene y zigotene, pero desaparecen de los elementos laterales a mitad de paquitene. El número de *foci* excede el predicho para quiasmas funcionales en estos organismos, lo cual es consistente con que tengan una función en la formación de nódulos de recombinación tempranos pero no tardíos (Hassold y cols, 2000).

En espermatoцитos de ratón el cambio de asinapsis a sinapsis implica la colocalización de otras proteínas con RAD51, éstas son RPA; una proteína de unión a DNA de cadena sencilla y ATR y ATM las cuales están implicadas en detectar daños en el DNA y prevenir la progresión del ciclo celular hasta que el daño sea reparado. Se ha observado que sin la proteína RPA, o alguna otra proteína de unión a cadena sencilla, RAD51 no puede llevar a cabo el intercambio y por lo tanto ni recombinación, ni conversión génica ocurren (Plug y cols, 1998).

Plug y cols (1998) confirmaron que *RAD51*, *RPA*, *ATR* y *ATM* son componentes de los nódulos meióticos y apoyan la suposición de que un subgrupo de nódulos meióticos puede ser convertido a nódulos de recombinación al tener un cambio en la composición de proteínas.

En los nódulos de recombinación tardíos la proteína RAD51 comienza a desaparecer a la vez que *foci* de MLH1 comienzan a aparecer en la transición de paquitene medio. La proteína RPA que se encontraba asociada a RAD51 permanece unida al CS y ahora colocaliza con la proteína MLH1, sugiriendo que al igual que RAD51; RPA es un componente de los nódulos meióticos tempranos así como de los nódulos de recombinación tardíos. Plug y cols (1998) sugirieron que cualquier nódulo meiótico temprano tiene el potencial de llegar a ser un nódulo de recombinación siempre y cuando se encuentre asociado con RAD51 y RPA.

La proteína MLH1 es homóloga a la proteína MutL de *E. coli*, que participa en el sistema de reparación de bases mal apareadas. La proteína MLH1 de mamíferos ha sido correlacionada con los nódulos tardíos por lo siguiente: En los espermatoцитos de ratón el número y distribución de *foci* MHL1 corresponde al número y distribución de quiasmas reportados. De igual manera, los ratones deficientes en esta proteína no forman quiasmas y son arrestados en la metafase meiótica I. Esto sugiere, que los nódulos de recombinación vistos a lo largo del CS durante la primera mitad de paquitene están implicados en la recombinación recíproca y que MLH1 puede ser considerada un componente de los nódulos de recombinación (Baker y cols, 1996; Hassold y cols, 2000).

Otras proteínas que quizá sean componentes de los nódulos de recombinación son las proteínas de levadura Msh4 y Msh5 que forman heterodímeros, y son homólogas a las proteínas MutS de *E. coli*. Estas proteínas son meiosis específicas y han sido identificadas también en ratón, humano y *C. elegans*. En la levadura han sido implicadas en pasos intermedios y tardíos de la recombinación, por lo que no se requieren para la formación de DSB. Una mutación nula de *msh4* reduce el entrecruzamiento (aproximadamente 2 veces) pero no tiene efecto alguno en la conversión génica o en la reparación de bases mal apareadas. La proteína Msh4 se localiza en zonas discretas de los cromosomas predominantemente en paquitene (Zickler y Kleckner, 1999).

Otras proteínas implicadas en los nódulos tardíos son Zip2 y Zip3 que interactúan con el heterodímero Msh4 y Msh5. Agarwal y Roeder (2000) proponen que las proteínas Zip2 y Zip3 sirven para acoplar la formación del CS y la recombinación.

Carpenter (1987) propone que los eventos de conversión mediados por nódulos tempranos son el resultado de la búsqueda de homología durante los estados tempranos de la sinapsis, por lo que, los nódulos tendrían una función en la búsqueda de homología y yuxtaposición de las regiones homólogas, marcando los sitios de intercambio de cadenas sin estar implicados en eventos de recombinación. Algunas evidencias que apoyan esto son:

- El número de nódulos tempranos en eucariotes multicelulares es varias veces el número observado de quiasmas (Heyting, 1996)
- Los nódulos se asocian con los elementos axiales y el CS en regiones eucromáticas, pero rara vez son observados en los elementos asociados a la heterocromatina (Plug y cols, 1998).
- Cuando los elementos axiales homólogos convergen y divergen en zigotene, los nódulos se encuentran en la convergencia (Plug y cols, 1998).

Los nódulos tardíos presentan una correspondencia con el número y la distribución de los entrecruzamientos; por lo que se postula que son los complejos multienzimáticos que catalizan la recombinación y que representan sólo aquellas cadenas que llevan a cabo el intercambio y que por ende serán resueltas como entrecruzamientos (Heyting, 1996).

Algunas evidencias que apoyan la función de los nódulos de recombinación como catalizadores del entrecruzamiento son:

- El número total de nódulos es aproximadamente igual al número de quiasmas observados posteriormente en diplotene (Albers y cols, 1996).
- Los nódulos están distribuidos a lo largo del complejo sinaptonémico como lo están los fenómenos de entrecruzamiento y ocurren predominantemente en regiones eucromáticas y son raros o están ausentes en regiones centroméricas y aún más en regiones de heterocromatina (Albers y cols, 1996; Zickler y Kleckner, 1999).

- Datos genéticos y citológicos indican que la presencia de un fenómeno de entrecruzamiento impide que ocurra otro fenómeno de entrecruzamiento en cualquier lugar próximo del cromosoma; de forma análoga, generalmente los nódulos no se producen muy próximos unos de otros (Alberts y cols, 1996).
- Todos los brazos cromosómicos presentan al menos un nódulo de recombinación, lo que corresponde al hecho de que cada bivalente tiene al menos un quiasma obligatorio (Zickler y Kleckner, 1999).
- El CS y el entrecruzamiento están ausentes en machos de *Drosophila sp.*, sin embargo en las hembras el CS y el entrecruzamiento se correlacionan con la formación de los nódulos de recombinación (Zickler y Kleckner, 1999).

#### I.1.4 RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

La recombinación homóloga involucra un intercambio físico de segmentos de DNA; es usualmente representada por una ruptura y una reunión, en la cual dos cromátidas no hermanas (cada una formada por DNA de doble hélice) se han roto y ligado una con otra. Esta reacción es posible cuando existen secuencias homólogas entre las dos moléculas, permitiendo mantener un intercambio preciso a nivel de pares de bases. El intercambio recíproco crea una conexión entre las dos moléculas de DNA de doble hélice. El par de moléculas conectadas se llama molécula unida (cromosomas homólogos unidos) y el punto en el cual las 2 cadenas opuestas de DNA de doble hélice se cruzan, es llamada unión de recombinación (cromátidas hermanas unidas, de origen parental diferente). En los sitios de recombinación, en donde cada DNA de doble hélice tiene una región formada por una cadena materna y una paterna se forma un DNA híbrido o también llamado DNA heterodúplex (Lewin, 2000).

Anteriormente se proponían rupturas de cadena sencilla en ambos dúplex de DNA para generar un punto, en el cual ambas cadenas sencillas pudieran desenrollarse y participar así en el intercambio genético. Actualmente se conoce que el inicio de la recombinación está dado por un rompimiento de doble cadena en una de las moléculas dúplex (Haber, 1997).

Cuando la recombinación involucra moléculas de DNA de doble hélice, la manipulación topológica es requerida, ya sea, que el DNA de doble hélice deba ser liberado para rotar, o para permitir que su topología pueda ser más fácil de manejar. Si imaginamos el rompimiento en una molécula unida y la visualizamos en un plano, ésta formaría una estructura denominada "Estructura de Holliday", la molécula unida formada por el intercambio de cadenas debe ser resuelta separando las dos moléculas de doble hélice, para lo que se requiere un par de rupturas. El resultado de la reacción depende de las cadenas donde se realiza el corte; si la ruptura se lleva a cabo en el par de cadenas que no fueron cortadas originalmente (el par de cadenas que no inicio el intercambio), las 4 cadenas originales habrán sido cortadas. La doble hélice del DNA materno o paterno se liga covalentemente a la doble hélice del otro DNA materno o paterno, vía una cadena de DNA heterodúplex, denominándose recombinación

homóloga. Si al contrario las cadenas que originalmente fueron cortadas son cortadas nuevamente (las otras dos cadenas permanecen intactas), sólo va a existir recombinación en ese pequeño fragmento, permaneciendo como un parche de recombinación (molécula heterodúplex), los DNAs parentales originales permanecen intactos. Este tipo de resolución se denomina conversión génica (Lewin, 2000).

La recombinación se inicia por una endonucleasa que rompe la doble cadena de uno de los DNA dúplex parentales, el "receptor". La ruptura se extiende formando un hueco o *gap* por la acción de una exonucleasa. La(s) exonucleasa(s) generan extremos libres 3' y uno de los extremos 3' migra hacia las regiones homólogas del dúplex "donador". La formación de DNA heterodúplex genera una asa "D", en la cual una cadena del dúplex donador es desplazada. El asa "D" se extiende por síntesis de reparación, usando el extremo 3' como *primer* o cebador. Eventualmente el asa "D" llega a ser tan grande como el hueco en la cromátida recipiente y se desplaza al dúplex "donador". Cuando la cadena sencilla llega al sitio del hueco, la secuencia complementaria de cadena sencilla se alinea. Ahora existe un DNA heterodúplex flanqueando el hueco, y el hueco en sí mismo es representado por el asa "D" de cadena sencilla. La integridad del dúplex de la región donde quedó el hueco se restablece por síntesis de DNA usando el extremo 3' terminal del lado izquierdo del hueco como *primer*. Globalmente, el hueco ha sido reparado por dos vueltas individuales de síntesis de DNA de cadena sencilla. La migración recíproca genera un doble entrecruzamiento, el cual debe ser resuelto a través de cortes, obteniéndose como resultado la recombinación o la conversión génica (Lewin, 2000).

El evento primario para iniciar la recombinación meiótica en *S. cerevisiae* ha sido identificado como un rompimiento de doble cadena. La frecuencia global de DSB y su distribución a través del genoma es generalmente consistente con la frecuencia y distribución de eventos de recombinación meiótica y han sido observadas en *hotspots* de recombinación y en regiones de cromatina donde el DNA es accesible; por ejemplo sitios nucleasa hipersensible. Los sitios de DSB en varios *hotspots* fueron examinados a nivel de resolución nucleotídica, pero no se encontró que estos rompimientos fueran realizados por endonucleasas sitio-específicas, es decir, no existe una secuencia específica para llevar a cabo las DSB (Haber, 1997).

Uno de los primeros genes meióticos específicos que se requiere para la iniciación de la recombinación meiótica es *spo11* (Keeney y cols, 1997). El producto de este gen se encuentra directamente relacionado con la producción de las DSB, pero no es el único gen que al delecionarse o mutarse produce una falla para inducir el corte. Existen por lo menos otros 10 genes implicados en los eventos iniciales de la recombinación: *mre2*, *mer1*, *mer2*, *mei4*, *rec102*, *rec104*, *rec114* y *rad50*, *mre11*, *xrs2*; estos 3 últimos también están implicados en mitosis (figura 3) (Haber, 1997).

La proteína Spo11 tiene una secuencia similar a la de la familia de las topoisomerasas II, originalmente identificada en las arqueobacterias y presumiblemente actúa por un mecanismo de trans-esterificación tipo topoisomerasa, en el cual Spo11 se une covalentemente al DNA blanco. Se han identificado homólogos en otros organismos y parecen tener una función similar, sugiriendo que este componente de la vía de recombinación ha sido conservado a través de la evolución. Spo11 actúa como endonucleasa mediando rompimientos que pueden ser reversibles, originando así la posibilidad de que las DSB meióticas puedan ser revertidas en ausencia de un patrón homólogo adecuado para poder recombinar. Esto también ha sugerido que probablemente esté implicada en el apareamiento homólogo antes de que se inicie la formación de las DSB, ya sea, uniendo dos hélices de DNA para que interactúen o bien promoviendo interenrollamientos entre los cromosomas homólogos que han sido colocados por otras proteínas (Haber, 1997; Keeney y cols, 1997).

Las DSB meiosis específicas fueron demostradas inicialmente en *S. cerevisiae*, sin embargo se han identificado homólogos de Spo11 desde las arqueobacterias (subunidad catalítica de la DNA topoisomerasa TopoVI) hasta los eucariones que incluyen a *S. cerevisiae*, *S. pompe*, *C. elegans*, *D. melanogaster* y *Mus musculus*. En estos organismos Spo11 se requiere para la recombinación meiótica, sugiriendo un mecanismo conservado en los pasos iniciales de este proceso (Metzler-Guillemain y Massy, 2000). Poco es conocido acerca de su función en mamíferos, pero estudios de expresión indican que se encuentra en las gónadas y se expresa cuando se forman las DSB; sugiriendo que en los

EVENTO

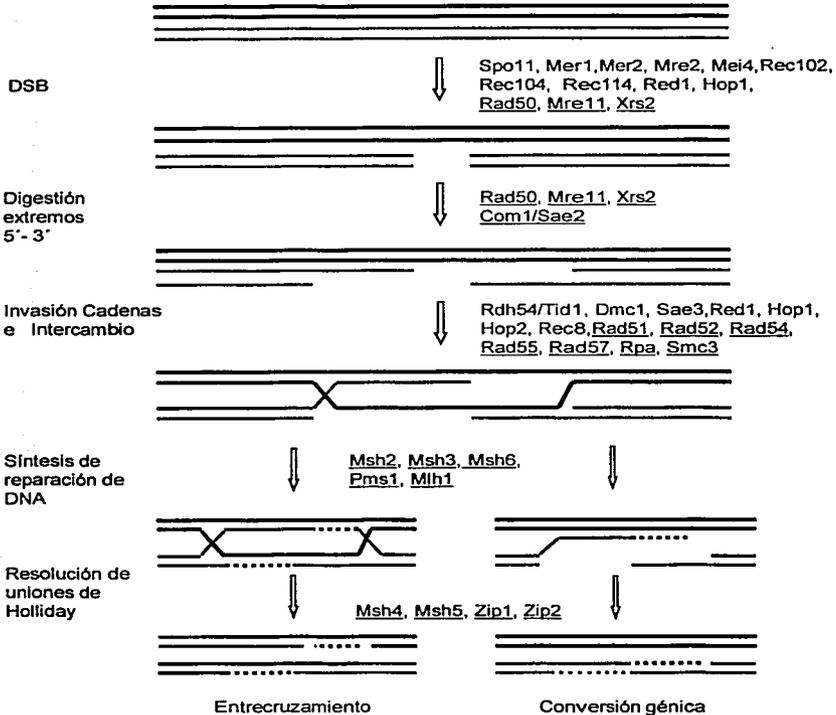


Figura 3. Modelo de recombinación genética mediado por el rompimiento de doble cadena en levaduras. Las proteínas que participan en meiosis y en reparación mitótica se encuentran subrayadas (Modificado de Heemst y Heyting, 2000; Villanueva y Hillers, 2001).

mamíferos al igual que en otros organismos SPO11 es responsable de la formación de las DSB (Hassold y cols, 2000).

Recientemente se demostró que la recombinación se inicia por SPO11 al formar las DSB en el ratón. Este evento ocurre en leptotene temprano, simultáneamente con la unión de los primeros componentes de los elementos axiales, previo a la sinapsis. Este hecho confirma que los mamíferos siguen la misma secuencia de eventos que la levadura, donde la sinapsis requiere o es dependiente de la recombinación (Mahadevaiah y cols, 2001; Hunter y cols, 2001).

Poco se sabe acerca de las proteínas que actúan después de Spo11. EL complejo formado por las proteínas Rad50, Mre11 y Xrs2 parece intervenir en la formación y procesamiento de las DSB en las levaduras. Este complejo es necesario, pero no suficiente para la formación de las DSB; sin embargo, si resulta indispensable en su procesamiento. Además de este complejo existen otras proteínas relacionadas con los elementos axiales, como Hop1 y Red1, que al ser delecionadas reducen la formación de las DSB. Por esto es probable que Spo11 actúe en el contexto de ambos complejos; los elementos axiales y el formado por Rad50, Xrs2 y Mre11 y su ausencia o presencia probablemente explique porqué algunas regiones promotoras son mucho más "calientes" que otras (Haber, 1997).

La variante de la histona fosforilada, H2AX, es un marcador característico de la reparación de las DSB inducidas por radiación en células mitóticas. Esta modificación parecería ser la señal inicial para la reparación de DNA. Esta variante de histona se encuentra solo en las DSB pero no se une a las rupturas de cadena sencilla (Rogakou y cols, 1999). Mahadevaiah y cols (2001) demostraron que esta variante de histona también se fosforila al momento en que se producen las DSB por SPO11 durante la espermatogénesis en el ratón.

Después del rompimiento de la doble cadena, los extremos de la molécula rota deben ser digeridos por una actividad exonucleotídica 5' a 3'. Los genes de levadura *rad50* y *mre11* tienen homólogos en *E. coli*; *sbcC* y *sbcD* respectivamente. Estos homólogos actúan como endo y exonucleasas en moléculas de

DNA de doble cadena, sugiriendo que el complejo conteniendo Rad50, Mre11 y Xrs2 puede llevar a cabo la resección, además del procesamiento de las DSB en levaduras. Esta aseveración puede ser confirmada por la observación de que mutaciones en estos genes conducen a una falla a este nivel, además de que cuando la proteína Rad50 se muta la proteína Spo11 no se remueve de los extremos de las DSB y por lo tanto se acumulan extremos sin degradar (figura 3) (Haber, 1997; Roeder, 1997; Smith y Nicolas, 1998).

Estudios recientes en mamíferos sugieren que un complejo de proteínas formado por Rad50 y Mre11 funcionan tempranamente en este proceso. En espermatoцитos de ratón se observó que estas proteínas tienen una localización similar y se presentan en forma abundante durante preleptotene antes de que cualquier elemento del CS sea detectado. En zigotene temprano disminuyen y finalmente al inicio y primera mitad de paquitene desaparecen; por lo que, quizá estén implicadas en la remodelación o preparación de la cromatina y actuen como un complejo pre-recombinación que facilite la formación de las DSB por SPO11, además de intervenir en el procesamiento temprano de las mismas (Roeder, 1997; Eijpe y cols, 2000; Mahadevaiah y cols, 2001).

Otro gen que se requiere para la resección es *com1/sae2* (Prinz y cols, 1997). Levaduras mutantes nulas de este gen acumulan DSB con extremos bloqueados. La proteína Com1/Sae2 junto con el complejo Rad50, Mre11 y Xrs2 podría efectuar la remoción de la proteína Spo11 unida al extremo 5' y el subsecuente procesamiento, probablemente auxiliada por otras proteínas (Smith y Nicolas, 1998).

Cuatro genes de levadura, altamente conservados evolutivamente, codifican para homólogos del gen *recA* de bacterias, *rad51*, *rad55*, *rad57* y *dmc1*. Mutaciones en estos 4 genes pueden conducir a defectos en la reparación de las DSB y estudios bioquímicos sugieren que es la enzima Rad51 la que se une al DNA de cadena sencilla y cataliza la invasión de los extremos 3' libres hacia un DNA dúplex intacto. La proteína purificada Rad51 promueve apareamiento e intercambio de cadenas *in vitro* y forma filamentos núcleo-proteicos que son similares a aquéllos formados por RecA. Esta proteína se une a DNA de

cadena sencilla y a DNA de doble cadena promoviendo el atineamiento de cadenas sencillas complementarias; esto lo realiza interaccionando con otras proteínas de la siguiente manera: Rad55 y 57 forman un heterodímero que quizá actué como un cofactor que ensambla a Rad51 al DNA de cadena sencilla. Rad52 interactúa con las proteínas de unión a DNA de cadena sencilla (RPA) y facilita el anclaje de Rad51 con el DNA de cadena sencilla que ha perdido su estructura secundaria (Roeder, 1997; Thacker, 1999).

Las proteínas Hop1 y Red 1 además de estar implicadas en la formación del CS están presentes en el proceso de recombinación al nivel de la invasión de las cadenas. Se ha observado que mutaciones en estos genes reducen la formación y la frecuencia de moléculas unidas entre los cromosomas homólogos, pero no entre las cromátidas hermanas; sugiriendo que pueden ser requeridas para escoger vías específicas de reparación entre los cromosomas homólogos, eliminando aquéllas realizadas entre las cromátidas hermanas, como sucede en mitosis (Heyting, 1996; Schwacha y Kleckner, 1997; Dresser, 2000). Un entrecruzamiento no interhomólogo, crearía una mala segregación. Por esto, la meiosis tiene que asegurar una recombinación entre homólogos y no entre cromátidas hermanas de un mismo cromosoma (Haber, 2000).

En mamíferos como en otros organismos también existen miembros de la familia RecA, como son, RAD51 y DMC1. Pocos avances se han establecido en cuanto a esclarecer la función de RAD51, debido a que mutaciones en este gen son letales en el ratón. Sin embargo mutaciones en DMC1 arrestan a los espermatocitos en profase temprana, pues no hay recombinación, ni sinapsis formando en lugar de 20 bivalentes; 40 univalentes, originando así individuos estériles (Tomado de Hassold y cols, 2000). La proteína RAD51 no es exclusiva de meiosis y participa también en la reparación de las DSB inducidas por radiación en células mitóticas. Por el contrario, DMC1 parecería haberse especializado en promover la recombinación interhomóloga en meiosis (Villeneuve y Hillers, 2001)

La proteína meiosis específica Rdh54/Tid1, homóloga a Rad54, es una helicasa cuya función es remodelar la cromatina. Esta proteína se une a Rad51 y a Dmc1 (Shinohara y cols, 1997). La proteína

Rad54 interactúa con la proteína Rad51 en la búsqueda de homología en el intercambio de cadenas. Rad51 tiene baja actividad de ATPasa, resultando en una inhabilidad para desviar heterólogos. Debido a esto, quizá Rad54 ayude a Rad51 a desviar estos heterólogos en el intercambio de cadenas, pues la actividad de Rad54 en el desenrollamiento en la doble cadena de DNA es consistente con esta función, además cuando existen cadenas híbridas los niveles de proteína Rad54 aumentan, sugiriendo alguna contribución en interacciones entre homólogos. Esto es una especulación, ya que, el mecanismo específico por el cual la proteína Rad54 asiste a la proteína Rad51 durante la búsqueda de homología en el intercambio de cadenas se desconoce (Schmuckli-Maurer y Heyer, 2000).

Rad54 podría estar implicada en la selección de interacciones homólogo-homólogo o hermana-hermana, aunque no forma parte del CS, esta proteína se encuentra también relacionada con la invasión de las cadenas (Schmuckli-Maurer y Heyer, 2000). Se ha propuesto un modelo sugiriendo la existencia de dos tipos específicos de DSB en meiosis: a) Una clase dependiente de la proteína Red1 que conduzca sólo a interacciones interhomólogas asegurando así segregación reduccional en meiosis I y b) una vía menos diferenciada, iniciada por una DSB "pícaro" que conduce a uniones interhermanas e interhomólogas. En este contexto, la proteína Rad54 podría funcionar reparando las DSB llevadas a cabo entre las cromátidas hermanas, en la vía menos diferenciada (Schwacha y Kleckner 1997; Schmuckli-Maurer y Heyer 2000).

La proteína MLH1 forma parte de un sistema de reparación de bases mal apareadas (*mismatch repair*, MMR). Este sistema fue caracterizado en *E. coli* identificando 3 proteínas; MutS, MutL y MutH. Este proceso se ha conservado hasta los eucariontes superiores aumentando su complejidad, ya que, las tres proteínas requeridas en bacterias han sido remplazadas por múltiples proteínas MutS, MutL y proteínas adicionales. Además de su función en la reparación, el sistema MMR está implicado en la recombinación meiótica. Esto ha sido estudiado en *S. cerevisiae* en donde se han identificado 6 homólogos de MutS (Msh1-6) y 4 homólogos de MutL (Mlh1-3 y Pms1). Mutaciones en estos homólogos (excluyendo a Msh1) causan defectos en la recombinación meiótica; ya sea, disminuyendo la frecuencia de recombinación y con esto incrementando el porcentaje de no-disyunción, dando origen a machos y hembras estériles,

(Msh4, Msh5) o incrementando la segregación postmeiótica, indicando una falla en corregir los DNAs heterodúplex mal apareados (Msh4, Msh5, Msh2, Msh3 y Pms1). En cuanto a Mlh1 se piensa que interactúa con los otros tres homólogos de MutL y mutaciones en ese gen reducen la frecuencia de recombinación e incrementan la segregación postmeiótica (figura 3) (Tomado de Hassold y cols, 2000).

Baker y cols (1996) demostraron que la proteína MLH1 de ratón tiene una función importante en la recombinación meiótica. La ausencia de esta proteína inhibe la recombinación y bloquea la meiosis, dando como resultado cromosomas univalentes causando un arresto en esta etapa del espermatocito. Usando inmunofluorescencia demostraron que MLH1 se encuentra en *foci* discretos asociados al CS de espermatocitos y oocitos silvestres durante paquitene y que estos *foci* están bien correlacionados con el número y distribución de quiasmas obtenidos en análisis citogenéticos. Así en el hombre se observó entre los cromosomas X-Y la presencia de un sólo foco en la región distal de sus brazos cortos correspondiente a la región de apareamiento y recombinación denominada región pseudoautosómica (PAR1); y que en la mujer los *foci* no se eliminaban hasta diplotene marcando el lugar en donde los quiasmas fueron reportados. Otros estudios, demuestran que los focos de la proteína MLH1 en el hombre tienden hacia una posición distal, mientras que en la mujer esta posición es menos pronunciada. Esto sugiere que la proteína MLH1 está implicada en la formación o procesamiento de los eventos de recombinación y que su localización marca el número y localización de los entrecruzamientos que darán lugar a la formación de quiasmas (Tomado de Hassold y cols, 2000).

La reparación de las DSB por recombinación homóloga puede resultar en productos de entrecruzamiento o no, sin embargo, sólo los entrecruzamientos aseguran una segregación correcta en la meiosis I. Por lo tanto no es suficiente promover la recombinación homóloga, sino que también es necesario asegurar que ésta sea resuelta como un evento de entrecruzamiento. Esta función probablemente se lleva a cabo por el heterodímero formado por Msh4 y Msh5. Este complejo aparentemente no tiene una función en la reparación de bases mal apareadas, pero presenta una función especializada en la recombinación meiótica. El heterodímero Msh4/Msh5 actúa después de la formación de las DSB promoviendo específicamente la aparición de productos de entrecruzamiento. Por analogía con las proteínas que

intervienen en el MMR, se ha propuesto que este complejo podría reconocer pequeñas distorsiones en la estructura dúplex del DNA. Su unión estabilizaría el intermediario de recombinación o reclutaría factores adicionales que permitan resolver los eventos de recombinación como entrecruzamientos más que como conversiones génicas (Villeneuve y Hillers, 2001).

El heterodímero Msh4/Msh5 podría actuar en el inicio de la invasión de las cadenas sencillas promoviendo la formación de un intermediario estable, esto podría ocurrir al evitar el desplazamiento de la cadena invasora o mediante la promoción de la captura del segundo extremo para asegurar la formación de un intermediario de Holliday, el cual podría posteriormente ser resuelto como un entrecruzamiento. Alternativamente su acción podría estar después de la formación del doble intermediario de Holliday promoviendo su resolución para dar entrecruzamientos (figura 3) (Villeneuve y Hillers, 2001).

Sólo una minoría de los sitios en donde la recombinación se inicia se resuelven en un intercambio recíproco y resultan en la formación de quiasmas. Los restantes no forman heterodúplex o son resueltos como eventos de conversión génica (Villeneuve y Hillers, 2001). En la tabla 3 se muestran las proteínas humanas implicadas en la recombinación meiótica.

Dentro de la recombinación las DSB pueden ser reparadas a través de una de las cromátidas hermanas o de una secuencia homóloga que puede ser alélica o ectópica. Como ya se mencionó, proteínas como Hop1, Red1 y Rad54 parecen tener una función en la selección del patrón entre cromátidas hermanas de un mismo cromosoma o entre cromosomas homólogos (Haber, 2000).

Dentro de la selección existen algunas secuencias que tienen múltiples copias, dispersas a través del genoma y los entrecruzamientos entre tales sitios no alélicos pueden conducir a rearrreglos cromosómicos. Esta recombinación ectópica puede ser restringida por el tamaño de los segmentos homólogos y por lo disperso de sus secuencias, compitiendo con *loci* que presentan una mayor homología en secuencias no dispersas que han sido previamente apareadas durante leptotene. En

**Tabla 3. Proteínas humanas implicadas en la recombinación meiótica (Modificado de Miller y Therman, 2001; Villeneuve y Hillers, 2001; Kohli y Hartsuiker, 2001).**

<b>PROTEÍNA</b>	<b>FUNCIÓN</b>
TRF1	Agrupamiento de los telómeros
SPO11	Endonucleasa, produce DSB
ATM	Detección daño al DNA
ATR	Detección daño al DNA
p53	Detección daño al DNA
RAD50	Reparación de DSB; exonucleasa putativa
RAD51	Apareamiento homólogo, intercambio de cadenas
RAD52	Unión a DNA de cadena sencilla y a RAD51
BRCA1	Unión a RAD51; reparación de DSB
BRCA2	Unión a RAD51; reparación de DSB
MRE11	Unión a RAD50; reparación de DSB; exonucleasa putativa
NBS1	Unión a RAD50; reparación de DSB
DMC1	Intercambio de cadenas meiosis específico, unión a Rad51
MLH1	Reparación de bases mal apareadas, MMR
MSH4	Reparación de DNA meiosis específica, producción de entrecruzamientos
MSH5	Reparación de DNA meiosis específica, producción de entrecruzamientos

levaduras, el requerimiento mínimo de homología para establecer un entrecruzamiento está estimado entre 150 a 250 pb y el porcentaje de entrecruzamiento se incrementa de acuerdo con la longitud de las secuencias idénticas ininterrumpidas. Además se ha observado que en el estado de *bouquet*, dos secuencias localizadas equidistantes a sus respectivos centrómeros tienen una mayor probabilidad de recombinar que aquéllas que se encuentran a diferentes distancias. Aunado a lo anterior, la recombinación alélica tiene ventajas contra la ectópica, ya que al recombinar por primera vez, este evento de recombinación brinda al resto una mayor facilidad para hacerlo. Los elementos relacionados con los puntos de control en la reparación del daño a DNA; Mec1, Rad17 y Rad24 también están implicados en escoger los patrones homólogos y las frecuencias de recombinación, siendo importantes para asegurar la recombinación alélica interhomóloga en competencia con la ectópica y con los patrones entre las cromátidas hermanas de un mismo cromosoma (Haber, 2000 ; Heemst y Heyting, 2000).

Una vez generados los intermediarios de recombinación entre secuencias alélicas, la resolución adecuada de estos permite cumplir con dos funciones específicas:

- Una conexión física entre los homólogos para su adecuada segregación. Los cromosomas homólogos permanecen apareados en la primera división meiótica, ya que, los quiasmas generados por los entrecruzamientos juegan un papel análogo al del centrómero en una división mitótica, manteniendo a los homólogos materno y paterno unidos al huso hasta la anafase I (Alberts y cols, 1996). Los cromosomas que fallan para formar al menos un entrecruzamiento muestran elevados porcentajes de no-disyunción, conduciendo a aneuploidías en los gametos, las cuales pueden contribuir a la producción de una progenie anormal o inviable (Smith y Nicolas, 1998).
- Un camino para generar diversidad, ya que los cromosomas paternos y maternos han cambiado o permutado algunos segmentos de su DNA a través del entrecruzamiento, manifestando este cambio hasta la siguiente generación, cuando los genes del cromosoma recombinante son expresados (Snustad y Simmons, 2000).

### I.1.5 DIPLÓTENE: QUIASMAS

El entrecruzamiento derivado del intercambio de segmentos homólogos entre dos de las cuatro cromátidas, se lleva a cabo durante el estadio de paquítene; sin embargo, el resultado de este proceso no puede ser visualizado sino hasta el siguiente estadio meiótico, diplotene. Los dos cromosomas homólogos que forman el bivalente comienzan a repelerse uno de otro por un mecanismo desconocido, pero permanecen unidos a través de las conexiones establecidas por los quiasmas (Miller y Therman, 2001).

Los quiasmas son entonces el resultado del entrecruzamiento y corresponden al sitio recíproco de ruptura y reunión entre las cromátidas homólogas no hermanas. Citológicamente se observan como estructuras cruzadas localizadas en los sitios donde los eventos de intercambio han ocurrido (Carpenter, 1994).

Las características principales de los quiasmas son:

- Cada uno de los quiasmas implica sólo dos de las cuatro cromátidas. Sin embargo, el resto de las cromátidas pueden tener entrecruzamientos en diferentes puntos. De esta forma un bivalente tiene múltiples posibilidades de presentar intercambios (Carpenter, 1994; Snustad y Simmons, 2000).
- El evento de intercambio que origina un quiasma funcional ocurre solamente entre las cromátidas homólogas, no entre las cromátidas hermanas. Además, si éste intercambio se realizara entre las cromátidas hermanas, no produciría recombinantes genéticos debido a que son idénticas. (Carpenter, 1994; Snustad y Simmons, 2000).
- Sólo los eventos de recombinación entre cromátidas homólogas que son resueltos como entrecruzamientos generan quiasmas (Villeneuve y Hillers, 2001).
- Los quiasmas se observan cuando el par de homólogos se repelen uno a otro manteniéndose en contacto únicamente en el centrómero y en cada uno de los quiasmas. Esta separación parcial hace posible contar los quiasmas. Así el número de quiasmas es gruesamente proporcional a la longitud de los cromosomas (Egel, 1995; Snustad y Simmons, 2000). El conteo de los quiasmas es más

exacto durante diplotene que en los estadios donde los cromosomas se encuentran más condensados como en diacinesis y metafase I (Miller y Therman, 2001).

- Aunque la evidencia directa es limitada, la frecuencia de quiasmas debe ser más alta en oocitos que en espermatocitos humanos, debido a que la frecuencia de recombinación en mujeres es mayor (Robinson, 1996; Miller y Therman, 2001).
- Tanto en la meiosis masculina como en la femenina la densidad mayor de quiasmas se localiza cercana a los telómeros y un pequeño pico se encuentra en la mitad de los brazos más largos. En los hombres se aprecia una reducción mayor en el número de quiasmas cercanos a la región pericentromérica que en las mujeres. Por el contrario los quiasmas y los entrecruzamientos están ausentes o marcadamente reducidos en las zonas heterocromáticas (Robinson, 1996; Broman y cols, 2000; Miller y Therman, 2001).

Se ha propuesto que el quiasma *per se* no es suficiente; y que debe existir una especie de "garantía de unión" para mantener a los quiasmas estables, a fin de que el bivalente permanezca como una unidad hasta la anafase I. Dentro de los elementos que podrían establecer esta "garantía de unión" se encuentran:

- La "unión" entre los homólogos dada por el ensamblado del CS *per se*, se requiere para el entrecruzamiento y la formación de un quiasma funcional (Egel, 1995).
- La cohesión a lo largo de todo el bivalente que puede originar la fuerza de resistencia al empuje de los cinetocoros, ya que, mantiene una asociación física entre las cromátidas hermanas en las regiones distales a los quiasmas (Carpenter, 1994; Bickel y Orr-Weaver, 1996; Heemst y Heyting, 2000).

Algunos estudios en diferentes organismos muestran que los entrecruzamientos que se realizan cercanos a los centrómeros son más efectivos para asegurar una adecuada disyunción en meiosis I, que aquéllos que se llevan a cabo en las regiones teloméricas. Por tanto, esto apoya que la función de los quiasmas

depende de la "unión" y la cohesión al determinar que los quiasmas terminales son menos estables (Tomado de Roeder, 1997).

Como ya se mencionó los quiasmas tienen una función muy importante en aquellos organismos cuya segregación depende de la recombinación, ya que, representan una función análoga a la de los centrómeros manteniendo juntos a los homólogos paternos y maternos hasta la anafase I (Alberts y cols, 1996). Aquellos bivalentes que no formaron quiasmas no se unen y forman 2 univalentes que se mueven a los polos de manera azarosa. Si ambos se dirigen a un sólo polo, el resultado es no-disyunción y con esto la formación de gametos aneuploides (Koehler y cols, 1996; Heemst y Heyting, 2000).

Los entrecruzamientos que formarán quiasmas funcionales están sujetos a un mecanismo regulatorio que gobierna su distribución a lo largo de los cromosomas. Una manifestación del control en el número de entrecruzamientos está dada por la interferencia de entrecruzamientos, esto es, la capacidad de un entrecruzamiento en una región cromosómica que evita la ocurrencia de otro en una región cercana (Egel, 1995; Villeneuve y Hillers, 2001).

## I.1.6 INTERFERENCIA

Los eventos de recombinación meiótica no se distribuyen uniformemente a través del genoma. Así, la frecuencia de intercambio puede variar en distancia por varios ordenes de magnitud de una región del genoma a otra, aún dentro de un sólo cromosoma (Roeder, 1997).

La interferencia de entrecruzamiento se presenta en la mayoría de los organismos y fue descrita inicialmente en los cromosomas de *Drosophila sp.* Este término se refiere al control en la distribución de los eventos de recombinación meiótica; en donde un evento de entrecruzamiento evita la formación de otro entrecruzamiento cercano, ocurriendo por tanto uno independientemente de otro y de forma no azarosa. La interferencia se relaciona además con la frecuencia de recombinación. El total de entrecruzamientos por célula o por cromosoma puede ser variable dentro de los límites establecidos, pero posiblemente existe una mayor flexibilidad en cuanto al control de la distribución (Robinson, 1996).

Existe interferencia positiva cuando los quiasmas están espaciados, mientras que en la interferencia negativa los quiasmas se encuentran muy cercanos uno del otro. Dentro de la interferencia existe un riguroso control en la distribución de los entrecruzamientos especialmente en los cromosomas más pequeños, los cuales deben portar un sólo quiasma obligatorio. A pesar de la gran diferencia en el contenido de DNA por cromosoma en los diferentes organismos, el número de quiasmas no es mayor a 2 ó 3 por brazo cromosómico, exceptuando los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos. La distribución de los quiasmas entre los cromosomas de una misma especie es el reflejo de su densidad por longitud de DNA o por el número promedio de pares de bases cubiertas por un sólo quiasma. Por ejemplo, en *S. cerevisiae* la figura más tardía abarca 175 kb a través del genoma entero, pero sólo 80 kb para el cromosoma más pequeño. En cuanto al hombre las figuras correspondientes son de aproximadamente 70 Mb para los 5 cromosomas más grandes y de 35 Mb para los cinco cromosomas más pequeños, y en la región pseudoautosómica de solo 2.6 Mb, en los brazos cortos de los cromosomas X y Y, donde un sólo quiasma obligatorio es suficiente (Egel, 1995).

El mecanismo por el cual se lleva a cabo el control adecuado en la distribución de los entrecruzamientos se desconoce; sin embargo, es probable que el CS y otras proteínas sirvan para prevenir un segundo entrecruzamiento en una región adyacente al primero (Robinson, 1996).

Existen dos modelos para explicar la función del CS en la interferencia de entrecruzamiento. El primero propone que la sinapsis se inicia en el sitio del entrecruzamiento y que el intercambio se inhibe en regiones en donde los cromosomas ya han establecido la sinapsis; sin embargo, en las regiones en donde aún no se presenta la sinapsis los entrecruzamientos pueden ocurrir. El segundo modelo propone que la interferencia actúa después de que la sinapsis es total y el CS está totalmente formado, siendo éste un sustrato para la transmisión de una señal inhibitoria. Esta señal puede implicar un cambio conformacional en las proteínas asociadas al CS comenzando en los sitios de entrecruzamiento y extendiéndose a lo largo del cromosoma en un efecto tipo domino, o quizá, implique la polimerización de una proteína a lo largo del CS comenzando en los sitios de entrecruzamiento (Robinson, 1996).

Algunos de los hallazgos para explicar esta interferencia son:

- La interferencia se encuentra asociada con el CS y específicamente con la proteína Zip1 del elemento central en la levadura *S. cerevisiae*. Las mutantes de la proteína Zip1 pueden ensamblar completamente los elementos axiales pero no permiten el ensamblado del CS tripartita, originando cambios en la distribución de los intercambios, sin alterar su frecuencia. El resultado es la formación de un número normal de esporas, pero con una viabilidad reducida debido a no-disyunción en meiosis I. Una de las primeras evidencias que apoyaron lo anterior es que los organismos como *S. pompe* y *Aspergillus nidulans* carecen de CS y por lo tanto no presentan la interferencia de recombinación (Egel, 1995; Heyting, 1996). A pesar de lo anterior es posible también que Zip1 tenga una función en el control del entrecruzamiento que preceda o sea independiente de su influencia en la formación del CS (Storlazzi y cols, 1995).
- Otra proteína implicada en la interferencia es la proteína Tam1 de *S. cerevisiae*, la cual es meiosis específica y se encuentra asociada a los telómeros. Además del defecto en la interferencia, las mutantes de *tam1* muestran un retraso en la sinapsis cromosómica. Cuando se presenta una

mutación en *tam1* se reduce al igual que en las mutantes de *zip1* la viabilidad de las esporas, afectando la distribución, sin cambios en la frecuencia de los entrecruzamientos. Sym y Roeder (1994) propusieron que la interferencia de entrecruzamiento y un quiasma obligatorio, son manifestaciones diferentes de un sólo mecanismo, ya que, el estudio de las mutantes de *tam1* permite separar el control de la distribución de los entrecruzamientos de la frecuencia con que ocurren los mismos. Basados en el modelo de regulación de la distribución de los entrecruzamientos por el CS podría especularse que el retraso en la sinapsis es la causa del defecto en la interferencia en estas mutantes, en donde la transmisión de una señal inhibitoria a lo largo del CS comenzando en el sitio del entrecruzamiento y extendiéndose a sitios potenciales de entrecruzamiento estaría retrasada o menos extendida y por tanto, al estar comprometida la sinapsis, la transmisión de la señal inhibitoria también lo estaría (Sym y Roeder, 1994; Chua y Roeder, 1997).

- En las levaduras la mutación en la proteína Msh4 elimina casi totalmente la interferencia, aunque permite la formación del CS. Además, esta mutación reduce cerca de dos veces la recombinación en relación con los organismos silvestres. Debido a que existen pocos entrecruzamientos y éstos se encuentran distribuidos en forma azarosa probablemente algunos cromosomas carezcan de ellos, lo cual crea problemas con la disyunción. Así las mutaciones en Msh4 interfieren con la frecuencia y la distribución de los entrecruzamientos afectando la segregación meiótica (Khazanehdari y Borts, 2000).

Kaback y cols (1999) demostraron que existe una relación entre la interferencia y el tamaño de los cromosomas en levadura "control dependiente del tamaño". Broman y Weber (2000) empleando los datos obtenidos en sus estudios de mapeo analizaron los patrones de interferencia de entrecruzamiento en la meiosis humana; encontraron que tanto en los hombres como en las mujeres existía una interferencia positiva, sin una variación obvia entre sexos o cromosomas implicados.

Se postuló que la recombinación en *Drosophila sp.* era suprimida cerca del centrómero. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que el centrómero no es una barrera y que la interferencia se da a pesar

del centrómero sin diferencia alguna con el resto de los brazos cromosómicos (Tomado de Robinson, 1996).

El control en la frecuencia y la distribución de los entrecruzamientos puede ocurrir en varios estadios:

- Reconocimiento homólogo y apareamiento; en donde algunos rearrreglos cromosómicos pueden generar un alto porcentaje de anomalías en meiosis, ya sea, por recombinación dentro de segmentos que han sufrido un rearrreglo o incrementando la no-disyunción por un apareamiento reducido. Sin embargo, en portadores para una inversión se suprime la recombinación dentro del segmento invertido, con un incremento compensatorio en otra parte del cromosoma, sin interferir en la fertilidad (Robinson, 1996).
- En el nivel de la recombinación, al existir dos manchas calientes de recombinación, puede eliminarse el entrecruzamiento en una de ellas por competencia de factores locales (Robinson, 1996).

Las principales funciones de la interferencia son:

- Las levaduras que no tienen interferencia presentan altos porcentajes de no-disyunción, por lo que, la interferencia en meiosis es importante, ya que, al existir un número limitado de quiasmas en el genoma, ésta provee la distribución y la frecuencia de cada uno de ellos de tal forma que todos los cromosomas, incluyendo los más pequeños, tengan al menos uno (Egel, 1995; Chua y Roeder, 1997).
- La interferencia previene los niveles deletéreos de entrecruzamientos limitando el número de entrecruzamientos por célula, pues, los porcentajes altos de recombinación han sido asociados con el decremento en la "salud" de la descendencia (Robinson, 1996).

### I.1.7 DIACINESIS Y METAFASE I

Durante la diacinesis, la separación de los dos cromosomas que forman el bivalente se acentúa y se produce el fenómeno de terminalización quiasmática. Estas tétradas que hasta ahora estaban adheridas a la membrana nuclear se desasocian y comienzan su migración hacia la placa ecuatorial. Este estadio y la primera metafase meiótica son los más útiles para el estudio de la meiosis, ya que, los cromosomas están más condensados y mejor definidos (Therman y Susman, 1993).

La segregación de los cromosomas homólogos durante la transición metafase I – anafase I es la culminación de todos los eventos realizados durante la profase I. El contenido de la célula parental, el cual fue doblado por la replicación; ahora se separa (segregado) para generar células haploides en su número cromosómico, pero diploides en cuanto a su contenido de DNA (Alberts y cols, 1996).

Existen dos vías para asegurar una correcta segregación cromosómica. Una dependiente del intercambio del material genético por recombinación homóloga; segregación de cromosomas quiasmáticos y otra independiente de este intercambio denominada segregación distributiva. Esta última, "vía alterna" fue observada en hembras de *Drosophila sp.* en donde el cromosoma 4, no recombina y aún así se segrega de manera adecuada (Orr-Weaver, 1995). Dawson y cols (1986) propusieron que este tipo de segregación distributiva puede operar como un sistema de respaldo para la segregación de los cromosomas quiasmáticos.

En la segregación de los cromosomas quiasmáticos, una adecuada segregación cromosómica en MI depende del entrecruzamiento que dará origen a los quiasmas; los cuales mantienen conexiones estables entre los homólogos durante la metafase I, así las cromátidas hermanas (CH) permanecen asociadas, mientras que los cromosomas homólogos se dirigen a los polos opuestos de la célula. Se ha propuesto que la proteína Cor1/Rec8, en mamíferos y levaduras respectivamente, mantiene la cohesión y da estabilidad a los quiasmas, ya que se localiza a ambos lados de éstos. Además estas proteínas también se encuentran localizadas a nivel centromérico evitando así que los centrómeros hermanos

migren de manera independiente durante la anafase I. Es importante mencionar que estas proteínas no se encuentran en células mitóticas, siendo por tanto, meiosis específicas y características de la división reduccional que sólo se lleva a cabo en las células meióticas (Moens y Spyropoulos, 1995; Buonomo y cols, 2000).

Durante la metafase I, el huso se comienza a formar por fuera del núcleo; cerca del final de la profase I, la membrana nuclear se rompe y durante un corto estado prometafásico los bivalentes se reúnen hacia la placa ecuatorial en el punto medio del huso, el cual ahora ha sido formado entre los 2 centriolos. Ambas cromátidas de un homólogo están unidas a los microtúbulos cinetocóricos que se extienden hacia un polo de la célula, mientras que las de su homólogo se unen a los microtúbulos cinetocóricos que las llevarán hacia el polo opuesto. Los microtúbulos cinetocóricos, así, separan a los cromosomas homólogos apareados, pero no a las cromátidas hermanas. En cuanto a los centrómeros materno y paterno, estos se encuentran orientados de forma azarosa, así que no se sabe que cromosoma, materno o materno, ira a qué polo (distribución independiente) (Alberts y cols, 1996; Miller y Therman, 2001).

En la prometafase los cromosomas homólogos sólo se alinearán en la congregación metafásica estable si los microtúbulos provienen de polos opuestos. La tensión mecánica que ejercen los microtúbulos sobre los cromosomas, aunada a la resistencia del empuje creado por los quiasmas, es la señal de que los cromosomas están orientados adecuadamente. Este mecanismo funciona como un punto de control en la MI, en donde la falta de unión en un par de cromosomas puede retrasar la división en metafase I y segregar de forma incorrecta o bien detenerla (Roeder, 1997).

En el proceso de unión entre los microtúbulos y los cinetocoros existe un mecanismo denominado punto de control del huso que detecta la falla cuando algún cinetocoro no es unido a su microtúbulo y detiene la anafase hasta que este cinetocoro captura a los microtúbulos. En las levaduras una mutación en *mad2*, un componente de este sistema de resguardo, produce una mala segregación principalmente en meiosis I, incrementándose en los cromosomas grandes (Sluder y McCollum, 2000). Esto implicaría que al estar defectuoso *mad2*, la anafase empiece independiente de que los pares de homólogos sean tensionados a

polos opuestos. Shonn y cols (2000) muestran que una mutación en *mad2* es causante de una mala segregación y que ésta puede ser rescatada con la ayuda del inhibidor de la anafase, *Pds1*, que al retrasar la anafase permite una correcta segregación en meiosis I a pesar de que el punto de control *Mad2* este mutado. Por lo tanto, un retraso en la anafase I puede evitar la no disyunción en mutantes para elementos del control del huso, como *mad2*. Asimismo estos autores demuestran que la unión entre los cromosomas homólogos, se origina por la recombinación recíproca, la cual mantiene la tensión entre los cinetocoros y los microtúbulos, dando al punto de control *mad2* la señal de que los homólogos se han unido a polos opuestos. Esto fue demostrado al mutar a la proteína *spo11*, lo cual inhibe la recombinación, eliminando así la interacción entre los cromosomas homólogos originando una segregación incorrecta en MI.

### I.1.8 ANAFASE I Y TELOFASE

En la primera anafase meiótica, los centrómeros no se dividen y con dos cromátidas unidas, cada uno de los cromosomas homólogos se mueve hacia polos opuestos (Alberts y cols, 1996; Miller y Therman, 2001). Esto implica que la cohesión debe ser mantenida a través de la primera división meiótica para retrasar la segregación de las CH hasta su segregación en meiosis II. Cuando todos los bivalentes se han unido y alineado correctamente en la placa metafásica, los microtúbulos comienzan a jalar a los miembros de cada bivalente hacia los polos opuestos con sus dos cinetocoros como una única unidad funcional. Es entonces en la anafase I donde la cohesión a lo largo de los brazos de las cromátidas hermanas se libera, manteniéndose unidas sólo por sus centrómeros. Esto permite la resolución de los quiasmas y la separación de los cromosomas homólogos que continúan su migración hacia cada polo (Kohli y Hartsuiker, 2001).

La cohesión de los centrómeros entre las cromátidas hermanas a través de la meiosis I parece requerir de una proteína de cohesión fosforilada, altamente conservada evolutivamente, Rec8, que se sintetiza durante la meiosis I, desaparece hasta la anafase II y como ya se mencionó está ausente en las células mitóticas (Watanabe y Nurse, 1999; Buonomo y cols, 2000; Heemst y Heyting, 2000).

En la primera telofase meiótica el huso desaparece y hay dos grupos de cromosomas. Cada uno de ellos contiene un miembro de cada par de cromosomas homólogos con sus cromátidas hermanas firmemente unidas a nivel del centrómero. Por lo tanto, cada célula es haploide en cuanto al número cromosómico, pero diploide en su contenido de DNA. Si el entrecruzamiento ha ocurrido, las 2 cromátidas de un cromosoma no son idénticas (Alberts y cols, 1996; Miller y Therman, 2001).

### I.1.9 SEGUNDA DIVISIÓN MEIÓTICA

Después de finalizada la división meiótica I, las membranas nucleares se forman de nuevo alrededor de los dos núcleos hijos. Durante este período, los cromosomas pueden descondensarse un poco, pero normalmente se condensan de nuevo y empieza la profase II. Durante este intervalo no se produce síntesis de DNA, por lo que en algunos organismos parece que los cromosomas pasan casi directamente de una fase de división a la siguiente. En todos los organismos la profase II es breve: la envoltura nuclear se rompe cuando se forma el nuevo huso, tras lo cual proceden la metafase II, la anafase II y la telofase II. En la metafase II los cromosomas difieren de los cromosomas mitóticos, ya que, éstos se presentan con una forma irregular, siendo más cortos y presentando una amplia separación entre las cromátidas hermanas que se mantienen unidas sólo por su centrómero. A este nivel se forma un grupo de fibras cinetocóricas que se extienden en direcciones opuestas alineando a los cromosomas en la placa metafásica hasta que las cromátidas sean liberadas por la brusca separación de sus cinetocoros durante la anafase. Así, y a diferencia de la primera división, la segunda división se parece mucho a una mitosis. La única diferencia es que existe una sola copia de cada cromosoma y no dos. Una vez formadas las envolturas nucleares alrededor de los cuatro núcleos haploides producidos durante la telofase II, la meiosis ha terminado (Alberts y cols, 1996; Bickel y Orr-Weaver, 1996).

### I.1.10 REGULACIÓN DE LA MEIOSIS

En los organismos eucariontes, la integridad del genoma se mantiene por la operación de los puntos de chequeo o control del ciclo celular. Los puntos de control aseguran que los eventos del ciclo celular ocurran en el orden y de forma apropiada y funcionan promoviendo el retraso o arresto en respuesta a defectos en el proceso celular.

Estos puntos de control no están confinados a las células que se dividen mitóticamente, también operan durante la meiosis para asegurar la formación de gametos funcionales. Por lo tanto los mecanismos de regulación intrínsecos a los meiocitos aseguran que el programa de eventos necesarios se realice de manera adecuada. Estos factores intrínsecos también responden a factores extrínsecos que se originan en el ambiente de los meiocitos. En los organismos multicelulares estos factores extrínsecos pueden ser generados por las células somáticas asociadas con los meiocitos o pueden ser hormonas liberadas desde células lejanas a las gónadas (Kohli y Hartsuiker, 2001).

En particular, en la meiosis, existe un punto de control que previene la salida de paquitene cuando la recombinación y la sinapsis no son completadas. Este punto de control de paquitene también se conoce como el control meiótico de la recombinación. La forma en que opera este punto de control ha sido estudiada en *S. cerevisiae*, muchas de las proteínas de levadura que participa en este punto de control tienen homólogos en otros organismos, incluyendo a los mamíferos. La identificación de las proteínas implicadas en el control de paquitene en las levaduras se ha hecho principalmente con mutantes que presentan arresto en paquitene (Roeder y Bailis, 2000). En la tabla 4 se muestran las proteínas de *S. cerevisiae* implicadas en el punto de control de paquitene y sus homólogos en otros organismos, incluyendo a los mamíferos.

Tabla 4. Proteínas implicadas en el punto de control de paquitene en *S. cerevisiae* y sus homólogos en otros organismos (Modificado de Haber, 2000; Heemst y Heyting, 2000; Bishop, 2001; Kohli y Hartsuiker, 2001).

<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>	Mamíferos	Función en <i>S. cerevisiae</i>
<b>Proteínas de chequeo de daño al DNA</b>					
Ddc1	Rad9				Sensor de daño al DNA; forma complejos con Mec3 y Rad17
Chk1	Chk1			Chk1	Protein cinasa implicada en transducción de señales
Mec1	Rad3	Mei-41		Atr/Atm	Cinasa lipídica / proteica
Mec3	Hus1			Hus1	Sensor de daño al DNA; forma complejos con Rad17 y Ddc1
Rad17	Rad1		Mrt-2	Rad1	Exonucleasa putativa; forma complejos con Mec1 y Ddc1
Rad24	Rad17	Rad17	Hpr-17	Rad17	Homología con el ancla de la abrazadera de la DNA pol
<b>Proteínas de los cromosomas meióticos</b>					
Hop1			Hlm-3		Asociada con núcleos cromosómicos meióticos; requerida para sinapsis
Hop2					Previene sinapsis entre cromosomas no-homólogos
Mek1					Protein-cinasa meiosis específica que fosforila a Rad1
Red1					Parte esencial en la construcción de los núcleos cromosómicos meióticos
Zip1					Componente principal en la construcción de la región central del CS
<b>Proteínas implicadas en la recombinación genética</b>					
Dmc1		Spn-B	Rad-51	Dmc1	Homóloga de RecA, específica de meiosis
Mlh1				Mlh1	Homóloga a MutL, implicada en MMR
Msh5				Msh5	Homóloga de MutS, requerida para un nivel normal de entrecruzamientos
Rad51	Rhp51		Rad-51	Rad51	Homóloga a RecA; enzima implicada en el intercambio de cadenas
Rad54	Rhp54	Okp		Rad54	Homóloga helicasa; facilita intercambio de cadenas promovido por Rad51
<b>Factores silenciadores de la cromatina</b>					
Sir2					Factor silenciador de cromatina; protein-deacetilasa
Pch2					Proteína nucleolar; reprime la recombinación meiótica en DNAR
Dot1					Reprime la transcripción de secuencias de DNA proximales-teloméricas
<b>Proteínas del ciclo celular</b>					
Cdc28	Cdc2		Ncc-1	Cdc2	Protein-cinasa dependiente de ciclina
Cib1					Ciclina específica G2/M
Glc7					Protein-fosfatasa tipo I
Ndt80					Factor de transcripción específico de meiosis
Swe1	Wee1	Wee1	Wee-1	Wee1	Protein-cinasa que fosforila e inactiva a Cdc28

\* Los genomas de los eucariontes superiores contienen múltiples genes que codifican para protein-fosfatasa tipo I y para varias ciclinas, sin embargo se desconoce cuál corresponde al homólogo funcional de Glc7 y de Cib1 respectivamente.

Los puntos de control de paquitene incluyen un mecanismo eficiente de detección de daño al DNA, el cual incluye a las rupturas de doble cadena que inician la recombinación, asegurando el tiempo necesario para su reparación. La activación del punto de control debe incluir una molécula detectora que reconozca el DNA dañado, una cascada de señalización que amplifique y transmita esta información y moléculas efectoras que interaccionen con los componentes del ciclo celular. En los mamíferos, dos proteínas ATR y ATM, parecen tener una función importante en la detección de DNA dañado, tanto en las células mitóticas como en las meióticas. Estudios con anticuerpos han permitido localizar a la proteína ATR en sitios a lo largo de los ejes de los cromosomas no apareados o asinápticos, mientras que ATM se encuentra a lo largo de los ejes sinápticos. Estos sitios corresponden a los sitios de unión de RAD51 tanto en los espermatoцитos como en los ovocitos. La disrupción dirigida del gen ATM en los ratones transgénicos conduce a una sinapsis anormal y a la fragmentación cromosómica, que causa arresto en zigotene/paquitene. Esto indica lo crítico que es el chequeo de daño al DNA. La molécula efectora tanto en mitosis como meiosis es la proteína p53. En las células somáticas la presencia de DSB induce niveles elevados de p53 que conducen a arresto del ciclo celular y/o apoptosis. Los espermatoцитos en paquitene también muestran niveles altos de p53, presumiblemente en respuesta a las DSB generadas durante la recombinación. La proteína p53 actúa por unión directa con la proteína RAD51; esta vía de reparación está tan altamente conservada evolutivamente que la proteína p53 humana puede unirse a la proteína RecA, el homólogo bacteriano de RAD51 (Tomado de Miller y Therman, 2001).

Además del punto de control de paquitene, existen otros puntos de chequeo en diferentes puntos de la meiosis. Un punto de control en la replicación premeiótica ha sido descrito tanto en las levaduras de fisión como en las de gemación. La activación de este control requiere de la iniciación de la replicación, en forma análoga al control de paquitene que requiere del inicio de la recombinación para ser activado. En *S. pombe* existe un control adicional mediado por *Rad9* que arresta a la célula después de la replicación, pero antes de la recombinación y la sinapsis si hay daño al DNA (Roeder y Bailis, 2000).

Los puntos de chequeo también operan en la metafase I. Aquí se bloquea la transición metafase-anafase si la formación del huso es defectuosa o si uno o más cromosomas no se encuentran correctamente

alineados en él. La orientación correcta de los cromosomas en el huso resulta en tensión, debido a que los cromosomas homólogos son jalados hacia los polos opuestos del huso, pero esta fuerza se resiste por los quiasmas que mantienen a los homólogos unidos. Si un solo cromosoma no se encuentra bajo esta tensión, emite una señal que previene la transición metafase-anafase; al parecer esta señal está dada por la fosforilación específica de una proteína asociada al cinetocoro del cromosoma no alineado (Roeder y Ballis, 2000).

Una curiosidad biológica interesante es el hecho de que el punto de control que detecta a los cromosomas mal alineados, en los mamíferos opera únicamente en los machos. En los ratones que portan un cromosoma que carece de su contraparte para aparear, los espermatozoides son arrestados en metafase I, mientras que en los ovocitos continúa la meiosis. Se ha sugerido que la falta del punto de chequeo en metafase provee una explicación para el elevado rango de segregaciones cromosómicas anormales de meiosis I observado en las mujeres (Roeder y Ballis, 2000; Miller y Therman, 2001). Un cuestionamiento que surge, es si esta diferencia está relacionada con la estructura del huso meiótico. En mitosis, el centrosoma de cada polo del huso se organiza alrededor de un centriolo. En meiosis, el centrosoma carece de centriolo. En la primera división después de la fusión del espermatozoide y el óvulo, al menos uno de los dos centrosomas parece tener un centriolo, el cual es de origen paterno. La ausencia de centriolo podría reflejar los cambios moleculares que contribuyen a la elevada frecuencia de no-disyunción en la meiosis femenina (Tomado de Miller y Therman, 2001).

## I.2 GAMETOGÉNESIS HUMANA

La proliferación de las células germinales ocurre tanto durante el desarrollo gonadal femenino como masculino. Algunas de las células se diferencian como meiocitos, mientras que otras entran a un programa de muerte celular por apoptosis. Esto puede ser un mecanismo adicional de vigilancia para eliminar las células que no sean aptas para llevar a cabo la meiosis. Los meiocitos primarios son rodeados por capas de células somáticas diferenciadas, específicamente por capas múltiples de células de la granulosa en las gónadas femeninas y por las células de Sertoli en las masculinas. El intercambio de señales entre estas células somáticas y las células germinales es esencial para la formación de los gametos (Figura 4) (Kohli y Hartsuiker, 2001).

En la mujer, un número establecido de meiocitos primarios se forma, la meiosis se inicia el quinto mes de la vida intrauterina y se precede por aproximadamente 33 divisiones mitóticas; sin embargo se arresta en el estadio de dictiotene que sólo se presenta en las mujeres entre los estadios diplotene y diácinesis. El mantenimiento de este arresto requiere de mecanismos rigurosos de control. Cuando los folículos primarios son activados, el citoplasma entra en una fase de crecimiento y diferenciación; lo cual conduce a la acumulación de macromoléculas que serán requeridas para las divisiones celulares posteriores a la fertilización. Un mecanismo propuesto para la liberación del arresto en la profase I implica una reducción en la concentración del adenosín monofosfato cíclico ( $AMP_c$ ). La activación del factor promotor de la mitosis (MPF, formado por el complejo ciclina B- CDK1) permite que se complete la primera división meiótica, la cual es seguida de un segundo arresto en la metafase II hasta la fertilización. Este segundo arresto se lleva a cabo por un factor citostático, el producto del gen *c-MOS*, mejor conocido por su función como un proto-oncogen. Esta protein-cinasa activa y estabiliza al factor promotor de la mitosis. La fertilización dispara un incremento en la concentración de calcio intracelular, activando a una proteasa dependiente de calcio, la calpaina, la cual degrada a la proteína *c-MOS* e induce la destrucción de la ciclina B, inactivando al MPF, justo en la transición metafase-anafase. Lo cual culmina con la liberación del segundo cuerpo polar, finalizando la meiosis y dando lugar al inicio de las divisiones mitóticas y la embriogénesis (Miller y Therman, 2001; Kohli y Hartsuiker, 2001).

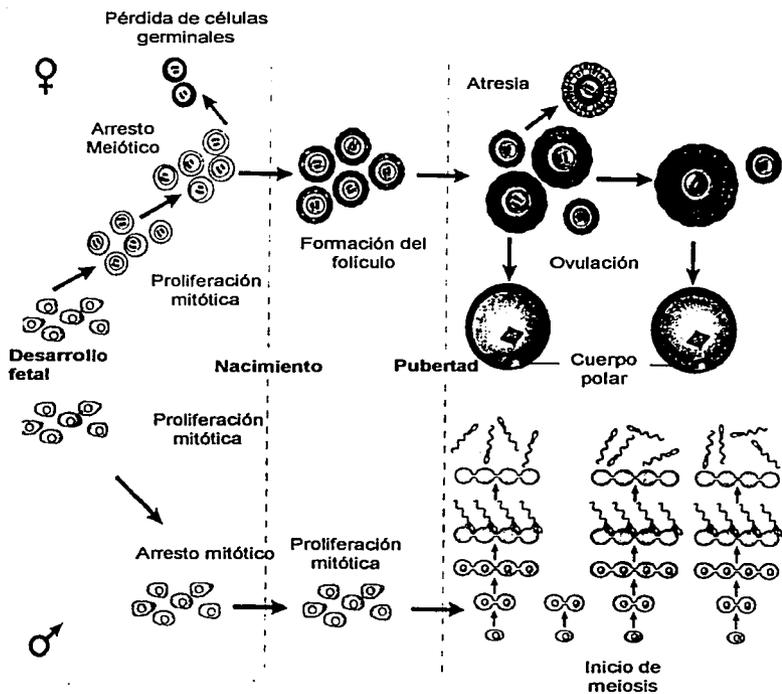


Figura 4. Esquema de la gametogénesis humana (Tomada de Hassold y Hunt, 2001).

La apoptosis es el destino de la mayoría de las células germinales femeninas. Este mecanismo reduce su número de aproximadamente 8 millones al inicio de la meiosis a 1 o 2 millones al nacimiento. Durante cada ciclo mensual de ovulación, un número determinado de ovocitos parcialmente maduros muere por apoptosis en los folículos. El producto del gen *P53*, está implicado en la apoptosis de los ovocitos; al igual que el producto del gen *BAX*, un miembro de la familia *BCL2*, cuya expresión está elevada durante la apoptosis en el ovario (Miller y Therman, 2001).

En el hombre, las espermatogonias, que han estado inertes en los túbulos seminíferos de los testículos desde el periodo fetal empiezan a proliferar por los estímulos hormonales en la pubertad. Esta división continúa durante toda la vida adulta, permitiendo una producción constante de un gran número de espermatocitos, los cuales completan la meiosis ininterrumpidamente. Tras varias divisiones mitóticas, algunas células hijas dejan de proliferar y se diferencian a espermatocitos primarios; células germinales de mayor tamaño que siguen localizándose en los túbulos. Cada espermatocito primario comienza su primera profase meiótica, en la cual aparecen los cromosomas homólogos y participan en la recombinación. A partir de la primera división se obtienen dos espermatocitos secundarios, haploides que tienen aproximadamente la mitad del tamaño de los espermatocitos primarios y presentan cada uno, 22 cromosomas autosómicos duplicados y ya sea un cromosoma X duplicado, o un Y. Posteriormente los espermatocitos secundarios llevan a cabo la segunda división para dar lugar a cuatro espermátidas haploides con cromosomas autosómicos únicos y con un solo cromosoma sexual, X o Y. Las espermátidas se transforman de manera gradual en cuatro espermatozoides maduros a través de un proceso de diferenciación conocido como espermiogénesis. La espermatogénesis requiere de aproximadamente 64 días para terminar (Alberts y cols, 1996; Kohli y Hartsuiker, 2001).

Las células germinales masculinas no completan la división citoplasmática (citocinesis) durante las divisiones mitóticas y meióticas. En consecuencia, las células hijas diferenciadas descendientes de una espermatogonia madura permanecen conectadas por puentes citoplasmáticos, formando un sincisio. Estos puentes citoplasmáticos persisten hasta el final de la diferenciación de los espermatozoides,

cuando son liberados al lumen del túbulo. Esto explica porque los espermatozoides maduros surgen sincrónicamente en cualquier área de un túbulo seminífero (Alberts y cols, 1996).

Una diferencia significativa entre la meiosis femenina y la masculina en mamíferos es la presencia de los cromosomas sexuales, X y Y. El apareamiento de estos cromosomas parece ser necesario para completar la meiosis y la formación de esperma, de igual manera que el apareamiento correcto de los autosomas. La existencia de recombinación entre cada par cromosómico lleva a la formación de los quiasmas, únicamente uno entre el X y el Y, para asegurar una segregación correcta. El control de la meiosis masculina sobre la formación de los quiasmas y el alineamiento correcto de los pares de homólogos es sumamente estricto y la meiosis se interrumpe por la presencia de cromosomas aquiasmáticos (Miller y Therman, 2001; Roeder y Bailis, 2000).

### I.3 COMPORTAMIENTO DE LOS CROMOSOMAS X-Y DURANTE LA MEIOSIS.

En las mujeres que comparten dos cromosomas X, no existe problema con el apareamiento y la recombinación de los cromosomas sexuales durante la primera profase meiótica; ya que, son equivalentes en su tamaño y el contenido génico, comportándose de la misma manera que los autosomas. No es el caso de los individuos masculinos que presentan un X y un Y con diferencias en su tamaño y contenido génico (Rappold, 1993).

Los cromosomas X y Y aparecen heteropicnóticos desde zigotene hasta diplotene. En la transición de zigotene a paquitene, en el humano y en la mayoría de los mamíferos, el par X-Y es transcripcionalmente inactivo y presenta una configuración de cromatina condensada conocida como cuerpo XY o vesícula sexual (Solari, 1974). El cuerpo XY posee varias características únicas como: a) la cromatina de los cromosomas sexuales muestra diferencias en su patrón de condensación, con un comportamiento aloclíclico, b) la recombinación está restringida a las regiones pseudoautosómicas y c) el cuerpo XY es transcripcionalmente inactivo (Tomado de Smith y Benavente, 1995).

Mckee y Handel (1993) proponen que la inactivación de los cromosomas sexuales en la meiosis masculina, (*meiotic sex chromosome inactivation*, MSCI) es una adaptación meiótica para prevenir los eventos de recombinación ilegítimos que dañen las regiones diferenciales de los cromosomas X-Y.

Los mecanismos moleculares que controlan la formación del cuerpo XY aún se desconocen. Sin embargo, investigaciones recientes permiten sugerir que su formación no es una propiedad intrínseca de los cromosomas sexuales, y que puede ser controlada en *trans* por factores originados a partir de los autosomas o aún por eventos que ocurren fuera de las células meióticas (Tomado de Smith y Benavente, 1995). Los mecanismos implicados en la formación del cuerpo XY parecen ser diferentes de aquéllos que controlan la inactivación del cromosoma X en las células somáticas de las hembras de mamíferos. En contraste con la situación presente en los tejidos femeninos, la expresión del gen *Xist* (*X-inactive specific transcript*, transcrito específico del cromosoma X inactivo) en testículo de ratón es muy baja y no

correlaciona temporalmente con la formación del cuerpo XY (Richler y cols, 1992; Salido y cols, 1992; Mc Carrey y Dilworth, 1992). La inactivación del X en los espermatocitos no implica tampoco la desacetilación de la histona H4 ni la metilación de las islas CpG (Armstrong y cols, 1997).

Estudios recientes han permitido identificar algunas proteínas específicas del cuerpo XY. La proteína XY40 (Smith y Benavente, 1992) y la proteína XY77 (Kralewski y cols, 1997) están asociadas con los ejes de los cromosomas sexuales pero no se encuentran en las asas de cromatina y quizá estén implicadas en enmascarar a los cromosomas X-Y, aunque no se encuentran en el inicio del proceso de la inactivación. Por otra parte, la proteína p51 está distribuida a través del cuerpo XY y en los centrómeros de los autosomas, lo que sugiere tenga una función en el bloqueo de los eventos de transcripción y recombinación durante la gametogénesis (Smith y Benavente, 1995).

Una cuarta proteína llamada XMR (*Xlr-related meiosis regulated*) se expresa específicamente en los espermatocitos primarios, con un patrón espacial y temporal muy similar al de la condensación de los cromosomas sexuales. Notablemente, esta proteína se concentra exclusivamente en el cuerpo XY y está ausente de las regiones en donde hay recombinación, por lo que se sugiere está relacionada directamente con las regiones de cromatina condensada y transcripcionalmente inactivas, lo que la hace un candidato ideal en el proceso de condensación y MSCI (Escalier y Garchon, 2000).

Turner y cols (2000) describieron otra proteína asociada con los cromosomas sexuales durante la meiosis masculina, la proteína ASY o proteína asináptica. Esta molécula no tiene relación con la MSCI, pero parecería ser específica de la cromatina asináptica de las regiones no homólogas X-Y y tener una función en el punto de control de paquitene. La presencia de esta proteína en el cuerpo XY parecería evitar la activación en paquitene tardío del punto de chequeo que remueve las células que presentan sinapsis incompleta a través de una vía apoptótica independiente de p53.

Así mismo, Turner y cols (2000) proponen que debido a que la MSCI inicia antes de entrar a la profase meiótica y por lo tanto, antes de la búsqueda de homología; el cuerpo XY enmascara las regiones no

homólogas de los cromosomas sexuales originando una asinapsis entre ellos y disparando a su vez la sinapsis de los demás cromosomas, actuando como un punto de control de la sinapsis.

Después de la formación del cuerpo XY, en diplotene, los cromosomas sexuales ya no muestran la conducta MSC1 y durante diplotene-metafase I, el cuerpo XY presenta una estructura asimétrica, dada por el apareamiento extremo con extremo de sus brazos cortos. Este comportamiento se origina por la recombinación y la formación de un quiasma en la región homóloga de los brazos cortos de los cromosomas X y Y, denominada región pseudoautosómica (PAR). Estas regiones reciben este nombre debido a que aparecen y recombinan al igual que los autosomas (Rappold, 1993).

Regiones pseudoautosómicas (PARs).

En los cromosomas sexuales humanos las regiones pseudoautosómicas han sido bien establecidas y se localizan tanto en los brazos cortos como en los brazos largos de ambos cromosomas (Figura 5) (Rappold, 1993). A continuación se describen las principales características de estas regiones:

La Región Pseudoautosómica de los brazos cortos, *PAR1*:

- Se localiza en el extremo distal del brazo corto del cromosoma X, en la banda Xp22.3 y en el extremo distal del brazo corto del cromosoma Y, en la banda Yp11.32 abarcando 2.6 Mb. Dentro del cromosoma Y, las 2.6 Mb representan de 3% a 5% de todo el cromosoma y solo el 1.6% del cromosoma X (Rappold, 1993).
- La *PAR1* contiene 8 genes activos (*PGPL*, *SHOX*, *CSF2RA*, *IL3RA*, *ANT3*, *ASMT*, *XET* Y *MIC2*) y la región 5' de un noveno (*XGA*). Estos genes escapan al proceso de inactivación del cromosoma X de las células somáticas femeninas (Graves y cols, 1998).
- Dentro de la *PAR1* se da un intercambio obligatorio durante el proceso meiótico. El entrecruzamiento en la *PAR1* es funcionalmente importante, ya que, genera el quiasma único que se requiere para mantener a los cromosomas sexuales unidos durante la primera metafase de meiosis (McKee y Handel, 1993).

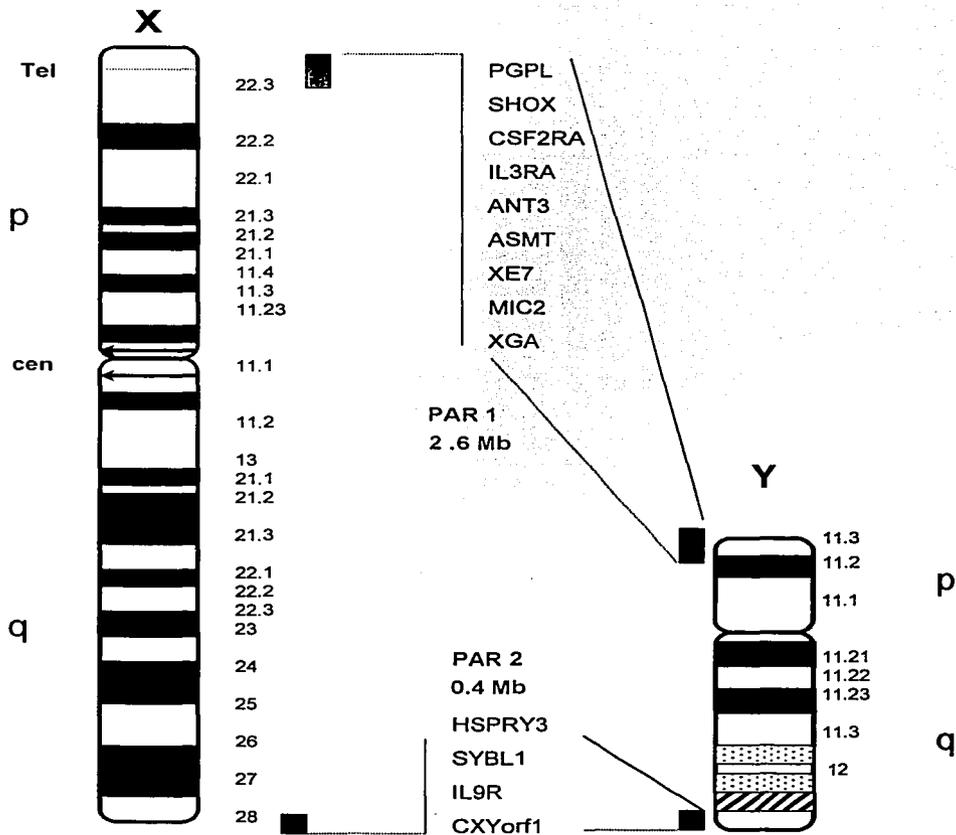


Figura 5. Regiones pseudoautosómicas de los cromosomas sexuales. PAR1 en Xp y Yp y PAR 2 en Xq y Yq. (Modificado de Rappold, 1993; Graves y cols, 1998; Ciccodicola y cols, 2000).

- Cuando los cromosomas X y Y se encuentran unidos sólo en la *PAR1* la estructura observada a nivel citogenético representa una estructura lineal, una cadena, a diferencia de los autosomas que muestran figuras en anillo (Miller y Therman, 2001).
- Los límites entre la *PAR1* y la región sexo específica se denominan *PABX / PABY (pseudoautosomal boundary)* y son definidos como los límites proximales de la recombinación en la *PAR1*. En el hombre, el límite pseudoautosómico Xp/Yp está marcado por repeticiones Alu, seguidas por una región de 220pb que presenta homología detectable. Las secuencias proximales siguientes son no homólogas y son sexo específicas. En el límite distal de la *PAR1* se encuentra localizado el telómero (Rappold, 1993). Kvaloy y cols (1994) ha sugerido que las secuencias Alu que se encuentran en el límite de la *PAR1* presentan homología, pero a pesar de ello son lo suficientemente diferentes para impedir algún tipo de intercambio, por lo que, se ha sugerido que actúan como una barrera para el intercambio homólogo.

#### La región pseudoautosómica de brazos largos, *PAR2*:

- Es más pequeña que la *PAR1*, y se localiza en los extremos distales de los brazos largos Xq/Yq y abarca 320 kb (Graves y cols, 1998).
- En la *PAR2* sólo se conocen 4 genes: *HSPRY3*, *SYBL1*, *IL9R* y *CXYorf1*. Los dos primeros muestran un patrón de inactivación único, inactivándose tanto en el cromosoma X de las mujeres como en el cromosoma Y. Los dos últimos presentan un patrón similar al de los genes de la *PAR1*, escapando a la inactivación del cromosoma X (Graves y cols, 1998; Ciccodicola y cols, 2000).
- La frecuencia de recombinación dentro de la *PAR2* se eleva en la meiosis masculina comparada con un DNA autosómico típico. Sin embargo, parece probable que el intercambio no sea necesario, ni suficiente, para una meiosis masculina exitosa, ya que, no puede substituir el intercambio llevado a cabo en la *PAR1*. Kvaloy y cols (1994) proponen que al nivel de la *PAR2* se lleven a cabo eventos de recombinación que son resueltos como conversiones génicas y por ende, carezcan de quiasmas.
- Cuando los cromosomas X y Y se encuentran unidos en ambas PAR presentan la forma de un anillo, pues, se encuentran unidos en ambos extremos; sin embargo, esta última situación es poco común (Speed y Chandley, 1990).

- El límite proximal de la *PAR2* está marcado por repeticiones de tipo LINE, seguidas por una región que no presenta homología detectable (Kvaloy y cols, 1994).

Durante la profase meiótica se da el apareamiento, sinapsis y la formación del CS entre los cromosomas homólogos. En los cromosomas sexuales, el inicio del apareamiento y el entrecruzamiento obligatorio se llevan a cabo en la *PAR1*, y de manera ocasional en la *PAR2* (Rappold, 1993).

Burgoyne (1982) hipotetizó que el apareamiento entre los cromosomas X y Y era un pre-requisito para completar la meiosis masculina. Así en humanos, los individuos masculinos que no presentan apareamiento X-Y son estériles. Una frecuencia de recombinación reducida conduce a una segregación incorrecta y a individuos aneuploides, 47,XXX o 47,XXY (Hassold y cols, 1991). En los individuos con síndrome de Klinefelter (47,XXY), los túbulos seminíferos atrofiados contienen sólo células de Sertoli conduciendo a esterilidad. Sin embargo, la mayoría de los individuos masculinos con 47,XXY son fértiles. Estudios realizados en biopsias de testículo sugieren que el cromosoma Y extra se pierde en la línea germinal durante estadios meióticos tempranos. Sin embargo, algunas células XYY entran a meiosis mostrando un X no apareado y un bivalente YY (Speed y Chandley, 1990). Estudios con FISH han revelado una incidencia de espermatozoides YY de 1% y espermatozoides XY de 0.3% en estos individuos, la cual es considerablemente mayor que la observada en sujetos normales (Blanco y cols, 1997).

Ocasionalmente el entrecruzamiento obligatorio X-Y ocurre fuera de la *PAR1* (recombinación ilegítima); en este caso, el factor determinante del testículo (*SRY*), el cual se localiza a sólo 5 kb proximal al límite de la región pseudoautosómica, *PABY*, puede ser transferido al cromosoma X. Este evento de entrecruzamiento ilegítimo resulta en individuos 46,XX quienes muestran un fenotipo masculino, varones XX (Page y cols, 1985; Petit y cols, 1987). El producto recíproco es un cromosoma Y que carece del gen *SRY*, tal como se encuentra en algunas mujeres con disgenesia gonadal pura XY (Levilliers y cols, 1989).

En un hombre infértil con una deleción en los brazos cortos de su cromosoma X (ausencia de *PAR1*) la espermatogénesis fue arrestada en estado de espermatozoides primario y los cromosomas sexuales no

aparearon; éste resultado implica que aunque hay homología y secuencias de intercambio en los telómeros de los brazos largos, estos no pueden substituir la actividad de la *PAR1* que conducen a la formación del quiasma funcional entre los cromosomas sexuales que es necesario para completar exitosamente la meiosis (Mohandas y cols, 1992).

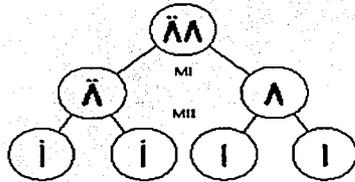
El comportamiento adecuado de los cromosomas sexuales y autosómicos, aunado a eficientes puntos de control y exacto desarrollo de los elementos que conforman el proceso meiótico permiten la culminación exitosa del ciclo. Sin embargo, en raras ocasiones puede existir alguna falla que origine la inviabilidad de las células o bien la formación de gametos aneuploides.

## 1.4 ANEUPLOIDÍA EN ESPERMATOGÉNESIS

La aneuploidía se define como la pérdida o ganancia de cromosomas individuales y es el resultado de una segregación cromosómica incorrecta que puede ocurrir tanto en meiosis como en mitosis. Cuando falla la segregación de los dos homólogos en la anafase I de la meiosis, ambos homólogos se puede ir hacia un mismo polo, mientras el polo opuesto queda privado de cualquiera de los dos; esto es la no disyunción en la MI. De forma análoga, cuando dos cromátidas hermanas no se separan en la anafase de la MII, se denomina no disyunción de la división II (Figura 6). Así, la no-disyunción se refiere a cualquier proceso que causa que 2 cromosomas se dirijan a un mismo polo cuando ellos deberían segregar a polos opuestos. En todos los casos el resultado de una no-disyunción es la producción de aneuploidía (Miller y Therman, 2001).

Típicamente, tales errores son referidos como no-disyunción; sin embargo, existen varios mecanismos que originan una segregación incorrecta. Las fallas para resolver los quiasmas entre los cromosomas homólogos en la anafase I resultan en una verdadera no-disyunción, donde ambos homólogos segregan juntos. Además, la resolución prematura de los quiasmas o la falla para establecerlos entre un par de cromosomas homólogos puede resultar en la segregación independiente de los homólogos en la MI, lo cual conduce a un error si ambos cromosomas segregan hacia el mismo polo en el huso de la MI. Finalmente un error en la meiosis I puede también implicar la segregación de cromátidas hermanas en lugar de la de cromosomas homólogos, esto ocurriría por una separación prematura de las cromátidas hermanas en la primera división (pérdida de la cohesión), resultando en la segregación de un cromosoma completo y una cromátida sencilla hacia un polo y la cromátida restante hacia el polo opuesto (Figura 7). Por otro lado, como ya se mencionó los errores que originan una no-disyunción en MII llevan a una falla en la separación de las cromátidas hermanas (Hassold y Hunt, 2001).

Los eventos que pueden originar una no-disyunción se pueden observar en la tabla 5. Sin embargo, dentro de esta gama de defectos el de mayor interés para el presente trabajo está relacionado con la



Segregación meiótica normal

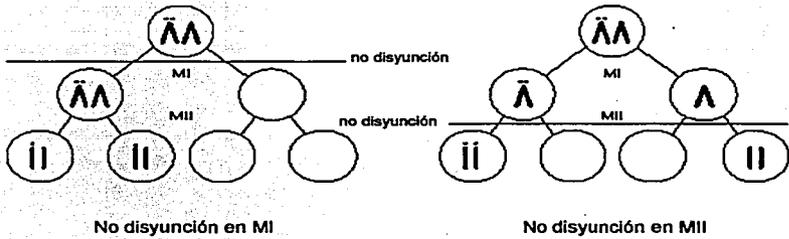
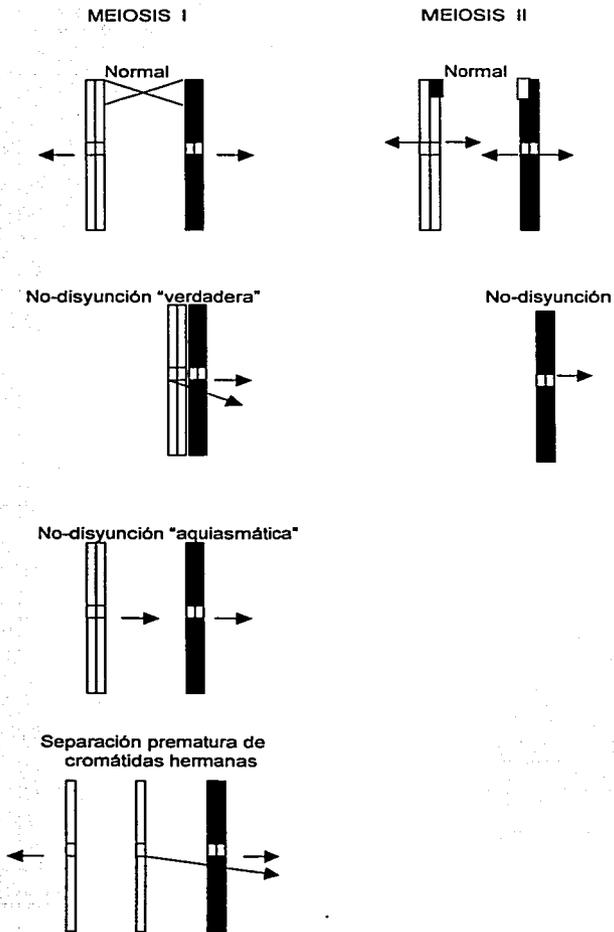


Figura 6. Meiosis normal y no disyunción en MI y MII (Modificado de Moore y Best, 2001)



**Figura 7. Posibles mecanismos que originan una segregación incorrecta durante meiosis (Tomado de Hassold y Hunt, 2001).**

recombinación y con la formación y estabilidad de los quiasmas que aseguran una correcta disyunción en el proceso meiótico.

Tabla 5. Relación entre los principales eventos meióticos y el resultado de sus errores (Modificada de Miller y Therman, 2001).

ESTADO	EVENTOS MEIÓTICOS	RESULTADO DEL EVENTO MEIÓTICO TRUNCADO
Leptotene	Los cromosomas llegan a ser visibles; los elementos laterales comienzan a formarse	Degeneración de las células germinales; algunas veces no-disyunción
Zigotene	Los cromosomas forman el bouquet; cada uno de los pares cromosómicos con sus elementos laterales; inicia sinapsis	Degeneración de las células germinales; algunas veces no-disyunción.
Paquíotene temprano	CS totalmente formado; Nódulos de recombinación tempranos en el elemento central	Ausencia de entrecruzamiento los cromosomas permanecen como univalentes.
Paquíotene tardío	Entrecruzamiento; nódulos de recombinación tardíos	Debido a la ausencia de los quiasmas lo que debería ser bivalente es univalente.
Diplootene	Los homólogos se repelen uno del otro hasta que son mantenidos juntos sólo por los quiasma	Univalentes más visibles que en los estados tempranos
Metafase I, Anafase I, Metafase II, Anafase II.	Una ordenada segregación de los cromosomas es un pre-requisito para una correcta gametogénesis	Los univalentes pueden sufrir no-disyunción, pérdida, división incorrecta, separación prematura de las cromátidas hermanas; las anomalías del huso interfieren con la segregación cromosómica.

Como se ha mencionado anteriormente una correcta segregación en la meiosis I se asegura por los eventos de recombinación que dan origen a un entrecruzamiento y culminan con la formación de un quiasma (Koehler y cols, 1996). Sin embargo, existen factores adicionales que aseguran la disyunción, como son los elementos que brindan la cohesión, la cual se presenta en las regiones proximales a los entrecruzamientos y esencialmente a nivel centromérico (Bickel y Orr-Weaver, 1996).

Además, existe una importancia funcional de la posición de los quiasmas; de esta manera, los intercambios que darán origen a los quiasmas no son suficientes para una correcta segregación y para algunos cromosomas una posición específica es relevante. Esta posición se relaciona con un balance

entre una unión correcta del bivalente y una adecuada resolución del quiasma y de sus elementos adjuntos, tales como la cohesión (Koehler y cols, 1996).

Los intercambios pueden encontrarse en la región proximal, media o distal; generalmente los intercambios que aseguran una correcta disyunción presentan una posición entre los telómeros y centrómeros, es decir entre una posición proximal-media. Esta posición, además de la relación con la eucromatina, se relaciona también con la resolución de los intercambios, ya que, se propone que los intercambios muy distales son enlazados por poco material cromosómico y que la resolución del quiasma cuando se inicia la liberación de las CH resulta en una separación precoz de los centrómeros homólogos y por otra parte, los quiasmas muy proximales (pericentroméricos) también podrían estar relacionados con una unión tan estrecha que impediría la resolución del bivalente. A los bivalentes que presentan posiciones muy distales o proximales se les ha denominado configuración quiasmática susceptible a no-disyunción (Koehler y cols, 1996; Lamb y cols, 1997; Hassold y cols, 2000).

La no-disyunción en humanos se ha estudiado principalmente en los productos trisómicos. Es la anomalía cromosómica más común y se presenta en al menos 0.3% de todos los recién nacidos vivos. Las aneuploidías vistas al nacimiento están restringidas a los cromosomas sexuales y a las trisomías de los cromosomas 13, 18 y 21. En abortos espontáneos la aneuploidía se presenta en un porcentaje mayor que corresponde al 35% (Koehler y cols, 1996). Se ha sugerido que 5% de todas las concepciones son aneuploides (Hassold y Hunt, 2001).

Los principales estudios para investigar las causas que originan las aneuploidías se han llevado a cabo en pacientes con trisomía 21. Se ha observado que predominan los errores en la meiosis materna en un 90% de todos los casos. De este 90%, aproximadamente el 70% son errores originados en la MI y el 25% en la MII. El porcentaje restante se divide en las trisomías de origen paterno, con un error principalmente en la MII y aparentemente 5% se deben a no-disyunción mitótica. Las otras trisomías que se han estudiado muestran un origen variable (Koehler y cols, 1996; Savage y cols, 2000). (Tabla 6).

Tabla 6. Origen de la no-disyunción en las aneuploidías humanas (Modificado de Hassold y cols, 2000; Miller y Therman, 2001; Hassold y Hunt, 2001).

Cariotipo	Paterna		Materna		Post-cigótica	Recombinación
	MI	MII	MI	MII		
Trisomía 2	28	-	54	13	6	
Trisomía 13		12	60	28	-	Reducida
Trisomía 16		0	100	-	-	Reducida Quiasmas distales
Trisomía 18		3	26	59	12	Reducida Quiasmas proximales
Trisomía 21	3	5	65	23	3	Reducida y quiasmas distales en MI Incremento y quiasmas proximales en MII
Trisomía 22	3	-	94	3	-	Reducida
45,X		80		20		
47,XXX	-	6	60	16	18	Reducida o incremento en región pericentromérica en MI
47,XXY	46	-	38	14	3	Reducida 2/3 par XY aquíasmático en MI paterna

Como se observa en la tabla anterior los errores en la segregación meiótica son más frecuentes en la meiosis femenina, que en la masculina. Esto puede estar relacionado con el hecho de que, a diferencia de los espermatozoides y las células de levadura, la mayoría de los ovocitos se arrestan en un punto de la MI o MII. La falta de un punto de chequeo en metafase durante la meiosis I de los ovocitos puede ser la causa de la elevada frecuencia de errores meióticos en la ovogénesis comparados con los ocurridos durante la espermatogénesis.

Las trisomías originadas en la MI materna presentan una marcada reducción en la recombinación. Sin embargo, esta reducción no se presenta de manera azarosa. Por ejemplo, en los cromosomas 16 y 21 la recombinación distal es normal, restringiendo la reducción en la recombinación a las regiones proximales. De esta forma, puede ser que al menos para las trisomías autosómicas maternas de la MI, la ausencia de quiasmas en la región proximal incrementa el riesgo de no-disyunción, pues, si los intercambios fueran sólo distales aumentaría la probabilidad de una separación prematura debido a falta de cohesión centromérica en el bivalente durante la anafase I (Lamb y cols, 1997; Hassold y cols, 2000). A pesar de que los eventos relacionados con la recombinación se presentan en la MI, éstos pueden estar relacionados con los errores a nivel de la MII. En la MII, al contrario de la MI, las fallas se relacionan con un incremento en la recombinación, afectando también su distribución, ya que, en comparación con la MII

normal, ésta se presenta con mayor frecuencia en las regiones proximales (Lamb y cols, 1997; Hassold y cols, 2000).

Cuando en la MI ocurre una recombinación defectuosa, la segregación es incorrecta desde la MI y afecta por lo tanto a la MII. Quizá los quiasmas proximales predispongan a un super-enlazamiento en la MI que evita que se separe el bivalente pasando intacto hacia la placa metafásica II. En la segunda división el bivalente se divide reduccionalmente, resultando en un gameto disómico. El resultado será un gameto con un cromosoma adicional que presentará dos centrómeros idénticos siendo monitoreado como un error ocurrido en la MII, aunque en realidad, el origen de la anomalía fue en la MI (Figura 7). Esto implica que los errores en la MII pueden ser muy raros en los humanos (Koehler y cols, 1996; Hassold y cols, 2000).

Estudios con FISH en esperma humano para detectar aneuploidías de un grupo de cromosomas autosómicos: 1, 2, 4, 9, 12, 15, 16, 18, 20, 21 y de los cromosomas sexuales mostraron que a pesar de que todos los cromosomas presentaron predisposición a la no-disyunción, la frecuencia de ésta varía a través de los diferentes cromosomas. Los cromosomas sexuales y el cromosoma 21 presentaron una frecuencia mayor de disomía comparada con el resto de los cromosomas autosómicos estudiados. De esta manera se propuso que aunque todos los cromosomas pueden estar predispuestos a la no-disyunción, no todos muestran la misma frecuencia de ésta (Spriggs y cols, 1996).

Otros aspectos relacionados con no-disyunción son los efectos de edad, ya sea, materno o paterno. El efecto de edad materna tiene una importante repercusión en la producción de aneuploidías, mientras que el efecto de edad paterna parecería ser pequeño en la incidencia de no-disyunción (Miller y Therman, 2001).

## EFFECTO DE EDAD PATERNA EN LA NO-DISYUNCIÓN

Como ya se mencionó las trisomías son la anomalía cromosómica más común en los recién nacidos vivos y aunque las trisomías autosómicas (21,18 y 16) son primariamente de origen materno, las aneuploidías de los cromosomas sexuales como el Síndrome de Klinefelter (47,XXY), Síndrome de Turner (45,X) y XYY tienen una importante contribución paterna (Hassold y cols, 1993).

En humanos ha sido bien establecido que existe una relación entre la incidencia de trisomías y la edad materna avanzada. Las mujeres entre 20-25 años de edad presentan un 2-3% de productos trisómicos, comparando con un 30% o un porcentaje mayor, en las mujeres que se encuentran en la cuarta década de la vida. En contra parte en los hombres un posible efecto de edad paterna avanzada parece controversial (Martin y Rademaker, 1987; Guttenbach y cols, 1997; Hassold y Hunt, 2001).

Griffin y cols (1995) a través de estudios de FISH en espermatozoides humanos demuestran que existe una relación entre la incidencia de disomías de los cromosomas sexuales (XY, XX, YY) y la edad paterna avanzada, sugiriendo que los individuos de 50 años o más tienen una probabilidad dos veces mayor de producir espermatozoides con una aneuploidía de los cromosomas sexuales que aquellos individuos que se encuentran en sus veinte años.

Debido a que la disomía puede ser producida durante la meiosis I o la meiosis II, estarían implicados diferentes mecanismos relacionados con la edad, aunque, las causas del origen de estos eventos no han sido esclarecidas. Dentro de las posibles causas para explicar el efecto de edad en la disomía XY, Griffin y cols (1995) sugieren que la disomía, más que asociarse con una recombinación aberrante, se debe a la inhabilidad relacionada con la edad avanzada para segregar bivalentes aciasmáticos o a los bivalentes con una distribución de entrecruzamiento alterada, es decir, la recombinación quizá no sea afectada por el incremento de edad, pero que se vea comprometida la habilidad del testículo viejo para segregar a los diferentes tipos de configuración o a detener la meiosis en presencia de univalentes aciasmáticos.

Por el contrario, Lowe y cols (2001) en estudios realizados en padres de niños con síndrome de Klinefelter mostraron que existe un efecto de edad avanzada, ya que, la frecuencia de aneuploidia de los cromosomas sexuales XY es mayor conforme avanza la edad de los individuos masculinos. A diferencia de lo propuesto por Griffin y cols (1995), sugieren que la asociación entre la edad y el esperma XY se puede relacionar con los aspectos especiales del apareamiento y la recombinación de los cromosomas sexuales durante la meiosis masculina.

Estudios que apoyan la propuesta de Lowe y cols (2001) fueron realizados desde 1991 por Hassold y cols. demostrando que los individuos 47,XXY con no- disyunción paterna en MI, muestran una reducción en el entrecruzamiento en la PAR1 y en la mayoría de los casos no se detectó entrecruzamiento entre los cromosomas X y Y. Adicionalmente, en individuos que presentan una deleción distal en Xp los cromosomas sexuales son univalentes en la metafase I y el desarrollo se detiene entre la metafase I-II en la mayoría de las células germinales, consistente con la presencia de azoospermia en estos individuos (Mohandas y cols, 1992).

En general las anomalías en el apareamiento XY en el ratón y en el humano generan un paro en la espermatogénesis y esto se asocia con la muerte de las células germinales y también con la esterilidad masculina. Esto sugiere que la consecuencia de la falla en el apareamiento XY sea la muerte celular más que el incremento de la no-disyunción (Tomado de Hassold y cols, 1991). Esto es demostrado por el hecho de que en la meiosis masculina, los gametos que son producto de una mala segregación de los cromosomas sexuales y originan células XY y nulisómicas representan sólo el 4% (Koehtler y cols, 1996). Mientras que cuando se estudian espermatoцитos primarios en diacinesis-metafase I, el número de células que presentan a los cromosomas sexuales como univalente es mayor (Speed y Chandley, 1990).

## II OBJETIVOS

- **Estudiar el comportamiento de los cromosomas sexuales humanos durante la meiosis masculina.**
- **Describir el estado de condensación del cromosoma Y humano en las células meióticas y somáticas obtenidas de biopsias testiculares de 3 individuos fértiles afeos.**
- **Establecer la frecuencia de no-asociación entre los cromosomas sexuales y autosomas en diacinesis-metafase I en 3 individuos afeos para conocer si existe efecto de la edad.**

### III MATERIALES Y MÉTODOS

La meiosis masculina se estudió a partir de células obtenidas de fragmentos de biopsia de testículo de 3 individuos fértiles de 70 a 86 años, sometidos a orquidectomía profiláctica como parte del tratamiento del carcinoma prostático.

III.1 Técnica para obtener células meióticas de testículo humano (Modificación de la de Evans y cols, 1964).

- Mantener un fragmento de testículo con un volumen de 20 a 30 mm<sup>3</sup> en una solución hipotónica de citrato de sodio al 1% (ver apéndice) a 37 °C durante 30 a 60 minutos.
- Colocar el testículo en una caja Petri y cortar finamente a fin de que las células de los túbulos seminíferos queden en la suspensión.
- Transferir la suspensión celular a un tubo cónico de centrifuga de 15 ml. Eliminar los remanentes de tejido dejando sedimentar la muestra por 1 ó 2 minutos.
- Centrifugar la suspensión celular a 1500-2000rpm durante 10 minutos. Decantar el sobrenadante y resuspender cuidadosamente el botón con un pequeño volumen del residuo de la suspensión.
- Fijar las células gota a gota con una solución de Carnoy frío, (metanol absoluto-ácido acético glacial 3:1 ). Cuando las células y la suspensión se mezclan adicionar de 5 a 6 ml de fijador.
- Dejar reposar las células fijadas durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar la suspensión a 1500-2000rpm por 10 minutos. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón con un volumen pequeño del sobrenadante.
- Preparar las laminillas con la técnica de secado al aire. Usar el contraste de fases para checar la calidad y la concentración de las células y diluir o concentrar la suspensión de acuerdo a lo observado. Las laminillas secadas al aire pueden ser teñidas inmediatamente con solución de Giemsa o guardarse a -20°C en atmósfera de N<sub>2</sub> para usarse posteriormente.

Esta técnica sencilla y rápida permite obtener preparaciones de alta calidad que pueden ser analizadas a través de citogenética convencional y /o de técnicas de hibridación *in situ*, FISH.

### III.2 Técnica de hibridación *in situ* con sondas para el pintado total del cromosoma Y (WCP de VYSIS).

#### Preparación de la sonda

- Mezclar a temperatura ambiente 7  $\mu$ l de solución amortiguadora de hibridación WCP, 1  $\mu$ l de la sonda WCP del cromosoma Y marcada con Spectrum Orange (Vysis) y 2  $\mu$ l de agua.
- Centrifugar durante 1-3 segundos, agitar en el vortex, y centrifugar nuevamente.
- Calentar durante 5 minutos en baño María a 73 °C. Colocar el tubo con la solución de hibridación en un termo bloque a 45 – 50 °C.

#### Preparación de la laminilla con la muestra cromosómica

- Marcar con un lápiz diamante el área de la preparación cromosómica en donde se realizará la hibridación.
- Sumergir la laminilla en la solución desnaturalizante (70% Formamida/2XSSC) (ver apéndice) durante 5 minutos. La temperatura debe ser 73 °C  $\pm$  1°C. Si la morfología de los cromosomas no es óptima, una temperatura de desnaturalización de 70 °C da mejores resultados.
- Deshidratar la laminilla durante un minuto en el etanol al 70%, un minuto en el etanol al 85% y un minuto en el etanol al 100% (ver apéndice) a -20 °C.
- Secar la laminilla.
- Colocar la laminilla sobre un termo bloque a una temperatura de 45 °C -50 °C por no más de 2 minutos.

#### Solución de hibridación.

- Tomar de la solución de hibridación 10  $\mu$ l por muestra y precalentar por 5 minutos en baño María a 73 °C. Sacar el tubo del baño y colocarlo en un termo bloque a 45 - 50 °C.

### Hibridación.

- Aplicar 10 µl de la mezcla de la sonda sobre la laminilla y poner el cubreobjetos inmediatamente.
- Permitir que la solución de hibridación se distribuya a lo largo de la muestra presionando ligeramente, para eliminar las burbujas.
- Sellar el cubreobjetos con cemento de goma (Cemento Iris).
- Colocar la laminilla en una cámara húmeda pre - calentada a 37 °C. Incubar durante 4-16 horas o toda la noche.

### Lavados pos-hibridación (método tradicional)

- Preparar 5 vasos coplin con las siguientes soluciones: los primeros 3 con una solución de formamida 50%/2XSSC, el cuarto con una solución 2XSSC y el quinto con una solución 2XSSC/0.1% NP 40 (ver apéndice).
- Mantener los 5 vasos en baño María a una temperatura de 45-47 °C durante al menos 30 minutos antes de su uso.
- Eliminar el cemento de goma del cubreobjetos con unas pinzas e inmediatamente poner la laminilla en la primera solución de lavado de formamida 50%/2XSSC, agitándola para eliminar el cubreobjetos; el cual quedará en el vaso. Lavar durante 10 minutos en cada una de las 3 soluciones con formamida.
- Para el cuarto lavado la laminilla se introduce en la solución de 2XSSC durante 10 minutos y el quinto lavado en la solución 2XSSC/0.1% NP 40 por sólo 5 minutos.
- Secar la laminilla al aire en la oscuridad.
- Aplicar 10 µl de la solución de contratinción DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) al área marcada en la laminilla y colocar un cubreobjetos.
- Guardar las laminillas a -20 °C en la oscuridad.

### Lavados pos-hibridación (método rápido)

Preparar 2 vasos coplín con las siguientes soluciones: El primero con 0.4XSSC (ver apéndice) en un baño María a  $73\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante al menos 30 minutos. El segundo con 2XSSC/0.1% NP-40 a temperatura ambiente.

- Quitar el cemento de goma y el cubreobjetos y colocar la laminilla en la primera solución (0.4XSSC) agitándola durante 1-3 segundos. Si la intensidad de la sonda es baja reducir la temperatura de lavado a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Lavar las laminillas en la segunda solución 2XSSC/0.1% NP-40 a temperatura ambiente durante 5 segundos a 1 minuto, agitando durante los primeros segundos.
- Proceder de igual manera que en los lavados con formamida para la contratinción y montaje de las laminillas.

Las laminillas se analizaron en un microscopio Laborlux de Leitz con lámpara de mercurio de 100 watts utilizando un filtro de triple banda y filtros monobanda para rojo. Algunas preparaciones fueron fotografiadas utilizando la cámara integrada al microscopio con película de color asa 400, con un aumento 10X 100X, utilizando tiempos de sobre exposición.

Las preparaciones con FISH se realizaron sólo para el paciente (T1) y se usaron para compararlas con los estadios observados en las preparaciones teñidas con Giemsa.

Se analizaron 100 diacinesis-metafase I en las preparaciones teñidas con Giemsa para cada uno de los individuos (T1, T2 y T3). Se evaluó la asociación y no asociación en las regiones PAR1 / PAR2 de los cromosomas sexuales, así como la asociación y no asociación de los autosomas.

#### IV RESULTADOS

En las preparaciones teñidas con Giemsa de un paciente (T1) se realizó un análisis para identificar cada una de las etapas de la meiosis masculina y compararlas con el análisis realizado en las preparaciones hibridadas con la sonda para pintado del cromosoma Y.

En las figuras 8 (A - I) se muestran los diferentes estadios de la meiosis masculina desde metafases de espermatogonias hasta espermias maduros y algunas células de Sertoli, en preparaciones teñidas con Giemsa y en preparaciones hibridadas con la sonda para pintar al cromosoma Y.

En el análisis del comportamiento del cromosoma Y en las células germinales del testículo adulto se observó lo siguiente:

En aquellas espermatogonias que entran en el proceso meiótico la cromatina del cromosoma Y inicia un periodo de condensación gradual, a través de leptotene y zigotene alcanzando su máxima expresión durante paquitene, en donde la cromatina del cromosoma Y se condensa y compacta formando parte de la vesícula sexual o el cuerpo XY (Figuras 8 A-C). En este estadio existe una diferencia citológica entre la morfología que representa el cuerpo XY y los cromosomas autosómicos, los cuales se encuentran alargados.

En los subsecuentes estadios, diplotene, diacinesis-metafase I, la señal del cromosoma Y continua condensada y puede observarse una figura meiótica semejante entre los cromosomas sexuales y los autosómicos, con la diferencia de que los primeros se unen por un solo quiasma en una unión término-terminal por sus brazos cortos (Figuras 8 D-E).

En las células que se encuentran en metafase II, las espermátidas y los espermatozoides, se muestra una señal condensada del cromosoma Y (Figuras 8 F-H). A diferencia de los últimos estadios y fases meióticas presentes en los espermatocitos, en las células somáticas del testículo, las células de Sertoli, se presenta una decondensación del cromosoma Y (Figura 8 - I).

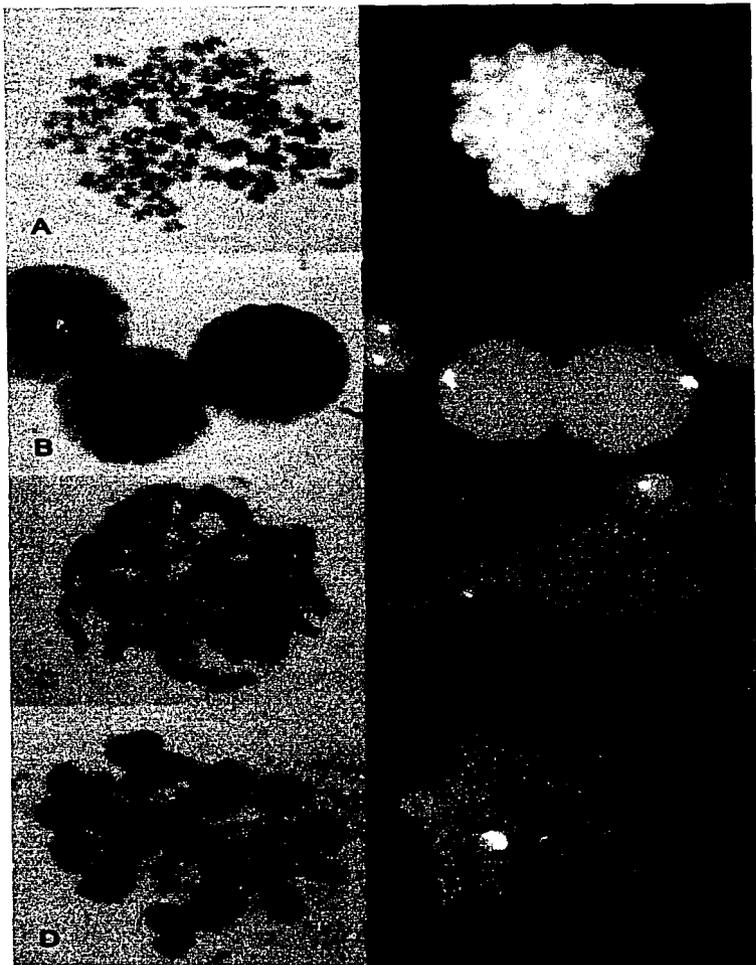


Figura 8. Células meióticas teñidas con Giemsa y pintado del cromosoma Y con WCP Y (YYSIS).  
A. Metafase de espermatogonía. B. Zigotene. C. Paquitene. D. Diacinesis temprana.

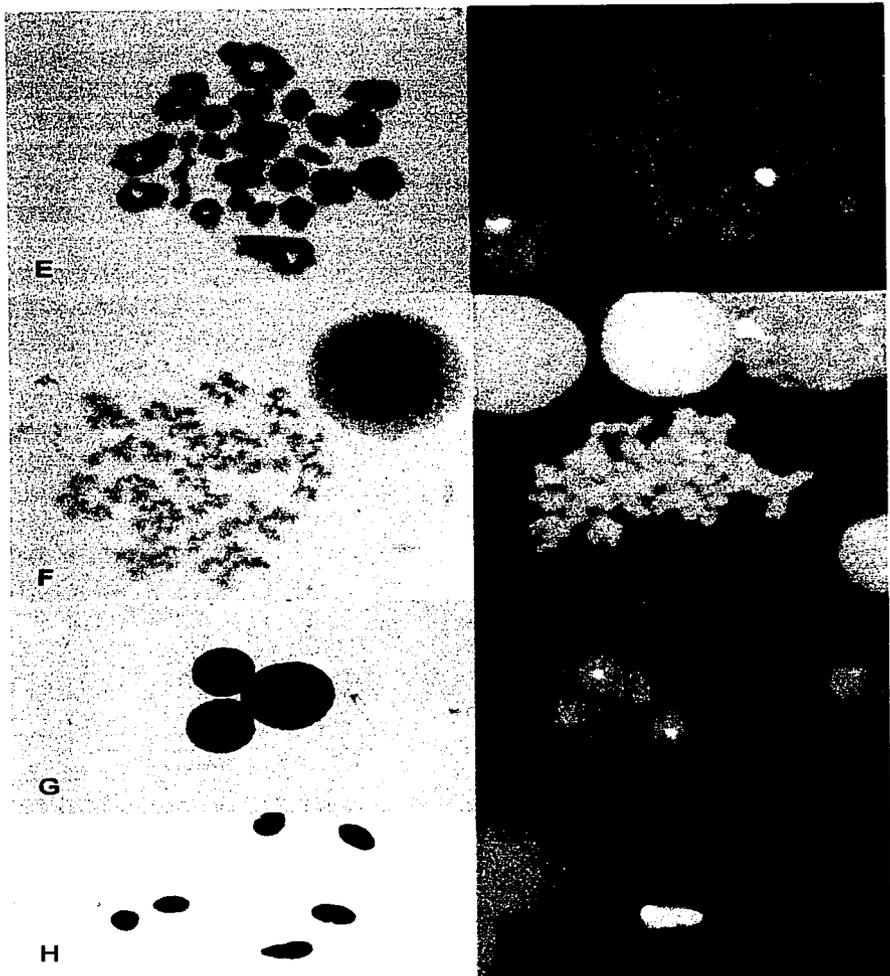


Figura 8. Células meióticas teñidas con Giemsa y pintado del cromosoma Y con WCP Y (VYSIS).  
E. Diacinesis tardfa. F. Metafase II. G. Espermátidas. H. Espermatozoides.

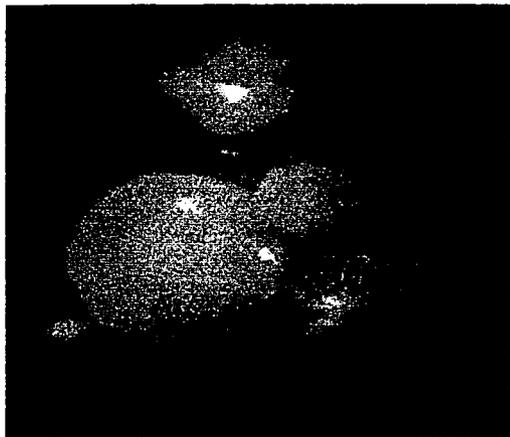
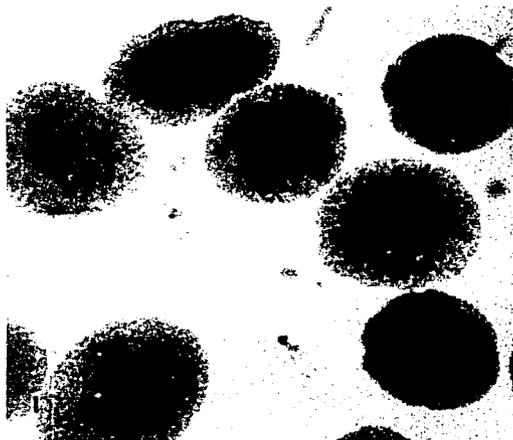


Figura 8. 1. Células de Sertoli teñidas con Geimsa y pintado del cromosoma Y con WCP Y (VYSIS).

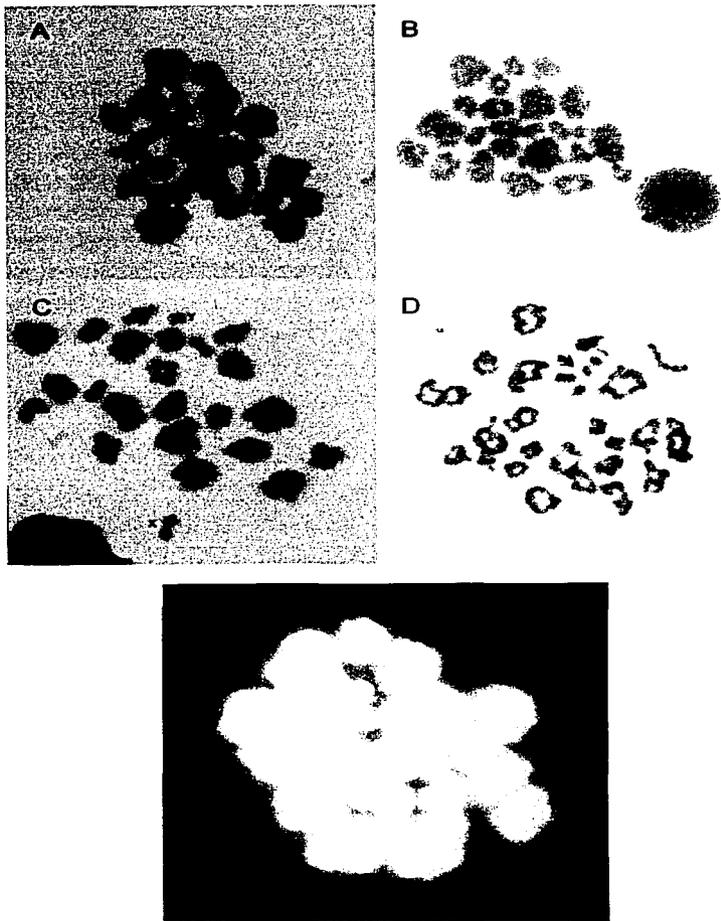
En la tabla 7. se muestran los resultados del análisis de 100 diacinesis-metafases I en 3 individuos adultos para evaluar la presencia de cromosomas univalentes, con especial referencia al par sexual.

Tabla 7. Resultados del análisis de 100 diacinesis – metafase I en preparaciones de 3 individuos.

PACIENTE	T1	T2	T3
Edad (años)	81	86	70
Asociación Xp-Yp	86%	96%	89%
Asociación Xp-Yp/Xq-Yq	3%	2%	0%
X-Y no asociados	14%	4%	11%
Cromosomas grupo G no asociados	6%	3%	7%
Otros autosomas no asociados	1%	0%	4%

En las Figuras 9 A-E se muestran diacinesis-metafases I en donde se observan cromosomas sexuales bivalentes y univalentes.

En el estadio de diacinesis se lleva a cabo la terminalización quiasmática representada por la unión de los telómeros en las regiones terminales, observándose una configuración diferente entre los cromosomas autosómicos y los cromosomas sexuales que al presentar un sólo quiasma en Xp-Yp forman una estructura asimétrica (Figura 9 A). En una muy baja proporción de células se observó que al igual que los autosomas, los cromosomas sexuales pueden mostrar una estructura simétrica debido a la formación de dos quiasmas, uno en Xp-Yp y otro en Xq-Yq (Figura 9 B). Como contraparte, en aproximadamente 10% de las diacinesis – metafases I existe ausencia de quiasmas tanto en Xp-Yp



**Figura 9.** Células meióticas durante el estadio diacinesis-metafase I teñidas con Giemsa y pintado del cromosoma Y con WCP Y (VYSYS). A. Asociación Xp - Yp. B. Asociación Xp - Yp / Xq - Yq. C. X-Y no asociados. D. Autosomas no asociados. E. Asociación Xp - Yp, hibridación con WCP Y.

como en Xq-Yq, encontrándose una separación de los cromosomas sexuales (Figura 9 C). La falta de asociación entre cromosomas autosómicos también fue observada, predominando en los cromosomas más pequeños, que generalmente presentan un quiasma único, el cual al no presentarse origina la formación de cromosomas univalentes (Figura 9 D). La asociación Xp – Yp en la PAR1 con hibridación con WCP – Y forma una estructura asimétrica comparada con la estructura simétrica de los autosomas dada por la terminalización quiasmática (Figura 9 E).

## V DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Particular interés se ha puesto en la relación que guarda el comportamiento de los cromosomas en la recombinación meiótica y los errores producidos durante la segregación cromosómica que conducen a gametos aneuploides. A pesar de que los mecanismos de segregación son los mismos en las meiosis femenina y masculina, en los humanos existen algunas diferencias sexo específicas, principalmente en los tiempos y duración del proceso. Una diferencia fundamental radica en la detención de la meiosis femenina al final de la primera profase meiótica, en el estadio de dictiotene, lo cual la hace mucho más propensa a errores al suprimir el punto de control en la transición metafase-anafase I. A pesar de que es bien conocido el efecto de la edad materna en la incidencia de trisomías, las causas que las originan aún no se han dilucidado. Sin embargo, estudios recientes señalan una participación importante de la recombinación meiótica en la segregación correcta, al demostrar una alta incidencia de cromosomas aquiasmáticos en productos con trisomía 21 tanto en madres jóvenes como añosas. Esto llevó a postular que en las madres añosas además existen otro tipo de alteraciones, principalmente en la organización de los microtúbulos y en los complejos de cohesinas lo que aumentaría la posibilidad de errores en la segregación cromosómica (Hassold y cols, 2000; Heemst y Heyting, 2000; Hassold y Hunt, 2001).

Por otra parte la contribución paterna en la producción de trisomías de autosomas es mínima comparada con la materna, no así en la producción de individuos 47,XXY donde se ha observado una contribución equitativa y un efecto de edad en ambos sexos (Koeheleer y cols, 1996; Hassold y cols, 2001; Moore y Best, 2001). Es por ello que el estudio del comportamiento de los cromosomas sexuales durante la meiosis masculina resulta relevante.

La utilización de técnicas de citogenética molecular, en particular el pintado de cromosomas se ha utilizado para estudiar el comportamiento meiótico de los cromosomas sexuales (Speed, 1993; Kofman y cols, 1994; Armstrong y cols, 1994). En este trabajo el pintado del cromosoma Y mediante FISH nos permitió hacer un análisis de su comportamiento con base a su estado de condensación en cada uno de los estadios de la meiosis e incluso en las células somáticas del testículo adulto.

En el testículo de individuos adultos, se puede observar la presencia de decondensación del cromosoma Y en las células de Sertoli (Figura 8 - I), paralela a la condensación del cromosoma Y en las células germinales, la cual se lleva a cabo durante el estadio de paquitene al formarse la vesícula sexual o cuerpo XY (Figura 8 C). La extensión de la cromatina del cromosoma Y en las células de Sertoli sugiere actividad génica del cromosoma Y en estas células de soporte, lo que permite proponer que éste sea un mecanismo compensador a la inactivación de los cromosomas sexuales en el cuerpo XY, apoyando que exista un control ejercido por las células de Sertoli sobre la espermatogénesis, tal como ha sido sugerido por Speed y cols (1993).

La conexión funcional establecida entre las células germinales y las células de soporte en relación con la actividad del cromosoma Y, puede estar relacionada con la actividad meiótica testicular que se alcanza a partir de la pubertad, ya que, de acuerdo a lo reportado por Speed y cols (1993), en individuos recién nacidos y prepúberes la cromatina del cromosoma Y se encuentra altamente condensada en las células de Sertoli, mientras que en los individuos púberes y adultos se encuentra decondensada, como ya se mencionó. De esta forma, el control sobre algunas facetas de la espermatogénesis quizá no sea autónomo de las células germinales, y más bien, podría emanar de las células de Sertoli que forran las paredes del túbulo, mostrando una cercana interdependencia con las células germinales.

En zigotene los cromosomas X y Y están elongados y delgados, sugiriendo que este evento es un prerequisite para el apareamiento y el entrecruzamiento en las regiones pseudoautosómicas (Figura 8 B). Por el contrario, en paquitene, los cromosomas sexuales se compactan en el cuerpo XY (Figura 8 C), lo cual parecería ser esencial para evitar la recombinación ilegítima entre secuencias no homólogas. Cuando el apareamiento y la recombinación se dan correctamente, se forma el quiasma obligado, observándose la estructura lineal característica de los cromosomas sexuales unidos por los extremos de sus brazos cortos en la diacinesis-metafase I (Figura 8 D-E y 9 A), lo que permite que la espermatogénesis concluya exitosamente.

Se ha hipotetizado que el apareamiento entre los cromosomas X y Y es un prerrequisito para que la meiosis masculina pueda completarse. En los humanos, individuos que carecen de apareamiento y recombinación X-Y son estériles y una recombinación reducida o anormal en la región pseudoautosómica Xp y Yp en individuos 47,XXY de origen paterno, se ha asociado con una segregación incorrecta produciendo individuos aneuploides (Hassold y cols, 1991; Mohandas y cols, 1992). Esta premisa es también válida para los errores maternos implicando tanto a los cromosomas sexuales como a los autosomas 15, 16, 18 y 21 que también mostraron reducción en la recombinación comparada con los individuos normales (Koehler y cols, 1996). La reducción de la recombinación se debe a ausencia total o a un número reducido de intercambios. De esta forma se estima que cerca de 70% de los casos 47,XXY paternos resultan de una meiosis donde el bivalente XY falla para aparear o recombinar (Hassold y cols, 1991). De igual forma, los casos de trisomía 21 materna aquíasmáticos representan aproximadamente el 40% (Lamb y cols, 1997). Estos hallazgos son contrastantes con los observados en una situación normal, donde existen entrecruzamientos obligatorios, que permiten una adecuada segregación de los bivalentes (Koehler y cols, 1996). Por tanto, es importante mencionar que la formación de al menos un quiasma obligatorio resulta imprescindible para una correcta segregación, sobre todo en aquellos bivalentes como los cromosomas sexuales y los cromosomas acrocéntricos que forman parte del grupo G. Estos cromosomas tienen generalmente la capacidad de formar sólo un quiasma, en el caso del par XY, por su limitada región homóloga (PAR1) y en el caso de los cromosomas acrocéntricos por su tamaño pequeño.

Tradicionalmente el análisis para ver el comportamiento cromosómico que asegura una segregación correcta se realizaba en células en diacinesis, para observar la presencia de bivalentes. Sin embargo, el análisis de la conducta de los cromosomas X-Y durante el estadio de diacinesis presenta algunos obstáculos:

- En el humano, las células de interés son relativamente inaccesibles; el análisis de los individuos masculinos requiere de una biopsia testicular, la cual no es ético tomar en individuos sanos. El análisis de la meiosis femenina presenta mayor dificultad, ya que, la recombinación ocurre en el ovario fetal. Por esta razón, la poca disponibilidad del material limita los análisis citológicos sobre el

proceso meiótico, el cual implica a la recombinación humana. En este trabajo utilizamos tejido testicular de individuos sometidos a una orquidectomía profiláctica como parte del tratamiento de cáncer de próstata.

- Las preparaciones en diacinesis son difíciles de analizar, aún en circunstancias ideales, ya que, la morfología cromosómica es subóptima interfiriendo con la realización de las técnicas de bandedo y por lo tanto con la identificación individual de los cromosomas.
- En este estadio el grado de condensación de los cromosomas es mayor, lo que, impide reconocer las regiones específicas donde se ha llevado a cabo la formación de los quiasmas.

El análisis del apareamiento Xp-Yp en diacinesis-metafase I puede utilizarse como un indicador que asegura una segregación correcta de los cromosomas sexuales, ya que, generalmente indica la formación del quiasma obligado en la región pseudoautosómica. En las 300 diacinesis-metafases I analizadas en las muestras de los 3 individuos añosos se observó apareamiento Xp-Yp en 90% de las células, con un apareamiento en ambos telómeros en 2% y separación de los cromosomas sexuales en aproximadamente 10% de las células. Estos datos concuerdan con lo reportado en trabajos previos, utilizando metodologías similares a la empleada en el presente trabajo (Hultén, 1974; Laurie y Hultén, 1985; Speed y Chandley, 1990; Armstrong y cols, 1994). Llama particularmente la atención el individuo T2, en donde únicamente se encontró no asociación Xp-Yp en 4% de las células analizadas. Este dato permite señalar que existen variaciones individuales y descartar que la no asociación sea producto del proceso metodológico. La presencia de cromosomas univalentes de autosomas fue de 7% en promedio en los tres individuos estudiados predominando la separación de los cromosomas del grupo G (Tabla 7).

El efecto de edad paterna en relación con la no asociación X-Y de los cromosomas sexuales durante la primera división meiótica fue difícil de evaluar, debido a que no se pudieron obtener muestras testiculares de individuos jóvenes; aún cuando se intentó con muestras de cadáver.

Si comparamos nuestros resultados con el trabajo publicado por Speed y Chandley (1990) en donde la frecuencia de no asociación X-Y fue del 14.8% en un grupo control de 6 individuos fértiles con edades de

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

84, 68, 45, 44, 38 y 29 años y no se encontraron diferencias significativas a pesar de la variación de edad (jóvenes vs añosos). El resultado obtenido por Speed y Chandley (1990) del 14.8% de no asociación X-Y durante el estadio de diacinesis-metafase I, es similar a los resultados obtenidos en los individuos T1 y T3 con 14% y 11% de no asociación X-Y respectivamente. Con estos datos y el hecho de que el individuo T2 tenga solo 4% de cromosomas sexuales univalentes parecería que no existe un efecto de la edad paterna para la separación X-Y en diacinesis metafase I.

La frecuencia de no-disyunción de los cromosomas X y Y durante la meiosis masculina se ha estudiado mediante un análisis directo en los espermatozoides utilizando FISH. Estos trabajos han demostrado que los errores ocurren principalmente durante la primera división meiótica, encontrándose células hiperhaploides (24,XY) con frecuencias que van de 0.08 a 0.34% (Chevret y cols, 1995; Griffit y cols, 1995; Martin y cols, 1995; Spriggs y cols, 1996). De acuerdo con lo ya mencionado, el apareamiento o asociación XY en diacinesis representa la culminación del evento de recombinación obligatorio que tiene como función establecer una segregación correcta, si éste no se encuentra presente, los cromosomas sexuales migran de manera aleatoria, lo que puede originar gametos aneuploides.

Si consideramos el porcentaje de aneuploidía XY reportado en el análisis directo de espermatozoides (Chevret y cols, 1995; Griffit y cols, 1995; Martin y cols, 1995; Spriggs y cols, 1996) y lo comparamos con los resultados obtenidos en nuestro estudio en diacinesis, se observa que la frecuencia de no-disyunción determinada por FISH en los espermatozoides es mucho menor que la frecuencia de no asociación X-Y encontrada en los estudios en diacinesis. El porcentaje obtenido de no asociación XY en espermatozoides primarios parecería no verse reflejado en la producción de espermatozoides maduros. Esto puede ser explicado con base en los estudios de Blanco y cols (2001) que demuestran que en células germinales con aneuploidías para los cromosomas sexuales como 47,XXY ó 46,XY/47,XXY la presencia de puntos de control, a niveles premeióticos, de espermatozoides primarios, secundarios o espermátidas, posiblemente arresten a las células anormales originando una eliminación continua de éstas en la línea germinal a lo largo de la espermatogénesis. Esto ya había sido señalado con anterioridad al observar que la falta de asociación X-Y en paquíteno, ausencia de cuerpo X-Y en individuos fértiles, es un evento

muy poco frecuente (Armstrong y cols, 1994). Sugiriendo que el punto de control de paquitene elimina a los espermatoцитos que no pudieron establecer correctamente los eventos de recombinación meiótica. Sin embargo, algunos bivalentes X-Y a pesar de haber recombinado no forman un quiasma estable, ya sea debido a que los intermediarios no fueron resueltos adecuadamente como entrecruzamientos o probablemente por defectos en el aparato de segregación cromosómica que incluye la formación del huso, los cinetocoros y el mantenimiento de la cohesión centromérica entre las cromátidas hermanas. Los trabajos realizados con técnicas de FISH multicolor en espermatoцитos demuestran un efecto de la edad en la incidencia de espermatoцитos con aneuploidias X-Y. (Griffin y cols, 1995; Guttenbach y cols, 2000). Así mismo, Lowe y cols (2001) señalan este mismo efecto al estudiar el espermatoцитos de padres de niños con síndrome de Klinefelter de origen paterno en un intervalo de edad de 24 a 57 años.

De acuerdo con lo reportado en la literatura se puede afirmar que, al menos para los cromosomas sexuales, tanto los hombres como las mujeres de edad avanzada, presentan una probabilidad mayor de producir aneuploidias en sus descendientes en comparación con sus contrapartes más jóvenes (Griffin y cols, 1995; Guttenbach y cols, 2000; Hunt y Hassold, 2001; Lowe y cols, 2001). Un hecho importante que explica un obvio efecto de la edad materna contra un ligero efecto de la edad paterna se encuentra relacionado con los puntos de control durante la meiosis masculina. Como se explicó anteriormente, aún cuando existan errores en la recombinación meiótica y en la adecuada segregación cromosómica, la existencia de un estricto control a través de la espermatogénesis diluye el daño y se observa la formación de espermatoцитos aneuploides con un porcentaje muy bajo. Este control establecido en los individuos masculinos elimina un número importante de meiocitos primarios en los cuales no se llevó a cabo adecuadamente la recombinación, formación de quiasmas o alineamiento metafásico. Cabe señalar, que no ocurre lo mismo en los individuos femeninos, por lo que, en la vía materna, donde el control no es tan riguroso e incluso el punto de control de metafase no existe, se manifiesta un porcentaje mayor de células aneuploides y por consiguiente el efecto de edad paterna es poco visible en contraparte, con un efecto de edad materna bien establecido.

Actualmente se han implementado nuevas técnicas para el estudio de la recombinación meiótica y sus implicaciones en la producción de gametos aneuploides. Entre éstas se encuentran los análisis por inmunotinción que favorecen el estudio temporo - espacial de los eventos de recombinación, por lo que, estos podrían ser caracterizados en una región cromosómica específica, cosa que no es posible en preparaciones en diacinesis. Por ejemplo, se utiliza el análisis de preparaciones en paquitene usando anticuerpos contra SPO11 que permite la localización de las rupturas de doble cadena que inician la recombinación, anticuerpos contra SCP3 podrían identificar la presencia del CS y anticuerpos para MLH1 los puntos de intercambio meiótico. De esta forma es posible identificar la sinapsis o desinapsis en los cromosomas autosómicos y en los cromosomas sexuales XY en la PAR1, así como determinar el número y la localización específica de los eventos de intercambio (Hassold y cols, 2000, Hunt y Hassold, 2001; Tease y cols, 2002).

## VI REFERENCIAS

- Agarwal S, Roeder GS. 2000. Zip3 provides a link between recombination enzymes and synaptonemal complex proteins. *Cell* 102:245-255.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1996. *Biología molecular de la célula*. 3ª ed. Omega, Barcelona. 281-284 y 1083-1109.
- Armstrong SJ, Kirkham AJ, Hultén MA. 1994. XY chromosome behavior in the germ-line of the human male: a FISH analysis of spatial orientation, chromatin condensation and pairing. *Chromosome Research* 2:445-452.
- Armstrong SJ, Hultén MA, Keohane AM, Turner BM. 1997. Different strategies of X-inactivation in germinal and somatic cells: histone H4 underacetylation does not mark the inactive X chromosome in the mouse male germline. *Exp Cell Res* 230: 399-402.
- Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie D-E, Monell C, Arnheim N, Bradley A, Ashley T, Liskay RM, Dolganov GM, Maser RS, Novikov A, Tosto L, Chong S, Bressan DA, Petriani JHJ. 1996. Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nature Genet* 13:336-342.
- Bartlow AL, Benson FE, West SC, Hultén MA. 1997. Distribution of the RAD51 recombinase in human and mouse spermatocytes. *EMBO J* 16:5207-5215.
- Bass HW, Riera-Lizarazu O, Ananiev EV, Bordoli SJ, Rines HW, Phillips RL, Sedat JW, Agard DA, Cande WZ. 2000. Evidence for the coincident initiation of homolog pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. *J Cell Sci* 113: 1033-1042.
- Bickel SE, Orr-Weaver. 1996. Holding Chromatids together to ensure they go their separate ways. *Bioessays* 18:293-300.
- Bishop DK. 1994. RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form discrete nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. *Cell* 79:1081-1092.
- Bishop DK . 2001. Meiotic recombination pathways. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing/[www.els.net](http://www.els.net).
- Blanco J, Rubio C, Simon C, Egozcue J, Vidal F. 1997. Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XYY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Hum Genet* 99:413-416.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F. 2001. Meiotic behaviour of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (47,XXY, mosaic 46,XY/47,XXY and 47,XYY) assessed by fluorescence *in-situ* hybridization. *Hum Reprod* 16:887-892.
- Broman KW, Weber JL. 2000. Characterization of human crossover interference. *Am J Hum Genet* 66:1911-1926.
- Buonomo SBC, Clyne RK, Fuchs J, Loidl J, Uhlmann F, Nasmyth K. 2000. Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell* 103:387-398.
- Burgoyne PS. 1982. Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of mammals. *Hum Genet* 61:85-90.

- Carpenter ATC. 1987. Gene conversion, recombination nodules and the initiation of meiotic synapsis. **Bioessays** 6:232-236.
- Carpenter ATC. 1994. Chiasma function. **Cell** 77:959-962.
- Ciccodicola A, D'Esposito M, Esposito T, Gianfrancesco F, Migliaccio C, Giuseppina MM, Matarazzo MR, Vaca M, Franzè A, Cuccurese M, Cocchia M, Curci A, Terracciano A, Torino A, Cocchia S, Mercadante G, Pannone E, Archidiacono N, Rocchi M, Schlessinger D, D'Urso M. 2000. Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xq/Yq pseudoautosomal region. **Hum Mol Genet** 9:395-401.
- Cobb JK, Rajashekar R, Park C, Handel MA. 1997. Analysis of expression and function of topoisomerase I and II during meiosis in male mice. **Mol Reprod Dev** 46:489-498.
- Conrad MN, Domínguez AM, Dresser ME. 1997. Ndj1p, a meiotic telomere protein required for normal chromosome synapsis and segregation in yeast. **Science** 276:1252-1255.
- Cook PR. 1997. The transcriptional basis of chromosome pairing. **J Cell Science** 110:1033-1040.
- Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, Pelletier R, Cozzi J, Séle B. 1995. Meiotic segregation of the X and Y chromosome I analyzed by three – color FISH in human interphase spermatozoa. **Cytogenet Cell Genet** 71:126-130.
- Chua PR, Roeder GS. 1997. Tam1, a telomere-associated meiotic protein, functions in chromosome synapsis and crossover interference. **Genes and Dev** 11:1786-1800.
- Chua PR, Roeder GS. 1998. Zip2, a meiosis-specific protein required for the initiation of chromosome synapsis. **Cell** 93:349-359.
- Dawson DS, Murray AW, Szostak JW. 1986. An alternative pathway for meiotic chromosome segregation in yeast. **Science** 234:713-717.
- Denburg AF, McDonald K, Moulder G, Barstead R, Dresser M, Villeneuve AM. 1998. Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. **Cell** 94:387-398.
- Dresser ME. 2000. Meiotic chromosome behavior in *Saccharomyces cerevisiae* and (mostly) mammals. **Mut Res** 451:107-127.
- Egel R. 1995. The synaptonemal complex and the distribution of meiotic recombination events. **Trends Genet** 11:206-208.
- Eijpe M, Offenbergh H, Goedecke W, Heyting C. 2000. Localization of RAD50 and MRE11 in spermatocyte nuclei of mouse and rat. **Chromosoma** 109:123-132.
- Escalier D, Garchon HJ. 2000. XMR is associated with the asynapsed segments of sex chromosomes in the XY body of mouse primary spermatocytes. **Chromosoma** 109:259-265.
- Evans EP, Breckon G, Ford CE. 1964. An air drying method for meiotic preparations from mammalian testes. **Cytogenetics** 3: 289-294.
- Golmand AS, Lichten M. 2000. Restriction of ectopic recombination by interhomolog interactions during *Saccharomyces cerevisiae* meiosis. **Proc Natl Acad Sci** 97:9537-9541.
- Graves JAM, Wakefield MJ, Toder R. 1998. The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes. **Hum Mol Genet** 7:1991-1996.

- Griffin DK, Abruzzo MA, Millie EA, Sheean LA, Feingold E, Sherman SL, Hassold TJ. 1995. Non-disjunction in human sperm: evidence for an effect of increasing paternal age. **Hum Mol Genet** 4:2227-2232.
- Guttenbach M, Engel W, Schmid M. 1997. Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosome aberrations. A review. **Hum Genet** 100:1-21.
- Guttenbach M, Kohn FM, Engel W, Schmid M. 2000. Meiotic nondisjunction of chromosomes 1, 17, 18, X, and Y in men more than 80 years of age. **Biol Reprod** 63:1727-1729.
- Haber EA. 1997. A super new twist on the initiation of meiotic recombination. **Cell** 99:163-166.
- Haber JE. 1998. Searching for a partner. **Science** 279:823-824.
- Haber JE. 2000. Partners and pathways repairing a double-strand break. **Trends Genet** 16:259-264.
- Hassold TJ, Sherman SL, Pettay D, Page DC, Jacobs PA. 1991. XY chromosome nondisjunction in man is associated with diminished recombination in the pseudoautosomal region. **Am J Hum Genet** 49:253-260.
- Hassold T, Hunt PA, Sherman S. 1993. Trisomy in humans: incidence, origin and etiology. **Curr Opin Genet Dev** 3:398-403.
- Hassold T, Sherman S, Hunt P. 2000. Counting cross-over: characterizing meiotic recombination in mammals. **Hum Mol Genet** 9:2409-2419.
- Hassold T, Hunt P. 2001. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. **Nature Review Genet** 2:280-291.
- Hawley RS, Arbel T. 1993. Yeast Genetics and the fall of the classical view of meiosis. **Cell** 72:301-303.
- Heemst DV, Heyting Ch. 2000. Sister chromatid cohesion and recombination in meiosis. **Chromosoma** 109:10-26.
- Heyting C. 1996. Synaptonemal complexes: Structure and function. **Curr Opin Cell Biol** 8:389-396.
- Hiraoka Y, Ding DQ, Yamamoto A, Tsutsumi Ch, Chikashige Y. 2000. Characterization of fission yeast meiotic mutants based on live observation of meiotic prophase nuclear movement. **Chromosoma** 109:103-109.
- Hulten M. 1974. Chiasma distribution at diakinesis in the normal human male. **Hereditas** 76:55-78.
- Hunter N, Börner GV, Lichten M, Kleckner N. 2001.  $\gamma$ -H2AX illuminates meiosis. **Nat Genet** 27:236-238.
- Kaback DB, Barber D, Mahon J, Lamb J, You J. 1999. Chromosome size-dependent control of meiotic reciprocal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of crossover interference. **Genetics** 152:1475-1486.
- Keeney S, Giroux CN, Kleckner N. 1997. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. **Cell** 88:375-84.
- Khazanehdari KA, Borts RH. 2000. EXO1 y MSH4 differentially affect crossing-over and segregation. **Chromosoma** 109:94-102.
- Kleckner N. 1996. Meiosis: How could it work? **Proc Natl Acad Sci** 93:8167-8174.

- Klein S. 1994. Choose your parther: Chromosome pairing in yeast meiosis. **Bioessays** 16:869-871.
- Koehler K, Hawley S, Sherman S, Hassold T. 1996. Recombination and nondisjunction in humans and flies. **Hum Mol Genet** 5:1495-1504.
- Kofman-alfaro S, Speed RM, Boyle S, Chandley AC. 1994. Condensation behaviour of the human X chromosome in male germ cells and Sertoli cells examined by fluorescence *in situ* hybridization. **Chromosome Research** 2:439-434.
- Kohlil J, Hartsuiker E. 2001. Meiosis. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing/ [www.els.net](http://www.els.net).
- Kralewsky M, Novello A, Benavente R. 1997. A novel Mr 77,000 protein of the XY body of mammalian spermatocytes: its localization in normal animals and in Searle's translocation carries. **Chromosoma** 106:160-167.
- Kvaloy K, Galvagni F, Brown WRA. 1994. The sequence organization of the long arm pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. **Hum Mol Genet** 3:771-778.
- Lamb NE, Feingold E, Savage A, Avramopoulos D, Freeman S, Gu Y, Hallberg A, Hersey J, Karadima G, Pettay D, Saker D, Shen J, Taft L, Mikkelsen M, Petersen MB, Hassold T, Sherman SL. 1997. Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosoma 21. **Hum Mol Genet** 6: 1391-1399.
- Laurie DA, Hulten MA. 1985. Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. **Ann Hum Genet** 49:189-201.
- Levilliers J, Quack B, Weissenbach J, Petit C. 1989. Exchange of terminal portions of X- and Y-chromosomal short arms in human XY females. **Proc Natl Acad Sci** 88:2296-2300.
- Lewin B. 2000. Genes VII. Oxford University Press. New York. 415-456.
- Lowe X, Eskenazi B, Nelson DO, Kidd S, Alme A, Wyrobek A. 2001. Frequency of XY sperm increases with age in fathers of boys with Klinefelter syndrome. **Am J Hum Genet** 69:1046-1054.
- Mahadevaiah SK, Turner JMA, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodríguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM, Burgoyne PS. 2001. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. **Nature Genet** 27:271-276.
- Martin RH, Rademaker AW. 1987. The effect of age on the frequency of sperm chromosomal abnormalities in norman men. **Am J Hum Genet** 41:489-492.
- Martin RH, Spriggs E, Ko E, Rademaker AW. 1995. The relationship between paternal age, sex ratios, and aneuploidy frequencies in human sperm, as assessed by multicolor FISH. **Am J Hum Genet** 57:1395-1399.
- Mc Carrey JR, Dilworth DD. 1992. Expression of Xist in mouse germ cells correlates with X-chromosome inactivation. **Nature Genet** 2:200-203.
- Mckee, BD. Handel MA. 1993. Sex chromosomes, recombination, and chromatin conformation. **Chromosoma** 102:71-80.
- Mckim KS, Hayashi-Hagihara A. 1998. *Mei-W68* in *Drosophila melanogaster* encodes a Spo11 homolog: evidence that the mechanism for initiating meiotic recombination is conserved. **Genes Dev** 12:2932-2942.

- Mckim KS, Green-Marroquin BL, Sekelsky JJ, Chin G, Steinberg C, Khodosh R, Hawley RS. 1998. Meiotic synapsis in the absence of recombination. **Science** 279:876-878.
- Metzler-Guillemain C, Masy DB. 2000. Identification and characterization of an SPO11 homolog in the mouse. **Chromosoma** 109:133-138.
- Meuwissen RLJ, Meerts I, Hoovers JMN, Leschot NJ, Heyting C. 1997. Human synaptonemal complex protein 1 (SCP1): Isolation and characterization of the cDNA and chromosomal localization of the gene. **Genomics** 39:377-384.
- Miller OJ, Therman E. 2001. Human Chromosomes. 4<sup>th</sup> ed. Ed. Springer-Verlag New York. 125-174.
- Moens BP. 1994. Molecular perspectives of chromosome pairing at meiosis. **Bioessays** 16:101-106.
- Moens PB, Spyropoulos B. 1995. Immunocytology of chiasmata and chromosomal disjunction at mouse meiosis. **Chromosoma** 104:175-182.
- Mohandas TK, Speed RM, Passage MB, Yen PH, Chandley AC, Shapiro LJ. 1992. Role of the pseudoautosomal region in sex-chromosome pairing during male meiosis: Meiotic studies in a man with a deletion of distal Xp. **Am J Hum Genet** 51:526-533.
- Moore M, Best RG. 2001. Chromosome mechanics. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing/[www.els.net](http://www.els.net).
- Nag DK, Scherthan H, Rockmill B, Bhargava J, Roeder GS. 1995. Heteroduplex DNA formation and homolog pairing in yeast meiotic mutants. **Genetics** 141:75-86.
- Orr-Weaver TL. 1995. Meiosis in *Drosophila*: seeing is believing. **Proc Natl Acad Sci** 92:10443-10449.
- Page DC, Chapelle A de la, Weissenbach J. 1985. Chromosome Y-specific DNA in related human XX males. **Nature** 315:224-226.
- Petit C, Chapelle A de la, Levilliers J, Castillo S, Noel B, Weissenbach J. 1987. An abnormal terminal X-Y interchange accounts for most but not all cases of human XX maleness. **Cell** 49:595-602.
- Plug AW, Peters AH, Keegan KS, Hoekstra MF, Boer P, Ashley T. 1998. Change in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. **J Cell Sci** 111:413-423.
- Prinz S, Amon A, Klein F. 1997. Isolation of COM1 a new gene required to complete meiotic double-strand break induced recombination in *Sacharomyces cerevisiae*. **Genetics** 146:781-795.
- Rappold GA. 1993. The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. **Hum Genet** 92:315-324.
- Rasmussen SW. 1977. The transformation of the synaptonemal complex into the "elimination chromatin" of *Bombyx mori* oocytes. **Chromosoma** 60:205-221.
- Richler C, Soreq H, Wahrman J. 1992. X inactivation in mammalian testis is correlated with inactive X-specific transcription. **Nature Genet** 2: 192-195.
- Robinson WP. 1996. The extent, mechanism, and consequences of genetic variation, for recombination rate. **Am J Hum Genet** 59:1175-1183.
- Roeder GS. 1997. Meiotic chromosomes: it takes two to tango. **Genes Dev** 11:2600-2621.
- Roeder GS, Bailis JM. 2000. The pachytene checkpoint. **Trends Genet** 16: 395-403.

- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146:905-915.
- Salido S, Yen PH, Mohandas TK, Shapiro LJ. 1992. Expresión of X-inactivation-associated gene XIST during spermatogenesis. *Nature Genet* 2:196-199.
- Savage A, Feingold E, Broman KW, Sherman SL. 2000. Genome-wide variation in recombination in female meiosis: a risk factor for non-disjunction of chromosome 21. *Hum Mol Genet* 9:515-523.
- Scherthan H, Weich S, Schwegler H, Heyting C, Härle M, Cremer T. 1996. Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol* 134:1109-1125.
- Schmekel K. 2000. Methods for immunoelectron microscopic and fine structural analysis of synaptonemal complexes and nodules in yeast. *Chromosoma* 109:110-116.
- Schmuckli-Maurer J, Heyer Wolf-Dietrich. 2000. Meiotic recombination in RAD54 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* 109:86-93.
- Schwacha A, Kleckner N. 1997. Interhomolog bias during meiotic recombination: meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog-only pathway. *Cell* 90:1123-1135.
- Shinohara M, Shita-Yamaguchi E, Buerstedde JM, Shinagawa H, Ogawa H, Shinohara A. 1997. Characterization of the roles of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD54 gene and a homologue of Rad54, RDH54/TID1, in mitosis and meiosis. *Genetics* 147:1545-56.
- Shonn MA, McCarroll R, Murray AW. 2000. Requirement of the Spindle checkpoint for proper chromosome segregation in budding yeast meiosis. *Science* 14:300-303.
- Sluder G, McCollum D. 2000. The Mad ways of meiosis. *Science* 289:254-255.
- Smith A, Benavente R. 1992. Meiosis specific protein selectively associated with sex chromosomes of rat pachytene spermatocytes. *Proc Natl Acad Sci* 89:6938-6942.
- Smith A, Benavente R. 1995. An Mr 51,000 protein of mammalian spermatogenic cells that is common to the whole XY body and centromeric heterochromatin of autosomes. *Chromosoma* 103:591-598.
- Smith AV, Roeder GS. 1997. The yeast Red1 protein localization to the cores of meiotic chromosomes. *J Cell Biol* 136:957-967.
- Smith KN, Nicolas A. 1998. Recombination at work for meiosis. *Curr Opin Genet Dev* 8:200-211.
- Snustad PD, Simmons MJ. 2000. Principles of Genetics. 2<sup>a</sup> ed. John Wiley and Sons Inc. 167-189.
- Solari AJ. 1974. The behaviour of the XY pair in mammals. *Int Rev Cytol* 38:273-317.
- Speed RM, Chandley AC. 1990. Prophase of meiosis in human spermatocytes analysed by EM microspreading in infertile men and their controls and comparison with human oocytes. *Hum Genet* 84:547-554.
- Speed RM, Vogt P, Köhler MR, Hargreave TB, Chandley AC. 1993. Chromatin condensation behaviour of the Y chromosome in the human testis. *Chromosoma* 102:421-427.
- Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH. 1996. Aneuploidy in human sperm: The use of multicolor FISH to test various theories of nondisjunction. *Am J Hum Genet* 58:356-362.

- Storlazzi A, Xu L, Cao L, Kleckner N. 1995. Crossover and noncrossover recombination during meiosis: Timing and pathway relationships. **Proc Natl Acad Sci** 92:8512-8516.
- Sybenga J. 1999. What makes homologous chromosomes find each other in meiosis? A review and an hypothesis. **Chromosoma** 108:209-219.
- Sym M, Engebrecht J, Roeder GS. 1993. ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. **Cell** 72:365-378.
- Sym M, Roeder GS. 1994. Crossover interference is abolished in the absence of a synaptonemal complex protein. **Cell** 79:283-292.
- Sym M, Roeder GS. 1995. Zip1-induced changes in synaptonemal complex structure and polycomplex assembly. **J Cell Biol** 128:455-466.
- Tease CH, Hartshorne GM, Hultén. 2002. Patterns of meiotic recombination in human fetal oocytes. **Am J Hum Genet** 70:1469-1479.
- Thacker J. 1999. A surfeit of RAD51-like genes? **Trends Genet** 15:166-168.
- Therman E, Susman M. 1993. Human Chromosomes. 3<sup>th</sup> ed. Springer-Verlag New York. 165-202.
- Trelles-Sticken E, Dresser EM, Scherthan H. 2000. Meiotic telomere protein Ndj1p is required for meiosis-specific telomere distribution, bouquet formation and efficient homologue pairing. **J Cell Biol** 151:95-106.
- Turner JMA, Mahadevaiah SK, Benavente R, Offenberg HH, Heyting C, Burgoyne PS. 2000. Analysis of male meiotic "sex body" proteins during XY female meiosis provides new insights into their functions. **Chromosoma** 109:426-432.
- Villeneuve AM, Hillers KJ. 2001. Whence meiosis? **Cell** 106:647-650.
- Watanabe Y, Nurse P. 1999. Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. **Nature** 400:461-464.
- Walker MY, Hawley SR. 2000. Hanging on to your homolog: the roles of pairing, synapsis and recombination in the maintenance of homolog adhesion. **Chromosoma** 109:3-9.
- Weiner BM, Kleckner N. 1994. Chromosome pairing via multiple interstitial interactions before and during meiosis in yeast. **Cell** 77:977-991.
- Zetka M, Rose A. 1995. The genetics of meiosis in *Caenorhabditis elegans*. **Trends Genet** 11:27-31.
- Zickler D, Kleckner N. 1998. The leptotene-zigotene transition of meiosis. **Annu Rev Genet** 32:619-97.
- Zickler D, Kleckner N. 1999. Meiotic chromosomes: Integrating structure and function. **Annu Rev Genet** 33:603-754.

## VII APÉNDICE

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución 20XSSC (pH 5.3) 500 ml

87.66 g de NaCl

44.11 g de Citrato de Sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

400 ml con agua destilada

Ajustar el pH a 5.3 con HCl concentrado

Aforar a 500 ml con agua destilada

Filtrar con filtro de 0.45 micras

Almacenar a temperatura ambiente

Solución 2XSSC 1 litro

100 ml de la solución 20XSSC

850 ml de agua destilada

Ajustar el pH a 7.0 – 7.5 con NaOH

Aforar a 1 litro con agua destilada

Almacenar a temperatura ambiente

Solución 2XSSC/0.1% NP-40 (pH 7.0 – 7.5) 1 litro

100 ml de la solución 20XSSC

850 ml de agua destilada

Agregar 1 ml de NP-40

Ajustar el pH a 7.0 – 7.5 con NaOH

Aforar a 1 litro con agua destilada

Almacenar a temperatura ambiente

**Solución Formamida 50%/2XSSC (pH 7.0 – 8.0) 210 ml**

105 ml de formamida grado ultrapuro

21 ml de 20XSSC

84 ml de agua destilada

Ajustar el pH entre 7.0 – 8.0

Almacenar a 4 °C.

Utilizar la solución sólo durante siete días.

**Solución Etanol 70%, 85% y 100%**

V/V etanol 100% con agua destilada

Almacenar a temperatura ambiente

Utilizar la solución sólo durante siete días.

**Solución contratinción DAPI II**

125 ng/ml