

5 00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS

**PARTICIPACIÓN DEL ARN Y ADN  
EN EL APAREAMIENTO  
DE LOS CROMOSOMAS HOMÓLOGOS  
DURANTE LA PROFASE MEIÓTICA**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Rosario Ortiz Hernández

FECHA: 30 septiembre 2002

FIRMA: Rosario Ortiz H.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**ROSARIO ORTIZ HERNÁNDEZ**



DIRECTOR DE TESIS:  
DR. GERARDO HEBERT VÁZQUEZ NIN

MÉXICO, D.F., SEPTIEMBRE 2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 1 de julio de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado del Doctorado en Ciencias del alumno(a) Rosario Ortiz Hernández, con número de cuenta 77313304 y número de expediente 3931136, con la tesis titulada: "**Participación del ARN y ADN en el apareamiento de los cromosomas homólogos durante la profase meiótica..**", bajo la dirección del (la) Dr. Gerardo Herbert Vázquez Nin.

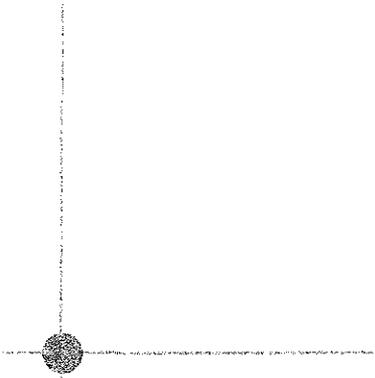
Presidente:	Dr. Gerardo Herbert Vázquez Nin
Vocal:	Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
Vocal:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Vocal:	Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano
Secretario:	Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano
Suplente:	Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez
Suplente:	Dra. Sara Frías Vázquez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 2 de septiembre de 2002

  
Dra. Tila María Pérez Ortiz  
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado



Agradezco a los doctores miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis y haber aportado comentarios para mejorarla, les agradezco particularmente la disposición que tuvieron en todo este tiempo

Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano

Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez

Dra. Sara Frías Vázquez

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. El desarrollo del proyecto de investigación contó con el apoyo de la UNAM, PAPIIT No. IN227398, y de la Dirección General de Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM No. 201322. Además de una beca para estudios de posgrado de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM.

# PARTICIPACIÓN DEL ARN Y ADN EN EL APAREAMIENTO DE LOS CROMOSOMAS HOMÓLOGOS DURANTE LA PROFASE MEIÓTICA

Alumna: Rosario Ortiz Hernández  
Director de Tesis: Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin

## ÍNDICE

I.1 Resumen	1
I.2 Abstract	3
II Introducción	5
II.1 Generalidades de la meiosis	5
II.2 Etapas de la profase meiótica I	6
II.3 Ultraestructura del Complejo Sinaptonémico	10
II.4 Citoquímica del Complejo Sinaptonémico	12
II.4a Proteínas	12
II.4b Ácidos Nucleicos	16
II.5 Síntesis de Ácidos Nucleicos durante la profase meiótica I	17
II.6 Alineamiento y Apareamiento de los cromosomas meióticos	18
II.7 Significado citofisiológico del complejo sinaptonémico	20
III. Justificación	22
IV. Objetivos	23
V. Material y Métodos	24
V.1 Procesamiento del material biológico microscopía electrónica	24
V.1.1 Procesamiento estándar	24
V.1.2. Fijación hipotónica y tratamiento con ARNasa	24
V.1.3. Procesamiento para inmunolocalización	24
V.1.4 Procesamiento para hibridación <i>in situ</i>	25
V.1.5 Corte	25
V.1.6 Métodos de contraste	25
V.2 Reconstrucción tridimensional	25
V.3 Inmunolocalización	26
V.4 Hibridación <i>in situ</i> ultraestructural	26
V.4.1 Extracción del ADN genómico	26
V.4.2 Marcaje del ADN genómico de cobayo y de rata	27
V.4.3 Hibridación <i>in situ</i> ultraestructural con ADN genómico de cobayo y rata	28
V.5 Autorradiografía óptica	29
VI. Resultados	33
VI.1 Ultraestructura de las etapas de la profase meiótica I	33
VI.2 Inmunolocalización	53
VI.3 Hibridación <i>in situ</i> ultraestructural	54
VI.4 Autorradiografía óptica	55
VII. Discusión	57
VIII. Conclusiones	63
IX. Perspectivas	64
X. Referencias	65
XI. Agradecimientos	74
XII. Dedicatorias	75
XIII. Lista de Abreviaturas	76

# PARTICIPACIÓN DEL ARN Y ADN EN EL APAREAMIENTO DE LOS CROMOSOMAS HOMÓLOGOS DURANTE LA PROFASE MEIÓTICA

Alumna: Rosario Ortiz Hernández  
Director de Tesis: Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin

## ÍNDICE

I.1 Resumen	1
I.2 Abstract	3
II Introducción	5
II.1 Generalidades de la meiosis	5
II.2 Etapas de la profase meiótica I	6
II.3 Ultraestructura del Complejo Sinaptonémico	10
II.4 Citoquímica del Complejo Sinaptonémico	12
II.4a Proteínas	12
II.4b Ácidos Nucleicos	16
II.5 Síntesis de Ácidos Nucleicos durante la profase meiótica I	17
II.6 Alineamiento y Apareamiento de los cromosomas meióticos	18
II.7 Significado citofisiológico del complejo sinaptonémico	20
III. Justificación	22
IV. Objetivos	23
V. Material y Métodos	24
V.1 Procesamiento del material biológico microscopía electrónica	24
V.1.1 Procesamiento estándar	24
V.1.2. Fijación hipotónica y tratamiento con ARNasa	24
V.1.3. Procesamiento para inmunolocalización	24
V.1.4 Procesamiento para hibridación <i>in situ</i>	25
V.1.5 Corte	25
V.1.6 Métodos de contraste	25
V.2 Reconstrucción tridimensional	25
V.3 Inmunolocalización	26
V.4 Hibridación <i>in situ</i> ultraestructural	26
V.4.1 Extracción del ADN genómico	26
V.4.2 Marcaje del ADN genómico de cobayo y de rata	27
V.4.3 Hibridación <i>in situ</i> ultraestructural con ADN genómico de cobayo y rata	28
V.5 Autorradiografía óptica	29
VI. Resultados	33
VI.1 Ultraestructura de las etapas de la profase meiótica I	33
VI.2 Inmunolocalización	53
VI.3 Hibridación <i>in situ</i> ultraestructural	54
VI.4 Autorradiografía óptica	55
VII. Discusión	57
VIII. Conclusiones	63
IX. Perspectivas	64
X. Referencias	65
XI. Agradecimientos	74
XII. Dedicatorias	75
XIII. Lista de Abreviaturas	76

## I.1 RESUMEN

Durante la meiosis los cromosomas homólogos llevan a cabo apareamiento, sinapsis, recombinación y segregación. El mecanismo por medio del cual se encuentran los cromosomas homólogos durante la meiosis es aún desconocido y las teorías propuestas no han explicado cómo se reconocen los homólogos a varios micrómetros de distancia. El objetivo de este trabajo fue localizar el ARN y el ADN en los núcleos de las células germinales premeióticas y durante la profase meiótica I. Se estudiaron núcleos de espermatogonias tipo B y espermatocitos primarios de testículo de cobayo y de rata, por medio de reconstrucciones tridimensionales a nivel de microscopía electrónica, citoquímica ultraestructural, inmunolocalización para ADN, ARN polimerasa II, hnRNPs, snRNP y *trimetil-guanosin cap*, hibridación *in situ* para ARN, y autorradiografía óptica cuantitativa. Las observaciones realizadas demuestran que los núcleos de las espermatogonias tipo B presentan características muy particulares que no corresponden a la morfología de otros tipos celulares en interfase. Existen dos tipos de disposición particular de la cromatina: 1) caracterizado por arreglos paralelos y lineales de cromatina semicompacta y laxa que recorren largas extensiones del volumen nuclear y 2) que muestra la presencia de pequeñas estructuras plumuladas formadas por cromatina laxa. En estas estructuras plumuladas por medio de citoquímica ultraestructural, inmunolocalización e hibridación *in situ*, se localizó ARN y ADN, además de ARN polimerasa II y hnRNPs lo que demuestra que se encuentran en proceso de transcripción, aunque el proceso de *splicing* es escaso. Durante el preleptoteno es notable la descompactación de la cromatina y la presencia de múltiples estructuras plumuladas, las cuales se alinean en paralelo. Frecuentemente las estructuras plumuladas alineadas en paralelo se relacionan por medio de filamentos radiales que las unen atravesando el espacio entre ellas semejando una *escalera de doble cuerda*. La citoquímica ultraestructural demostró que las escaleras de doble cuerda están constituidas por ADN y RNP. Cuando el material se fijó con detergente en condiciones hipotónicas y tratadas con ARNasa, se evidenció un vacío entre los dos ejes de las *escaleras de doble cuerda*, lo que demostró que una parte de la región central (zona de reconocimiento), en la que se localizan los filamentos radiales de las estructuras plumuladas están constituidos por RNPs. La inmunolocalización y la hibridación *in situ* mostraron características similares a las observadas en las espermatogonias tipo B. En el leptoteno continuó la presencia de las estructuras plumuladas dispuestas en paralelo. Durante esta etapa las estructuras plumuladas están constituidas por dos filamentos axiales rodeados por filamentos radiales que contienen ADN y RNP. La asociación de los dos filamentos axiales constituyen una estructura plumulada común, que forma el eje cromosómico leptoténico. Cuando se inicia la organización del elemento axial a partir de los ejes cromosómicos estos ya se encuentran alineados y apareados, conservando además la estructura plumulada. El proceso de transcripción continúa en los filamentos radiales, así como en los elementos axiales leptoténicos y el *splicing* sigue siendo escaso. La elongación de los

elementos axiales alineados coincide con el apareamiento final, por lo que el desarrollo del CS es simultánea al crecimiento del elemento axial en un estado continuo de leptoteno-cigoteno. Una característica notable del inicio de la sinapsis es la formación de un espacio de exclusión de la cromatina y RNP en la región central entre los dos elementos axiales que dan origen a los dos elementos laterales. Durante este periodo se dan cambios notables en la distribución de la cromatina que se manifiestan por: 1) establecimiento del espacio de exclusión; 2) conformación de asas cortas que se incorporan en los elementos laterales del complejo sinaptonémico y el 3) comienzo de compactación de la cromatina que rodea al complejo sinaptonémico. Los extremos de los CS en desarrollo se observaron en ocasiones en continuidad con las estructuras plumuladas o de *escaleras de doble cuerda*. Conforme avanza la etapa de paquiteno la cromatina que envuelve al CS progresivamente se hace más compacta. Los resultados obtenidos con la autorradiografía cuantitativa demuestran una intensa transcripción en las espermatogonias tipo B y los espermatocitos en las etapas iniciales de la profase meiótica, acompañada por una lenta exportación del ARN al citoplasma. Todos estos resultados nos permiten sugerir que el ARN está involucrado en un proceso aun no descrito y que puede ser esencial para el apareamiento de los cromosomas homólogos. Consideramos que el ARN sintetizado en las estructuras plumuladas a partir de espermatogonias tipo B, inicia la búsqueda de homología y reconocimiento de los cromosomas homólogos a larga distancia. Los resultados de hidrólisis enzimáticas e hibridación *in situ* para detectar la presencia de ARN y la autorradiografía óptica cuantitativa, sugieren que el ARN recién sintetizado pudiera estar relacionado con el reconocimiento de secuencias en las etapas iniciales de la profase meiótica I.

## I.2 ABSTRACT

During meiosis homologue chromosomes undergo pairing, synapses, recombination and segregation. The mechanism by which chromosomes get together during meiosis is still unknown. Proposed theories have not explained how homologues recognize one another from a distance of several micrometers. The objective of the present work was to localize the RNA and DNA within the nuclei of premeiotic germ cells and during meiotic prophase I. Nuclei from type B spermatogonia and primary spermatocytes from guinea pig and rat testis were studied using 3D reconstruction at electron microscopy level and ultrastructural cytochemistry. Immunolocalization of DNA, RNA Pol II, hnRNP's, snRNP's and trimethyl-guanosin cap, RNA *in situ* hybridization and quantitative optical autoradiography were performed. Our observations show that nuclei from type B spermatogonia present very particular features that do not correspond to the morphology of other cellular types during interphase. There are two forms of chromatin arrangement: 1) characterized by parallel and lineal semicompact and extended chromatin, which may be longer than a half the nuclear diameter, and 2) those which show the presence of small lampbrush structures made of decondensed chromatin. DNA, RNA, RNA Pol II and hnRNP's were localized in lampbrush structures using *in situ* hybridization and immunocytochemistry. These results demonstrate that lampbrush structures are transcriptionally active though splicing level is low. During pre-leptotene, chromatin decondensation and the presence of multiple lampbrush structures which anneal in parallel is remarkable. Frequently, pairs of lampbrush structures are aligned in parallel and related by radial filaments and loops forming structures resembling micro-rope-ladders. Ultrastructural cytochemistry revealed that the micro-rope-ladders are constituted of DNA and RNP's. Samples fixed under hypotonic conditions using detergent and RNase treatment, were void in the region between axis of the *micro-rope-ladders*, showing that the central region (recognizing zone), where the radial filaments of the lampbrush structures are localized, are constituted of RNP's. Immunolocalization and *in situ* hybridization show similar features as in type B spermatogonia. In leptotene, lampbrush structures disposed in parallel were still present. During this period, the lampbrush structures are constituted of two axial filaments surrounded by radial filaments, which contain DNA and RNA. Association of two axial filaments constitutes a common lampbrush structure, that forms the leptotene chromosomal axis. When organization of the axial element starts from the chromosomal axes, these are already aligned and paired, conserving the lampbrush structure. The transcription process takes place in the radial filaments and in the leptotenic axial elements although splicing level is low. The elongation of aligned axial elements coincides with the final pairing, thus, the development of CS is simultaneous to the growth of the axial element in a continuous phase of leptotene-zygotene. An important feature at the beginning of the synapse is the formation of a zone that excludes chromatin and RNP from the central region between axial elements which make up the two lateral elements. During this period there are significant changes

in chromatin distribution: 1) the establishment of an exclusion zone; 2) the conformation of short hairpins that incorporate into the lateral elements of the synaptonemal complex, and 3) the onset of compactation of the chromatin that surrounds the synaptonemal complex. The extremes of the CS in development were occasionally observed in continuity either with lampbrush structures or *micro-rope-ladders*.

During the course of pachytene, the chromatin that surrounds the CS, got compacted in a progressive way. Quantitative autoradiography results showed high transcription level and low RNA exportation to the cytoplasm in type B spermatogonia and in spermatocytes at the beginning of the meiotic prophase. Present results suggest that RNA is involved in a process not yet described that could be essential to homologue chromosome pairing. We consider that RNA synthesized in the lampbrush structures of type B spermatogonia begins the search for homology and recognition of homologue chromosomes at long distance. Results from enzymatic hydrolysis and *in situ* hybridization suggest that newly synthesized RNA could be related to sequence recognition during the beginning of the meiotic prophase I.

## II. INTRODUCCIÓN

### II. 1 Generalidades de la meiosis

Algunos organismos unicelulares y pluricelulares se reproducen por división directa o por mitosis, de forma que las células hijas son genéticamente iguales a la progenitora. En este mecanismo de reproducción no interviene el sexo, por lo que se denomina reproducción asexual. Un mecanismo más complejo de reproducción es la reproducción sexual, la cual está mediada por algunas células de los órganos reproductores masculinos y femeninos. Este mecanismo exige que células diploides, mediante un proceso denominado meiosis (del griego *meioun* que significa disminuir), formen células haploides llamadas gametos (Prescott, 1976; Paniagua *et al.*, 1993). La reproducción sexual está extendida en los eucariontes porque permite una evolución más eficaz de los organismos. Esta mayor eficacia de la reproducción sexual respecto de la asexual reside en la rapidez con la cual los organismos sexuados pueden adquirir combinaciones ventajosas de genes (Solarí, 1999). La capacidad de los organismos sexuados de obtener combinaciones génicas favorables se debe a una característica esencial de la meiosis, la *recombinación genética*.

Hemos mencionado que la meiosis es el proceso por medio del cual el número de cromosomas se reduce, de modo que se forman células que sólo contienen un miembro de cada par de cromosomas homólogos (Moens, 1994).

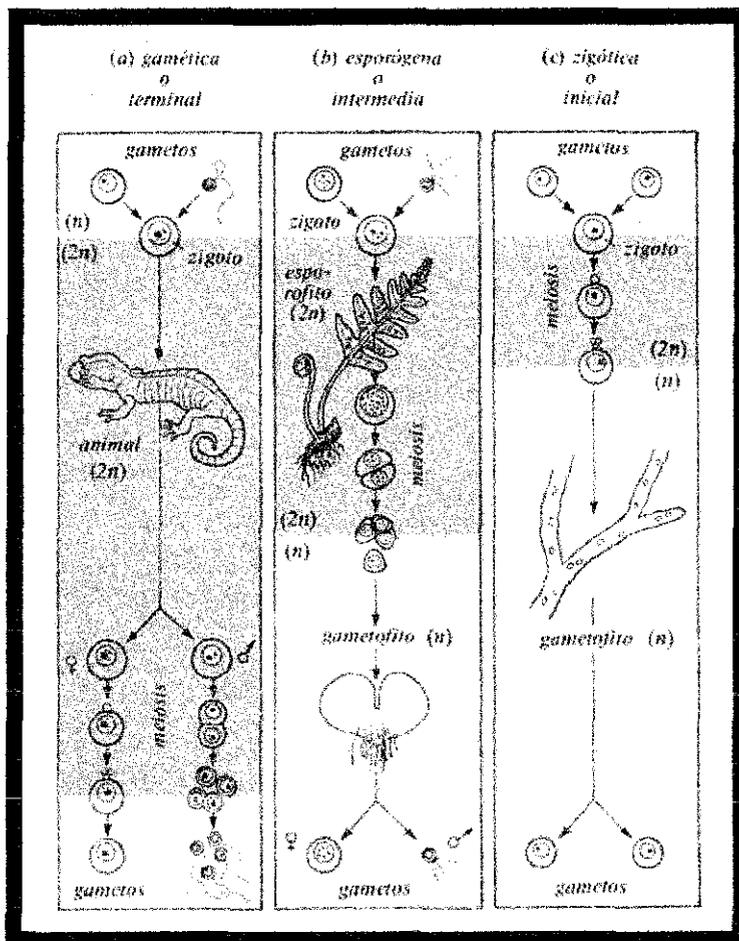
A diferencia de la mitosis, en la cual los cromosomas se duplican y luego se dividen entre dos núcleos de las células hijas en una sola división, en la meiosis la duplicación de los cromosomas va seguida por dos divisiones sucesivas conocidas como división meiótica I y división meiótica II que distribuyen los cromosomas entre cuatro núcleos de las células hijas resultantes (gametos) (Moens, 1994; Kleckner, 1997).

En la meiosis dos eventos se destacan, haciendo de ellos características únicas de este proceso que se da en la reproducción sexual:

- 1.- El alto grado de recombinación genética.
- 2.- La división reduccional que tiene lugar.

Como consecuencia de la meiosis, los hijos son genéticamente distintos a sus progenitores. Incluso los gametos procedentes de una misma meiosis difieren genéticamente entre sí debido al intercambio de material genético que tiene lugar por la recombinación genética que se produce durante la división meiótica I (Prescott, 1976). La duración de la meiosis es superior con respecto a la mitosis dentro de una misma especie (Solarí, 1999).

Wilson en 1925 clasificó a los organismos que se reproducen sexualmente en tres tipos, según el lugar que ocupa la meiosis en el ciclo de vida de los organismos (Esquema 1). La primera denominada meiosis terminal o gamética, la segunda meiosis intermedia o esporógena y la tercera inicial o cigótica (Wolfe, 1972; Kleckner, 1997; Zickler y Kleckner, 1998).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Esquema 1

Los tres tipos de meiosis, según Wilson. La zona sombreada corresponde a la fase diploide del ciclo de vida (Tomado de Wolfe, 1972)

La meiosis es un proceso complejo, cuyos aspectos moleculares recientemente se han comenzado a comprender. Los estudios que se han realizado han abordado a la meiosis desde diferentes puntos de vista, lo cual ha permitido relacionarla con otros procesos básicos en el organismo. A pesar del conocimiento que se ha generado en los últimos años acerca del proceso meiótico, aun existen aspectos que no han sido resueltos, además de que ha sido difícil conciliar la información citológica, genética, bioquímica y molecular relacionadas con la meiosis (Moens, 1994).

## II. 2. Etapas de la Profase Meiótica

Hemos ya mencionado que la meiosis consiste en dos divisiones denominadas división meiótica I y división meiótica II. Desde un punto de vista formal, cada una de las divisiones meióticas se dividen en estadios denominados: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. De todos

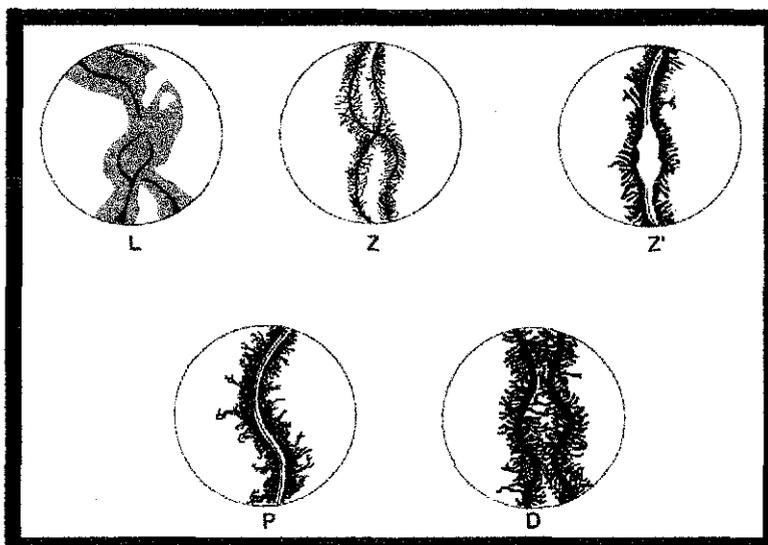
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

los estadios, el más largo y complejo es la profase I (Solari, 1999). La importancia de la profase meiótica I radica en que se lleva a cabo el reconocimiento, apareamiento, sinapsis y recombinación genética de los cromosomas homólogos. Estos eventos son comunes de la profase I en la mayoría de los eucariontes que se reproducen sexualmente (Darlington 1931; Rhoades 1961; John, 1990). La profase meiótica I se divide en cinco etapas: leptoteno, cigoteno, paquíteno, diploteno y diacinesis (Esquema 2). El paso de una etapa a otra es un proceso continuo (Paniagua *et al.*, 1993; Solari, 1999), aunque es importante señalar que se han descrito etapas previas al leptoteno, denominadas como preprofase y preleptoteno.

### Preprofase.

Se ha visto que el ciclo meiótico se inicia en los espermatocitos que se encuentran en una condición premeiótica, que juzgan como una etapa G1/G0 del ciclo celular, que se caracteriza por una marcada expansión del núcleo. La fase S meiótica o fase S premeiótica morfológicamente se ha caracterizado por presentar cromatina laxa y algunos cuantos grumos de cromatina compacta. Los eventos moleculares de la fase S meiótica son análogos a la fase S mitótica, aunque con una diferencia muy notable en cuanto a su duración. Son pocos los organismos en los que se ha medido la fase S premeiótica, sin embargo las observaciones realizadas indican que esta fase S es mucho más larga que en las células somáticas (Callan, 1972). Esta diferencia en el tiempo empleado en la síntesis de ADN durante la meiosis, se debe a que se utilizan menos replicones que en la mitosis, además de que se da una replicación incompleta del ADN, pues aproximadamente 0.3% del ADN queda sin replicarse y sólo se replica una vez iniciada la meiosis. Por ejemplo en *T. vulgaris* la fase S en las células de la blástula se realiza en una hora, mientras que en la fase S premeiótica es de 200 horas. (Callan, 1972).

En algunos organismos se ha descrito el apareamiento de los cromosomas homólogos durante este periodo, el cual se pierde durante la fase S para posteriormente reestablecerse (Zickler y Kleckner, 1998).



Esquema 2.

Desarrollo de los ejes axiales y complejos sinaptonémicos durante el estadio de la profase I. Etapas de la profase I: L leptoteno; Z, cigoteno; P paquíteno; D diploteno. (Tomado de Solari, 1999).

### **Preleptoteno.**

Durante el preleptoteno, que para algunos autores corresponde al periodo G2 del ciclo celular, se observan las características de un núcleo en interfase. En general, durante esta etapa los cromosomas son todavía muy delgados y difíciles de observar (Paniagua *et al.*, 1993; Solari 1999). Otro planteamiento que se ha hecho respecto a la cromatina en etapas premeióticas es el concerniente con el modelo de orientación Rabl, el cual establece que el núcleo en interfase presenta dominios, los cuales se mantienen en las etapas previas a la meiosis, esto se ha descrito para algunos organismos (Fusell, 1987), aunque en el caso de las células de mamíferos esta orientación no existe (Scherthan *et al.*, 1996, 1998).

Curiosamente en algunas levaduras durante el preleptoteno los cromosomas homólogos ya se encuentran apareados, esto se ha visto en células en dispersión, a diferencia de los mamíferos en donde no existe dicho apareamiento (Anderson *et al.*, 1999).

### **Leptoteno.**

Durante el leptoteno los cromosomas son más delgados y largos que en la mitosis. En ellos se observan engrosamientos de distribución en forma de rosario y densa, denominados cromómeros. Corresponden a regiones de condensación del ADN e histonas. Los cromómeros van a permanecer hasta la constitución del cromosoma, pero entonces ya no se distinguirán bien, pues los diversos plegamientos de la cadena de nucleosomas van a hacer que queden cada vez más densas y destaquen menos. En los cromosomas totalmente configurados, algunos cromómeros parecen corresponder a las zonas teñidas con las técnicas de bandeado. Los cromosomas leptoténicos tienen una distribución bien definida. Frecuentemente, forman asas cuyos extremos se unen a la envoltura nuclear en un punto cercano al centrosoma. La cromatina aparece todavía laxa (Paniagua *et al.*, 1993; Solari, 1999).

Las cromátidas hermanas están estrechamente empaquetadas, extendiéndose a lo largo de los elementos axiales en una serie de bucles. Las asas de cromatina tienden a unirse en ciertas regiones de los elementos axiales que tienen un centro electrodenso. Los extremos de los elementos axiales relacionados con los telómeros se unen a la envoltura nuclear, constituyendo una estructura denominada placa de adhesión, que está acompañada por la redistribución de los poros nucleares, que pierden su distribución homogénea, tendiendo a acumularse en los sitios de fijación de los telómeros (Schuis-Schaefer, 1980; Swanson *et al.*, 1981). En muchos organismos, en este estadio puede verse una disposición peculiar denominada bouquet, en la que los extremos de los cromosomas están unidos a la envoltura nuclear en puntos cercanos a los centriolos. El resto del cromosoma se extiende como un lazo en el núcleo (Zickler y Kleckner, 1998). Se ha sugerido que una vez que se han organizado los dominios cromosómicos, los telómeros se adhieren y se agrupan a la envoltura nuclear para aumentar la probabilidad de encontrar a su homólogo, siendo por lo tanto un sitio importante para el apareamiento de los cromosomas meióticos (Scherthan *et al.*, 1994; Heyting, 1996). En el hombre los centrómeros son las primeras estructuras que se adosan a la envoltura nuclear siguiendo los telómeros (Heyting, 1996). Los centrómeros y telómeros contienen secuencias especiales de ADN que son esenciales para el

mantenimiento y la segregación de los cromosomas; por lo que se piensa que esto puede contribuir a la organización espacial de los cromosomas en el núcleo (Scherthan, *et al.*, 1994). En esta etapa del leptoteno se ha demostrado la presencia de la recombinasa Rad51 unida a filamentos de ADN por inmunomarcaje (Plug *et al.*, 1996).

### **Cigoteno.**

El inicio del cigoteno se distingue por la aparición de segmentos apareados de ejes simples, que constituyen el inicio de un complejo sinaptonémico (CS). El grado de condensación de los cromosomas aumenta en relación al estadio anterior, por lo que los cromosomas se observan más cortos en longitud y de mayor diámetro. Los dos homólogos no se unen durante el apareamiento, pues permanecen separados por un espacio de 100 nm aproximadamente. El apareamiento puede comenzar en cualquier sitio del cromosoma, pudiendo unirse por sus telómeros y continuar apareándose hacia el otro extremo, o iniciar en las regiones internas y avanzar hacia los extremos, o incluso llevarse a cabo de manera simultánea en varios puntos a lo largo de los cromosomas. En los organismos en que los cromosomas forman el bouquet, regularmente el apareamiento se inicia en estas regiones terminales (Paniagua *et al.*, 1993; Solari, 1999). Es muy probable, que en estas etapas de la profase meiótica, los cromosomas homólogos se identifiquen unos con otros y se recombinen ya que los cromosomas aún están relativamente extendidos (Kleckner, 1996). Se ha propuesto también que la iniciación de la sinapsis que se observa en esta etapa, esté mediada por la presencia de la recombinasa Rad51 (Plug *et al.*, 1996). El cigoteno dura hasta que se completa la sinapsis de los elementos axiales, con lo cual se inicia el paquiteno.

### **Paquiteno.**

Este es un estadio largo e importante, que está caracterizado por la permanencia del complejo sinaptonémico (CS) durante todo el periodo, en el cual se lleva a cabo el entrecruzamiento. Durante el paquiteno los cromosomas homólogos permanecen unidos, haciéndose progresivamente más cortos y gruesos mientras continúa la condensación. En el paquiteno medio la configuración de bouquet y el conglomerado de los poros nucleares se pierde. Hacia el final del paquiteno, esta espiralización y condensación progresivas pueden dar como resultado un acortamiento de los cromosomas a un cuarto o un sexto de la longitud que tenían en el leptoteno. (Paniagua *et al.*, 1993; Solari, 1999)

### **Diploteno.**

En el diploteno los CS se disocian; el espacio central se agranda y sus componentes desaparecen; por lo que la tendencia de los homólogos es alejarse lo más que se pueda excepto en la posición del quiasma; este punto representa el resultado final de los intercambios (recombinación) entre los cromosomas homólogos. El número y posición de los quiasmas varía en los organismos, sin embargo, existe por lo menos un quiasma por tétrada. En los meiocitos este estadio está caracterizado por una progresiva descompactación de la cromatina y la desaparición del CS. Los límites de los

## TESIS CON FALLA DE ORIGEN

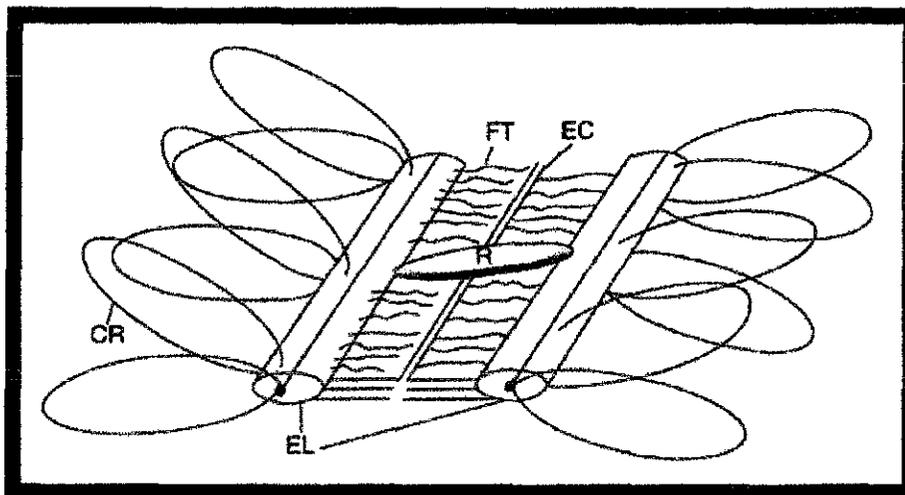
cromosomas son menos definidos y la cromatina en la región de los brazos laterales aparece como fibras esparcidas. Al mismo tiempo, se observa un incremento de estructuras que contienen ribonucleoproteínas (RNP), aparecen fibras pericromatinianas en el área de la cromatina extendida, y los gránulos pericromatinianos son escasos (Vázquez-Nin y Echeverría, 1976).

### **Diacinesis.**

En la diacinesis los cromosomas homólogos, nuevamente se vuelven a enrollar (Moens, 1994; Kleckner, 1996). En muchas especies en este estadio desaparece el nucleolo y las tétradas se distribuyen más o menos por igual dentro del núcleo. En algunos organismos los cambios que sufre el núcleo dan la apariencia de un núcleo interfásico.

### **II. 3. Ultraestructura del Complejo Sinaptonémico.**

El Complejo Sinaptonémico (CS) tiene una estructura general muy conservada a lo largo de la evolución, con pocas variantes. El CS fue descrito en 1956 con trabajos independientes de Moses (1956) y Fawcett (1956). El CS alcanza su máxima estructuración durante el paquitenio y desde el punto de vista morfológico es una estructura tripartita, constituida por elementos laterales, los elementos transversos y el elemento central. La morfología básica del complejo en sección longitudinal es la misma para todas las plantas y animales y está formada por tres elementos paralelos (Schmekel y Daneholt, 1995) (Esquema 3).



Esquema 3.

Estructura del complejo sinaptonémico. CR: cromatina; EL: elementos laterales; EC: elemento central; FT: filamentos transversales; R: nódulo de recombinación. (Tomado de Solar, 1999)

El CS se desarrolla por el alineamiento paralelo o sinapsis de los elementos axiales de los cromosomas homólogos. La primera manifestación de sinapsis entre los cromosomas homólogos es la conformación de un espacio de exclusión, posteriormente este espacio es ocupado por filamentos transversales entre los ejes que aun se encuentran a una distancia de 300 nm, tres

veces más que la distancia final. Esto sucede en uno o más lugares a los largo del eje y en cercanías a la envoltura nuclear (Moens *et al.*, 1998).

El CS mide aproximadamente 210 nm de ancho, los elementos laterales tienen un grosor de 60 nm aproximadamente y el espacio central tiene alrededor de 100 nm. Los elementos laterales están constituidos por un material amorfo y muy afín a las tinciones de plata y ácido fosfotúngstico, características que dependen de su contenido de proteínas básicas (Solari, 1999). Cada elemento lateral se observa como un filamento sencillo formado por la reunión de dos cromátidas hermanas; su ancho varía de acuerdo al organismo de que se trate, por lo que el rango está entre los 20 y 60 nm (Jones, 1973). En el espacio de apareamiento central se encuentran los filamentos transversales de 5 nm de diámetro aproximadamente, los cuales dan la apariencia de salir de los elementos laterales. El elemento central es paralelo a los elementos laterales, contiene muy poco o carece de ácidos nucleicos por lo que es resistente al tratamiento con ADNasa, sensible a proteasa e insoluble en altas concentraciones de NaCl (Solari, 1972). Su grosor es de 30 nm se localiza en la parte central del espacio de apareamiento, tiene menor densidad que los elementos laterales y mayor que los transversos (Moses, 1968; 1969; Esponda, 1981; Vázquez Nin *et al.*, 1993). Se ha observado que el CS está asociado con la envoltura nuclear. Los elementos laterales al unirse con la membrana interna se ensanchan adquiriendo forma de embudo, fácilmente visible en los cortes al microscopio electrónico. En espermatoцитos de ratón durante el paquiteno por medio de hibridaciones *in situ* se ha demostrado la presencia de secuencias de repetición telomérica  $(TTAGGG)_n$  en estas estructuras en forma de embudo, denominadas placas de adhesión asociadas a la envoltura nuclear (Zickler y Kleckner, 1998). En la zona donde se establece la unión con la envoltura nuclear se produce una protuberancia hacia el citoplasma. El espacio entre ambas membranas está atravesado por filamentos muy finos (4-6 nm) que van desde los elementos laterales hasta el citoplasma adyacente a la asociación (Moses, 1969; Esponda y Jimenez-Martín, 1973). También en diferentes especies se han descrito asociaciones del CS con el nucleolo (Esponda y Jiménez-Martín, 1975; Pathak y Hsu, 1979).

Carpenter en 1975 en ovocitos de *Drosophila melanogaster* describió los nódulos de recombinación, a que los que relacionó con el entrecruzamiento (Zickler y Kleckner, 1999). Estas estructuras se ubican sobre el elemento central del CS durante el paquiteno (y algunas veces durante el diploteno) mostrando diferente morfología según la especie, siendo en los insectos esféricas y prominentes, mientras que en el ratón se caracterizan por ser pequeñas y poco evidentes (Solari, 1999). Se han identificado dos clases de nódulos de recombinación de acuerdo al momento de su aparición en la profase meiótica como tempranos o tardíos, los primeros son abundantes, de tamaño variable y aparecen en cigoteno asociados a los elementos axiales que aún no se aparean. Los nódulos de recombinación tardíos aparecen asociados al complejo sinaptonémico durante el paquiteno cuando los homólogos están completamente en sinapsis. Los nódulos de recombinación tardíos nunca se han observado en ausencia de CS, además de encontrarse a lo largo de la eucromatina (Zickler y Kleckner, 1999). De manera general se ha propuesto que los nódulos de recombinación están relacionados con la sinapsis, la recombinación y la formación del quiasma (Solari, 1999; Zickler y Kleckner, 1999). También se ha sugerido que la frecuencia y distribución

de los nódulos de recombinación está en relación con el número de quiasmas y eventos de intercambio recíproco. Se han localizado recombinasas semejantes a la Rec A de *E. coli* en los nódulos de recombinación, por lo que se piensa están involucrados en procesos de reparación y recombinación (von Wettstein *et al.*, 1984; Glamann, 1986; Sherman *et al.*, 1992; Carpenter, 1994; Ashley *et al.*, 1995; Roeder, 1995). En espermatoцитos de rata y de ratón se ha demostrado la presencia de ADN en la zona donde se encuentran situados los nódulos de recombinación (Vázquez Nin *et al.*, 1993) lo que indica que probablemente participen en la recombinación.

#### **II 4. Citoquímica del Complejo Sinaptonémico**

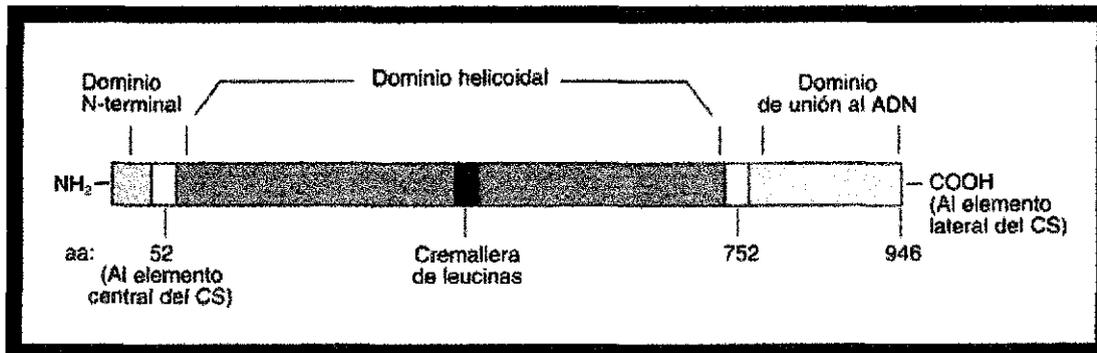
##### **II 4a) Proteínas**

La dificultad de separar CS de la matriz nuclear y de la cromatina, impidió por mucho tiempo reconocer los componentes de esta estructura. Por varios años hubo esfuerzos para identificar las proteínas del CS y aunque se obtuvieron resultados, muchos de ellos eran contradictorios (Zickler y Kleckner, 1999). La primera identificación de las proteínas a partir de CS purificados e intactos morfológicamente fue obtenida por Heyting y col. (1985).

En trabajos de investigación posteriores utilizando procedimientos de inmunolocalización se detectaron las proteínas propias del CS en animales y plantas (Moens *et al.*, 1987; Heyting *et al.*, 1988; Offenber *et al.*, 1991; Smith y Benavente, 1992; Anderson *et al.*, 1994). Investigaciones realizadas utilizando técnicas de inmunomarcado a nivel de microscopía electrónica han demostrado que la proteína del complejo sinaptonémico 1 (SCP1) está localizada en la región central del CS de mamíferos (Schmekel y Daneholt, 1995).

Las moléculas de SCP1 que se encuentran en los espermatoцитos de mamífero, están simétricamente organizadas dentro del CS. La SCP1 presenta un peso molecular de 125 kD, tiene tres dominios: uno corto y rico en prolina en la porción amino terminal que es globular, una región de 700 residuos de aminoácidos que constituyen una  $\alpha$ -hélice y un dominio carboxilo terminal de 240 aminoácidos, que contiene regiones serina/treonina seguido de un residuo de prolina, los que son comunes en una variedad de proteínas que se unen a ADN. La porción carboxilo terminal de la SCP1 descansa en la cara interna del elemento lateral, las moléculas salen desde el elemento lateral hasta la región central del CS terminando con su región amino terminal entre el centro del elemento central y el elemento lateral opuesto, por lo que los dominios amino terminal de la SCP1 se traslapan (Schmekel *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 1996; Moens *et al.*, 1998). La SCP1 puede tener interacciones no específicas con el surco menor del ADN (Schmekel y Daneholt, 1995). La proteína Syn1 se ha descrito en el hámster y es equivalente a la SCP1, presenta su dominio amino terminal en el centro del CS y el dominio carboxilo terminal hacia el elemento lateral (Esquema 4). Syn1 se liga fuertemente a varias secuencias de ADN y no se une a otras proteínas (Tarsounas *et al.*, 1997).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Esquema 4

Proteína Syn1 del hamster (SCP1 en rata)  
(tomada de Solari, 1999).

La proteína del complejo sinaptonémico 2 (SCP2) y la proteína del complejo sinaptonémico 3 (SCP3) son las principales integrantes de los elementos laterales del CS. Se ha visto que estas dos proteínas están presentes a partir del leptoteno y desaparecen en las células meióticas tardías (Pelttari *et al.*, 2001). La SCP2 tiene un peso molecular de 173 kD y se ha confirmado por métodos de inmunomarcación que su patrón de distribución es asimétrico (Schalk *et al.*, 1998; Moens *et al.*, 1998; Zickler y Kleckner, 1999). Estudios bioquímicos han mostrado que presenta sitios blanco a proteína-cinasa, lo que probablemente indica que esta proteína está involucrada en el ensamble y desensamble del CS. En condiciones *in vitro* se une al ADN en regiones ricas en adenina y timina. La SCP2 tiene similitudes con la Red1, que es una proteína específica de la meiosis en las levaduras (Zickler y Kleckner, 1999).

Aunque la SCP2 y la SCP1, son los principales constituyentes de los filamentos transversales, aun no se ha evidenciado que interactúen directamente, por lo que se ha sugerido la existencia de una proteína adicional que medie el enlace (Yuan *et al.*, 1998).

La proteína SCP3 parece ser el principal componente del elemento lateral en roedores y es esencial para la sinapsis de los cromosomas homólogos. La SCP3 se ensambla en delgadas fibras que se piensa son el fundamento estructural del elemento lateral del CS y que podría funcionar como una red en la que otras proteínas se fijan (Yuan *et al.*, 1998; Zickler y Kleckner, 1999). La SCP3 tiene varias formas, las dos principales muestran un peso molecular de 30 y 33 kDa, dentro de cada clase se ha visto que el grado de fosforilación varía a lo largo de la profase meiótica I. La proteína tiene características básicas, su terminación carboxilo terminal tiene regiones *coiled-coil* (arrollada en espiral) y un dominio amino terminal no-helicoidal (Zickler y Kleckner, 1999). Con ayuda de anticuerpos desarrollados contra las regiones amino y carboxilo terminal de la SCP3, se ha determinado su localización en el elemento lateral. La región amino terminal se ubica en el lado interno del elemento lateral del ratón, mientras que la porción carboxilo terminal en la región externa del elemento lateral (Zickler y Kleckner, 1999). Las fibras de SCP3 están estructuralmente relacionadas con filamentos intermedios, pues se ha reconocido que su dominio carboxilo terminal promueve la interacción proteína-proteína *in vitro*, regulando la unión al ADN

de los ejes de las cromátidas, cohesión de las cromátidas hermanas, sinapsis y recombinación (Yuan *et al.*, 1998; Tarsounas *et al.*, 1999; Zickler y Kleckner, 1999). Estudios recientes han puesto de manifiesto la presencia de la SCP3 en células germinales primordiales masculinas y femeninas, lo cual se ha interpretado como una preparación de las células primordiales para entrar en meiosis (Di Carlo *et al.*, 2000).

En espermatoцитos del hámster se ha descrito a la Cor1 (equivalente a la SCP3) situada en los elementos axiales desde el leptoteno hasta el diploteno y que permanece en el cinetocoro hasta la metafase II (Zickler y Kleckner, 1999). La Cor1 está constituida por 234 aminoácidos y muestra un peso molecular de 30 kDa, es rica en glutamina (12%) especialmente en el extremo carboxilo, con 34% de aminoácidos hidrofóbicos y un predominio básico, tiene parecido con las proteínas de filamentos intermedios (Solari, 1999). Cor1 no tiene regiones de unión a ADN, por lo que su unión tal vez esté mediada por otra proteína del eje. Existen evidencias que señalan que la proteína Cor1 tiene interacciones homotípicas *in vivo* (Tarsounas *et al.*, 1997). Se piensa que la Cor1 puede estar involucrada no sólo en el ensamble del CS sino también en la unión de las cromátidas hermanas (Tarsounas *et al.*, 1997).

Además de las proteínas del CS descritas en células de mamífero, se han definido proteínas equivalentes en otros organismos como las levaduras se han descrito proteínas que se localizan en el CS, algunas de las cuales tienen funciones equivalentes a las descritas en mamíferos. A continuación mencionamos algunas de ellas.

Zip1 fue la primera proteína descrita en el CS de *S. cerevisiae*, y se le considera equivalente a la SCP1 de mamíferos. Se ha visto que es una proteína filamentososa que contiene un dominio largo enrollado en forma de barra con regiones de dimerización y una estructura globular en las regiones carboxilo y amino terminal. La Zip1 se ensambla en una estructura altamente ordenada y las evidencias experimentales sugieren que es una molécula que actúa como "cierre" uniendo los cromosomas homólogos colocándolos en aposición (Haber, 1998; Sym *et al.*, 1993). El exceso de producción de esta proteína causa la aparición de estructuras similares a los policomplejos que se observan en los espermatoцитos de los insectos (Sym y Roeder, 1995). En mutantes de zip1 la frecuencia del entrecruzamiento se ve reducida a la mitad sin una reducción en el número total de conversiones génicas (Haber, 1998).

Se ha descrito que Zip 1 está en los CS y no en los elementos axiales. Los mutantes de Zip1 no forman CS (Sym *et al.*, 1993; Sym y Roeder, 1995). Zip1 es necesaria para que tenga lugar la sinapsis, la recombinación y la interferencia regional de entrecruzamiento (*crossing-over*) (Storlazzi *et al.*, 1996; Sym y Roeder, 1994).

Otro componente que se ha delineado en el CS de levaduras es la proteína Zip2, que se ha evidenciado se requiere para la iniciación de la sinapsis, por lo que se ha vinculado con el inicio de la recombinación y la sinapsis de los cromosomas homólogos (Zickler y Kleckner, 1999). La Zip2 tiene una estructura semejante a la de Zip1, pues forma a hélices anfipáticas, lo que sugiere la constitución de dímeros enrollados de la misma manera que los filamentos de miosina y los filamentos intermedios (Storlazzi *et al.*, 1996).

En levaduras se han referido proteínas que cumplen funciones equivalentes a la SCP3 y SCP2 de

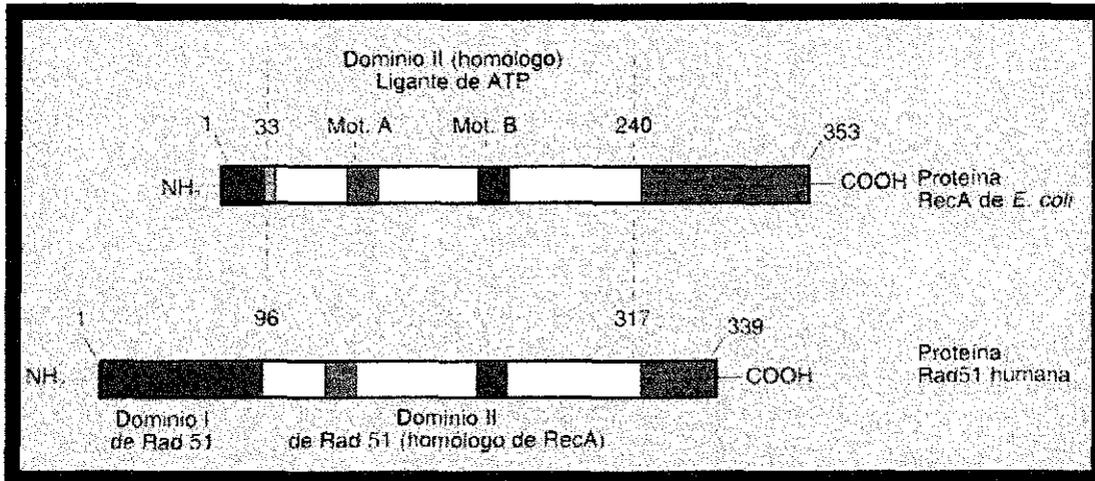
mamíferos y que también se encuentran en los elementos axiales y laterales del CS. La Hop2 y Red1 descritas en *S. cerevisiae*, son proteínas necesarias para el ensamble y función del CS. Hop1 es específica de la meiosis, tiene un peso molecular de 70 kD. Se ha demostrado que contiene regiones de dedos de zinc que se sabe promueven la unión al ADN dúplex, en secuencias ricas en GC más que a secuencias ricas en AT (Zickler y Kleckner, 1999). La proteína Red1 es también exclusiva de la meiosis y presenta un peso molecular de 95 kD. Las evidencias experimentales que la Red1 es indispensable para que se conformen los ejes axiales y los elementos laterales, así como para que los niveles de recombinación sean óptimos (Storlazzi *et al.*, 1996; Zickler y Kleckner, 1999). La Mek1 es otra proteína descrita en levaduras, tiene un peso molecular de 56.8 kDa y se ha mostrado que co-inmunoprecipita con la Red1 y Hop1. La Mek1 se localiza en sitios a lo largo de los cromosomas desde el leptoteno hasta la metafase I observándose que tiene homología con las proteína-cinasas de serina-treonina (de los Santos y Hollingsworth, 1999; Zickler y Kleckner, 1999). Las mutaciones en los genes de la Hop1, Red1 y Mek1 reducen la recombinación genética de manera notable en las levaduras.

Además de las proteínas detalladas en los ejes y elementos laterales del CS, se han determinado otro tipo de proteínas que se han descrito en levaduras (Pelttari *et al.*, 2001) y mamíferos (Ejipe *et al.*, 2000) conocidas como complejos de cohesinas, los cuales se requieren para el apareamiento de los cromosomas, la segregación y la recombinación en células meióticas (Pelttari *et al.*, 2001). El complejo de cohesinas en las levaduras está constituido por un conjunto de múltiples subunidades (Smc1p, Smc3p, Scc1p y Scc3p) que se requieren para mantener unidas a las cromátidas hermanas durante la mitosis. Se ha demostrado que la Smc3p y la versión en la meiosis de la Scc1p denominada Rec8p tienen la función de mantener unidas a las cromátidas a lo largo de la profase meiótica I, además de participar en el establecimiento del elemento axial y la recombinación recíproca. Smc3p y Rec8p colocalizan en el eje cromosómico independientemente de si hay sinapsis o no. Durante el paquiteno van desapareciendo lentamente hasta quedar únicamente en la región del centrómero en donde permanecen hasta la anafase II (Klein *et al.*, 1999).

En las células meióticas de mamífero con deficiencia en SCP3, las cohesinas son capaces de promover la sinapsis entre cromosomas homólogos a pesar de que no exista la formación del elemento axial, por lo que se sugiere que el complejo de cohesinas podría participar en el apareamiento y sinapsis de los homólogos (Ejipe *et al.*, 2000; Pelttari *et al.*, 2001). Además de las proteínas que se han enumerado con una participación estructural en el CS, se han localizado proteínas que participan de manera directa en el proceso de recombinación meiótica. En diversos eucariontes se han detallado proteínas homólogas a la recombinasa RecA de *Escherichia coli*, como la Rad51 (Esquema 5), Dmc1 y Lim15 en mamíferos (Bishop *et al.*, 1992; Shinohara *et al.*, 1993; Rockmill *et al.*, 1995; Terasawa *et al.*, 1995; Passy *et al.*, 1999). Estas proteínas similares a RecA (Loseva *et al.*, 1996) y más específicamente la Rad51 (Ashley *et al.*, 1995; Ikeya *et al.*, 1996), están presentes en asas de cromatina durante el leptoteno y se incorporan a los elementos laterales de CS en cigoteno y se asocian a los nódulos de recombinación meióticos. En diploteno Rad51 se encuentra en los quiasmas y Lim15 se asocia a las regiones

## TESIS CON FALLA DE ORIGEN

teloméricas en la profase tardía (Ikeya *et al.*, 1996).



Esquema 5.

Estructura de las proteínas RecA de *E. coli* y Rad51 humana. Ambas proteínas comparten el dominio II, con las regiones A y B, de unión a ATP. El dominio I y el carboxilo terminal son diferentes (Tomado de Solari, 1999).

Rad51 y Dmc1 se han encontrado en cromosomas de la meiosis de mamíferos (Plug *et al.*, 1996; Barlow *et al.*, 1997; Tarsounas *et al.*, 1999) y se ha visto tienen el mismo patrón de distribución en extractos de espermatoцитos de ratón en estados sucesivos de la profase 1 (Tarsounas *et al.*, 1997).

En el lirio estas proteínas se ubican como sitios discretos a los nódulos de recombinación tempranos en los cromosomas durante el leptoteno y cigoteno (Terasawa *et al.* 1995; Anderson *et al.*, 1997). Existen evidencias indirectas que sugieren que la presencia de proteínas de recombinación y reparación en los nódulos tempranos pueda estar relacionada con la conversión génica más que con el *crossing-over* (Carpenter, 1994; Kleckner, 1996). Sin embargo, hasta el momento no es clara la relación entre las evidencias experimentales y el fenómeno de reconocimiento de las secuencias homólogas localizadas a larga distancia.

### II 4b) Ácidos nucleicos

En estudios citoquímicos a nivel ultraestructural, se ha demostrado la presencia de ARN, de ADN o de ambos en el CS (Esponda y Stockert, 1971; Welsch, 1973; Vázquez Nin y Echeverría, 1976; Latos-Bielenska *et al.*, 1990; Vázquez Nin *et al.*, 1993). El ADN es un componente importante de los elementos laterales, pero es escaso o está ausente en el espacio central. Sin embargo se le ha hallado en los nódulos de recombinación (Vázquez Nin *et al.*, 1993). Estas observaciones sugieren que la parte central del CS es el lugar donde se produce el intercambio de cromátidas. Investigaciones en las que se analizó el ADN aislado del CS (Pearlman *et al.*, 1992; Karpova *et*

al., 1995) se demostró que existe una alta frecuencia de secuencias *LINE/SINE* y repeticiones en tándem de CA. Estas secuencias son parecidas a las que posiblemente se encuentran cerca de los puntos de ruptura que dan lugar a la recombinación (Satyanarayana y Strominger, 1992). En cuanto a la existencia de ARN Vázquez Nin y Echeverría (1976) por medio de métodos de tinción preferencial evidenciaron que los ejes axiales y elementos laterales contienen gran cantidad de RNP durante las primeras etapas de la profase meiótica, sin embargo esta positividad disminuye notablemente durante el paquiteno avanzado hasta estar ausente en el diploteno. A pesar del avance que existe en el estudio de la profase meiótica, aún existen interrogantes en cuanto a la ubicación y participación del ADN y ARN durante el alineamiento, apareamiento y sinapsis de los cromosomas homólogos.

### **II.5 Síntesis de Ácidos Nucleicos durante la profase meiótica I**

Monesi y col. (1978) realizaron los primeros trabajos sobre la síntesis de ARN durante la espermatogénesis. Esta investigación sobre la síntesis del ARN en espermatoцитos y espermátidas evidenciaron una actividad inusual de los transcritos que se presume participan en las etapas posteriores de la meiosis en la síntesis de las proteínas. Ellos observaron que una fracción importante de transcritos del paquiteno no eran liberados del núcleo hasta el diploteno. Utilizando métodos de autorradiografía se ha detectado síntesis de ARN durante la profase meiótica I en diversos organismos (Eddy y O'Brien, 1998). Cuando las células alcanzan la metafase, esta incorporación cae a un nivel no detectable (Taylor, 1959; Monesi, 1964)

Algunos estudios que han abordado la síntesis de ARN han demostrado que esta es baja durante el estado de preleptoteno y casi imperceptible durante el leptoteno, cigoteno y el paquiteno temprano. A diferencia de lo que sucede en el paquiteno medio y tardío, en donde existe un incremento notorio en la incorporación de uridina tritiada; esto ha permitido detectar niveles altos de síntesis de ARN en los espermatoцитos del ratón en paquiteno (Eddy y O'Brien, 1998). Estudios de autorradiografía ultraestructural en diversos organismos han confirmado la elevada síntesis de ARN en espermatoцитos en paquiteno, así como la incorporación de uridina tritiada en las etapas tempranas de la profase meiótica (Kierzenbaum y Tres, 1974b), además de evidenciar que muchos de los ARN sintetizados durante el paquiteno son acumulados en el núcleo y posteriormente son liberados en el citoplasma durante la primera división meiótica (Monesi, 1954, 1965). La síntesis de ARN que se ha determinado por medio de autorradiografía ultraestructural en los espermatoцитos del humano y del ratón durante el paquiteno, se ha localizado en autosomas. Esta localización sugiere que la síntesis del ARN es predominantemente de ARN heterogéneo nuclear (ARNhn), precursor del ARNm (Eddy y O'Brien, 1998).

Asimismo en los espermatoцитos de humano y de ratón se ha registrado la síntesis de ARN nucleolar que alcanza un pico durante el cigoteno, lo que evidencia la síntesis de ARN ribosómica durante la meiosis (Kierzenbaum y Tres, 1974a).

Evidencias experimentales señalan que existe la síntesis de una variedad de moléculas de ARN de bajo peso molecular, de alrededor de 125 nucleótidos, se sintetiza durante la profase meiótica. Estas moléculas parecen inducir cambios en la conformación de la cromatina permitiendo el

acceso de las nucleasas (Hotta y Stern, 1981).

La inhibición de la síntesis del ARN, en leptoteno o cigoteno, produce una permanencia de los espermatocitos en cigoteno. Si la inhibición se realiza en paquiteno, las células no pueden seguir más allá de la profase I, por lo que se sugiere que el ARN es esencial para el desarrollo meiótico (Sakaguchi *et al.*, 1983).

En la meiosis la replicación del ADN sucede durante la interfase en el periodo S (fase S premeiótica), como en cualquier interfase previa a la mitosis. Sin embargo, la síntesis premeiótica del ADN tiene ciertas peculiaridades, es muy larga y además no es completa, dado que una cantidad aproximada al 0.3% del ADN total queda sin replicarse y sólo lo hace ya iniciada la meiosis. La síntesis del ADN durante la meiosis se lleva a cabo durante la etapa del cigoteno y en la etapa del paquiteno. En el lirio se demostró que la replicación durante la fase S es sólo del 99.8 al 99.9% (Stern, 1993). La síntesis de ADN restante ocurre durante el cigoteno y el paquiteno. Esta síntesis de ADN durante el cigoteno (ADNc) es del 0.1 a 0.3 %, y se ha relacionado con el apareamiento cromosómico. Estudios en células en cigoteno que incorporaron timidina tritiada, muestran el ADN marcado en los elementos laterales, lo que apunta a que el ADN recién sintetizado funciona como sitios de unión para la formación del CS (Kurata e Ito, 1978). En el paquiteno la síntesis del ADN, denominado ADN paquiténico (ADNp) se da en un porcentaje del 0.2% y a diferencia del ADNc no es consecuencia de un retraso en la replicación, más bien se le ha relacionado con fenómenos de replicación-reparación involucrados con el proceso de recombinación. Cuando se inhibe parcialmente la síntesis del ADN, se observa la fragmentación de los cromosomas en cigoteno y paquiteno, lo que sugiere que la integridad del cromosoma depende exclusivamente del ADN (Stern, 1993).

El ADN que se sintetiza en paquiteno está formado por secuencias moderadamente repetidas y altamente conservadas en diferentes plantas (Friedman *et al.*, 1982). El ADN sintetizado en cigoteno es mucho menos conocido. Sin embargo, las evidencias autorradiográficas de alta resolución indican que el ADN sintetizado en esta etapa se incorpora a los ejes axiales y enseguida pasa a los elementos laterales del CS (Kurata e Ito, 1978).

## **II.6 Alineamiento y Apareamiento de los cromosomas meióticos**

El cómo los homólogos encuentran su pareja es un misterio hasta el momento y se han propuesto varios modelos que tratan de explicar como se reconocen los cromosomas homólogos. La meiosis involucra al menos cuatro diferentes clases de apareamiento (Kleckner, 1996). 1.- Durante la fase S meiótica, la duplicación de la doble hélice de ADN genera dos copias que permanecen unidas hasta la división meiótica II. Este apareamiento se explica por las proteínas de cohesión (cohesinas) que mantiene a las cromátidas hermanas unidas durante este período (Miyazaki y Orr-Weaver, 1994; Sekelsky y Hawley, 1995). 2.- Durante el leptoteno, cada par duplicado busca su homólogo, para que así al inicio del cigoteno la mayoría de los cromosomas estén organizados en paralelo con su pareja a una distancia entre 300 a 1000 nm; por lo que el término alineamiento puede ser utilizado para describir el mecanismo que crea esta asociación a distancia. 3.- Durante el cigoteno se comienza a ensamblar el CS con la cercanía de los homólogos, hasta que en paquiteno

los homólogos se encuentran a una distancia de 100 nm (Loidl, 1994; Hasenkampf, 1996). Por lo que el término sinapsis puede ser empleado para esta estrecha asociación de los cromosomas homólogos. 4.- La recombinación tiene lugar entre los dos dúplex de ADN que descansan a unos nanómetros uno de otro; el apareamiento preciso depende de la complementaridad que exista entre las bases en las hebras individuales de ADN (Kowalczykowski y Eggleston, 1994). Actualmente es aceptado que el alineamiento y apareamiento o sinapsis son procesos diferentes (Moses, 1968; Loidl, 1990; Hawley y Arbel, 1993; Kleckner, 1996; Scherthan *et al.*, 1996). La mayoría de los modelos para explicar el alineamiento meiótico plantean la existencia de movimientos que generan contactos accidentales entre los homólogos (Loidl, 1990; Kleckner, 1996). En términos generales, el reconocimiento debe involucrar interacciones de largo alcance, donde los homólogos "toquen o sientan" otros cromosomas. Muchos modelos involucran el apareamiento temprano con proteínas filamentosas (Comings y Riggs, 1971; Holliday, 1977; Chandley, 1986).

Existen otras propuestas en las que se ha sugerido que el alineamiento meiótico puede ser la continuación de organizaciones somáticas previas de la cromatina en interfase. En algunos eucariontes como las levaduras y dípteros, los cromosomas homólogos son adyacentes en el núcleo en interfase de células somáticas (Wandall y Svendsen, 1985; Scherthan *et al.*, 1994; Weiner y Kleckner, 1994). Sin embargo, algunas investigaciones han demostrado que no hay proximidad de los cromosomas homólogos en las espermatogonias de hombre y de ratón (Scherthan *et al.*, 1996). Aunque existiera algún tipo de ordenamiento premeiótico en la organización de los cromosomas homólogos, parece ser que en la mayoría de los eucariontes la disminución de la distancia entre los cromosomas homólogos y su alineamiento tiene lugar poco antes del apareamiento final también llamado sinapsis (Zickler y Kleckner, 1999).

Se ha propuesto que la búsqueda de homología involucra la participación de macromoléculas, probablemente proteínas, ADN y/o ARN a largas distancias. Dawe (1998) y Cook (1997) han propuesto a las proteínas como un sistema que tiene la función de llevar a cabo la atracción inicial. Sin embargo, la atracción debe llevarse a cabo después de que el reconocimiento de homología se ha dado entre las secuencias o regiones de los cromosomas. Se ha sugerido que proteínas semejantes a los priones puedan formar fibrillas semiestables que unan segmentos de cromosomas homólogos (Sybenga, 1999). La mayoría de los autores consideran que el ADN está involucrado en la búsqueda inicial, reconocimiento y apareamiento de los cromosomas homólogos (Loidl, 1990; Moens, 1994; Kleckner, 1996; Sybenga, 1999). Se ha demostrado la presencia de hebras sencillas de ADN como resultado de las rupturas de doble cadena justo antes de la recombinación y la reparación del ADN, siendo esto un componente de la maquinaria de intercambio genético (Drapkin *et al.*, 1994), sin embargo, el estudio de genotipos mutantes en levaduras indica que las rupturas de doble cadena no son requeridas para la formación de conexiones de apareamiento (Weiner y Kleckner, 1994).

Utilizando histoquímica y microscopía electrónica se ha probado la presencia de ARN en el elemento lateral del CS (Wolstenholme y Meyer, 1966). El uso de procedimientos de tinción preferencial para ribonucleoproteínas (RNPs) en microscopía electrónica ha evidenciado la presencia de ARN

en el elemento lateral del CS y en los elementos axiales del leptoteno y cigoteno (Esponda y Stockert, 1971; Vázquez-Nin y Echeverría, 1976), es más las RNPs han sido también localizadas en las fibrillas uniendo los elementos axiales en cigoteno (Vázquez-Nin y Echeverría, 1976). A pesar de que se ha puesto de manifiesto la presencia de ARN desde la etapa del leptoteno no se ha establecido de manera concreta su participación en la profase meiótica.

## **II. 7 Significado citofisiológico del Complejo Sinaptonémico**

Se ha observado que existe correspondencia entre la posición del CS y el apareamiento de los homólogos en el paquiteno. Además, cuando se comparan las imágenes de la microscopía óptica y electrónica de la misma célula, se ve cómo el CS se sitúa precisamente entre los homólogos apareados en la región en que el apareamiento es más estrecho y donde se supone que tiene lugar la recombinación. En el cigoteno aparece por primera vez el CS, el cual se encuentra durante todo el paquiteno y desaparece al iniciarse el diploteno, cuando finaliza el estrecho apareamiento. Por ello, tanto la localización del CS como la sincronización en su aparición y desaparición con el inicio y finalización del apareamiento estrecho, indican una íntima relación con el apareamiento y recombinación (Moses, 1968; Gillies, 1975; Moens y Pearlman, 1988; Kabak *et al.*, 1992). Una serie de investigaciones ha establecido que el CS se encuentra en todas las células que se dividen por meiosis (Sotelo, 1969; von Wettstein *et al.*, 1984) y existen evidencias de estudios ultraestructurales clásicos que demuestran la existencia universal del CS en la profase meiótica. Debido a este hecho, a su propia morfología y a sus cambios entre leptoteno y paquiteno, se le ha relacionado con el apareamiento, la recombinación y la segregación entre los homólogos (Sotelo, 1969).

El CS se ha considerado como representación de la consumación del apareamiento además de estar relacionado con algunos aspectos importantes del proceso meiótico como: mantener unidas a las cromátidas hermanas, estabilizar el quiasma hasta la anafase 1, ubicar a los nódulos de recombinación entre las cromátidas homólogas adecuadamente alineadas, y producir localmente interferencia en el entrecruzamiento (Moens, 1994; Maguire, 1995; Kleckner, 1996). Sin embargo, poco se conoce acerca del proceso de reconocimiento temprano que involucra la búsqueda y hallazgo de las secuencias homólogas, la estabilización de las conexiones interhomólogas y la formación del CS.

*En todas las células eucarióticas con meiosis normal y recombinación, el estrecho apareamiento de los cromosomas durante la profase (cigoteno-paquiteno) se ha correlacionado con la aparición del CS.*

El papel del CS ha provocado controversia, pues existen evidencias que muestran que el apareamiento mediado por el CS no asegura la recombinación (Stack, 1973; Rasmussen, 1977), esto se ha interpretado en el sentido de que el CS pudiera ser necesario pero no suficiente para la recombinación. Hay datos experimentales que han puesto en duda que el CS sea necesario para el apareamiento y recombinación de la meiosis. Por ejemplo en levaduras la recombinación se puede llevar cabo sin la formación de CS (Bähler *et al.*, 1993), así como la formación del CS puede mediar la asociación de cromosomas heterólogos (Jenkins y Okumus, 1992).

A pesar de estas demostraciones, existen también evidencias experimentales que sugieren la *relación del CS con el proceso de apareamiento, recombinación y eventualmente la segregación*. Por ejemplo se ha demostrado la asociación de cromosomas homólogos con la exclusión de los no homólogos durante el cigoteno en más del 99% de los eucariontes con reproducción sexual (von Wettstein *et al.*, 1984). También se ha comprobado que estas asociaciones son tan específicas, que cuando existe una inversión grande, esto provoca la formación de un asa (Batanian y Hulten, 1987). La presencia de los nódulos de recombinación tardíos en la región central del CS (Carpenter, 1975; Carpenter, 1979a, b) que son probablemente la expresión morfológica de complejos enzimáticos en la región donde ocurre la recombinación génica, pues se ha visto que el número de nódulos de recombinación tardía en los CS es muy semejante al de quiasmas, expresiones citológicas de la recombinación recíproca (Solari, 1999).

### III. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Los procesos que dan origen al CS involucran la búsqueda de homología de secuencias o regiones de cromosomas. Este proceso es muy específico y puede estar antecedido o seguido por la aproximación inespecífica de los cromosomas mediada por los telómeros y/o los centrómeros. La etapa final de este proceso es la formación de la estructura proteica del CS entre regiones homólogas o no (heterólogos), que estén cercanas. Esto es un mecanismo inespecífico que explica muchas de las aparentes excepciones al papel funcional del CS en la mayoría de los eucariontes. Como aún se desconocen los mecanismos específicos que producen el alineamiento, al apareamiento y la sinapsis de los cromosomas homólogos en el presente proyecto se propuso estudiar a través de la microscopía electrónica las estructuras que podrían estar relacionadas con estos procesos durante la profase meiótica I.

#### **Hipótesis**

Consideramos que los ácidos nucleicos median el reconocimiento locus-específico de los cromosomas homólogos y que las proteínas intervienen en la generación de los movimientos de apareamiento, para permanecer como andamiaje una vez que se ha constituido el CS. Si esta hipótesis es cierta, podemos hacer una serie de afirmaciones corroborables experimentalmente: Se encontrará ARN y/o ADN (o ambos) en la región donde se produce el reconocimiento de homología locus-específico antes que los ejes axiales se sitúen en paralelo para conformar los brazos laterales del CS durante las fases anteriores al paquiteno. La formación de hebras monocatenarias de ácido nucleico es indispensable en el reconocimiento de complementariedad de bases. Acabado el reconocimiento y formado el CS durante el paquiteno, los ácidos nucleicos podrán desaparecer en esas estructuras.

## IV. OBJETIVOS

### **Objetivo general**

Localizar los ácidos nucleicos ARN y ADN, en los núcleos de las células germinales premeióticas (espermatogonias tipo B), y durante la profase meiótica I (espermatoцитos I).

### **Objetivos específicos**

1. Localizar el ARN y el ADN en espermatogonias tipo B y en los espermatoцитos primarios de testículo de cobayo y rata mediante citoquímica ultraestructural e hibridación *in situ*, en las etapas de la profase meiótica clásicamente descritas, así como también en las transiciones entre etapas de la profase I.
2. Realizar reconstrucciones tridimensionales de las regiones de reconocimiento de homología y de la zona de apareamiento final y formación del CS.
3. Determinar por autorradiografía óptica si la síntesis de ARN y su salida al citoplasma está relacionado con el establecimiento del CS y el apareamiento.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron testículos de adultos jóvenes de cobayo y de rata en todos los experimentos.

### **V.1 Procesamiento del material biológico para microscopía electrónica**

Las muestras de testículo de cobayo y de rata se trataron con diferentes procedimientos de fijación, deshidratación e inclusión dependiendo de la metodología empleada para su análisis al microscopio electrónico. Estos distintos procesamientos se describen a continuación.

#### **V.1.1 Procesamiento estándar**

Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos pH 7.3 0.2 M por una hora a temperatura ambiente, se enjuagaron en el mismo amortiguador, se deshidrataron con alcoholes etílicos graduales y se incluyeron en resina epóxica (Glycyde ether 100, Merck, Darmstadt, Germany).

#### **V.1.2 Fijación hipotónica y tratamiento con ARNasa**

Las muestras se fijaron en condiciones hipotónicas de acuerdo al método desarrollado por Puvion-Dutilleul y Puvion (1980) modificado por Vázquez-Nin y col (1989). Las muestras de túbulos seminíferos de testículos de rata se fijaron en paraformaldehído al 1% con photo-flo 200 (Kodak, Rochester, NY, USA) disuelto en una solución de sacarosa al 0.1M a pH 9 ajustado con una solución de borato de sodio al 0.1M. La fijación se llevó a cabo durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente el material se dividió en dos partes. A la primera parte se le dio una postfijación en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos pH 7.3 0.2 M por una hora a temperatura ambiente, se enjuagó en el mismo amortiguador y se deshidrató a 4°C para su inclusión en LR White (Electron Microscopy Science).

Las muestras restantes se trataron con ARNasa al 2% (Sigma, St. Louis Missouri; USA) disuelta en amortiguador de Tris-HCl pH 6.5 a diferentes tiempos que fueron desde los 15 minutos a las cuatro horas de incubación todas ellas a 37°C. Posteriormente se enjuagaron con amortiguador de fosfatos, se deshidrataron en alcoholes graduales y se incluyeron en LR White (Electron Microscopy Science). Se utilizaron muestras de túbulo seminífero de rata como testigos negativos sin el tratamiento de ARNasa al 2%, incubándolas con agua destilada de acuerdo a los tiempos y la temperatura establecidos anteriormente. Subsecuentemente este material se deshidrató en alcoholes graduales y se incluyó en LR White (Electron Microscopy Science).

#### **V.1.3 Procesamiento para inmunolocalización**

Las muestras de túbulos seminíferos de cobayo se fijaron en paraformaldehído al 2% en amortiguador

de fosfatos 0.15 M pH 7.3 a 4°C por una hora. Las muestras se enjuagaron en el amortiguador de fosfatos y se deshidrataron en metanol gradual (50%, 60%, 70%, 80%, 90%) y se incluyeron en Lowicryl K4M (Polysciences Inc). La polimerización se llevó a cabo utilizando luz ultravioleta a -20°C.

#### **V.1.4 Procesamiento para hibridación *in situ***

Muestras de túbulo seminífero de cobayo y de rata se fijaron en paraformaldehído al 2% en PBS, así como con paraformaldehído al 4% + glutaraldehído al 0.2% en PBS a 4°C por una hora. Posteriormente el material se enjuagó en el mismo amortiguador, se deshidrató en metanol gradual (50%, 60%, 70%, 80%, 90%) y se incluyó en Lowicryl K4M (Polyscience Inc). La polimerización se llevó a cabo utilizando luz ultravioleta a -20°C.

#### **V.1.5 Corte**

De todo el material obtenido de acuerdo a los diferentes procedimientos citados anteriormente, se procedió a realizar los cortes semifinos, obteniéndose de un micrómetro de espesor, los que se tiñieron con azul de toluidina-bórax. Se estudiaron en el microscopio de luz las asociaciones celulares presentes en los túbulos seminíferos y se compararon con las descripciones clásicas del ciclo espermatogénico del cobayo (Clermont, 1960) y de la rata (Leblond y Clermont, 1952). Una vez obtenida la etapa del ciclo espermatogénico de interés se hicieron cortes ultrafinos de aproximadamente 60 nm de grosor en un ultramicrotomo Reichert Ultracut R y se montaron en rejillas de cobre, oro o níquel cubiertas con formvar. Los cortes seriados se recogieron en anillos de Sjöstrand, de acuerdo al método descrito por Wettstein y Graver (1973). Otros cortes fueron levantados en rejillas de oro sin membrana.

#### **V.1.6 Métodos de contraste**

Se emplearon diferentes métodos de contraste para el material de los túbulos seminíferos de cobayo y rata. Para determinar la ultraestructura de manera general se aplicó el método de contraste general de acetato de uranilo y citrato de plomo. Para teñir el ADN se recurrió al método de tinción preferencial para ADN del PTA o ácido fosfotungstico (Vázquez-Nin *et al.*, 1973; Esquivel *et al.*, 1987). Para contrastar las RNP se utilizaron el método de tinción preferencial de Bernhard (1969) para RNP, así como el método de terbio (Biggiogera y Fakan, 1998).

Los cortes ultrafinos que se recogieron en rejillas de oro sin membrana se usaron para el método de tinción específica para ADN de amina de osmio (Cogliati y Gautier, 1973) modificado por Vázquez-Nin y col. (1995).

#### **V.2 Reconstrucción tridimensional**

Las series se tiñeron con la tinción de contraste general de acetato de uranilo y citrato de plomo, con el método de tinción preferencial para RNP (Bernhard, 1969), y con el método de tinción preferencial para ADN del PTA o ácido fosfotungstico (Vázquez Nin *et al.*, 1973; Esquivel *et al.*, 1987).

Las muestras se observaron en un microscopio electrónico Carl Zeiss EM10 operando a 80 kV. Las espermatogonias tipo B y los espermatoцитos en las diferentes fases de la profase meiótica I, fueron fotografiados desde el inicio de la serie hasta el final.

La reconstrucción tridimensional se llevó a cabo en dibujos realizados en papel celofán en los que se fueron trazando las estructuras de cada una de las células que se siguieron en las series obtenidas. Al tener toda la secuencia de las fotografías de las estructuras en el papel celofán se hicieron coincidir los dibujos para determinar el arreglo y disposición de los elementos copiados.

### **V.3 Inmunolocalización**

La inmunolocalización se llevó a cabo en condiciones de "post-inclusión" de acuerdo al protocolo descrito por Biggiogera y col (1989) Vázquez-Nin y col (1995) con los siguientes anticuerpos:

- 1.- Anti-ARN polimerasa II, es un anticuerpo policlonal de conejo (Kimm y Dahmus, 1986)
- 2.- Anti-ADN, es un anticuerpo monoclonal de Progen (Heidelberg, Germany)
- 3.- Anti-RNPhn (C8V) Jones et al., 1980.
- 4.- Anti-SM anticuerpo monoclonal que reconoce un epitope común a los snRNPs (U1, U2, U5 y U6) que participan en el splicing (Y12, Lerner et al., 1981; Gerke y Steitz 1986)
- 5.- Anti-trimetil-guanosin-cap (R1131) Oncogene, New York, USA.

(ver diagrama de flujo 1).

### **V.4 Hibridación *In situ***

Para llevar a cabo la hibridación *in situ* se utilizó como sonda el ADN genómico de células de hígado y bazo de cobayo y de rata de acuerdo al protocolo de López Velázquez y col (1998). Mediante el uso de ADN genómico como sonda marcado con biotina o digoxigenina se pueden localizar los ARN en hibridaciones *in situ* a nivel ultraestructural.

A continuación se describe la extracción del ADN genómico, la marcación del ADN genómico y la hibridación *in situ* ultraestructural.

#### **V.4.1 Extracción del ADN genómico**

La extracción del ADN genómico se realizó de acuerdo al protocolo de López Velázquez y col (1998). Se obtuvieron el hígado y el bazo de cobayo y de rata, los cuales inmediatamente fueron cortados por congelación en un criostato American Optical a  $-17^{\circ}\text{C}$  para obtener cortes de 20 micrómetros de grosor. Se utilizaron aproximadamente 30 cortes por cada extracción. La extracción del ADN genómico se llevo a cabo incubando los cortes durante toda la noche en amortiguador SDS-proteinasa K a  $42^{\circ}\text{C}$  en agitación constante. Posteriormente se empleó fenol-cloroformo. El ADN se precipitó con NaCl 1N y etanol 100% a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El ADN fue resuspendido en amortiguador TE. La concentración obtenida del ADN fue de 5 mg/ml.

La integridad del ADN fue analizada con geles de agarosa al 1% (Figura 1).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

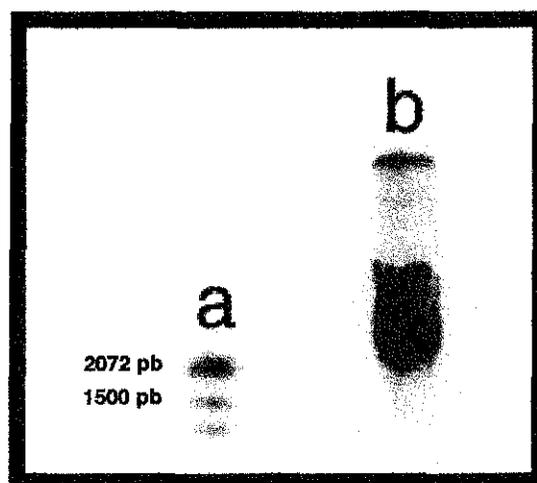


Figura 1.

Muestra gel de agarosa al 1%. Carril (a) marcador de peso molecular, (b) ADN genómico de hígado de cobayo

La concentración del ADN genómico fue medida por absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. Se consideró como pureza óptima cuando la relación  $OD_{260}/OD_{280}$  dio como resultado 1.8.

#### V.4.2 Marcaje del ADN genómico de cobayo y de rata

El ADN genómico de hígado y bazo de cobayo y de rata se marcó con biotina y digoxigenina. El marcado inicialmente se realizó con biotina para las hibridaciones *in situ*, sin embargo posteriormente se recurrió al marcado con digoxigenina, debido a que se obtuvieron mejores resultados en las hibridaciones *in situ* y un menor ruido de fondo.

Para marcar con biotina se empleó el método de *nick translation* utilizando el sistema de marcaje de BioNick (Gibco BRL) para incorporar nucleótidos biotinilados (Langer *et al.*, 1981). En la reacción se adicionaron dNTP's 0.2mM, 0.1mM de bio 14-dATP, 0.5 unidades/ml de ADN polimerasa I de *Escherichia coli* y 0.0075 unidades/ml de ADNasa I de páncreas bovino. Se marcó aproximadamente 1mg de sonda por cada reacción, dejando incubar a 16°C durante 2 1/2 horas. El tamaño de la sonda se controló con el tiempo de digestión en la reacción de marcado por el *nick translation*, además de verificar el tamaño de la sonda mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El tamaño de la sonda de ADN genómico después de este tiempo de incubación fue de 100 a 500 pb.

El ADN genómico marcado con digoxigenina se realizó por el método de *nick translation* manejando el sistema de marcaje de DIG-Nick Translation Mix (Boehringer Mannheim, Germany). En la reacción se adicionaron ADN polimerasa I, ADNasa I; 0.25 mM dATP, 0.25 mM dCTP, 0.25 mM dGTP, 0.17 mM dTTP y 0.08 mM de DIG-11-dUTP.

Se marcó aproximadamente 1mg de sonda por cada reacción, dejando incubar a 16°C durante 2 1/2 horas. El tamaño de la sonda se controló con el tiempo de digestión en la reacción de marcado por el *nick translation*, además de verificar el tamaño de la sonda mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El tamaño de la sonda de ADN genómico después de este tiempo de incubación estuvo entre los 100 y 500 pb.

#### V.4.3 Hibridación *in situ* ultraestructural con ADN genómico de cobayo y rata

Es muy importante señalar que la hibridación *in situ* con el ADN marcado con biotina o digoxigenina se efectuó sin desnaturalizar el ADN de la muestra (cortes en las rejillas de oro) con el propósito de localizar al ARN de las células en los elementos fibrilares o granulares. Cuando se empleó el ADN biotinilado se utilizó el siguiente protocolo: a 2 ml de ADN genómico marcado con biotina por el método de *nick translation* se le agregaron 2 ml de ARNt de *E. coli* (1mg/ml) y 10 ml de formamida al 100% (mezcla de reacción 1). La sonda se desnaturalizó durante 4 minutos a 90°C e inmediatamente se colocó en hielo para evitar la re-naturalización de los fragmentos de ADN. A la mezcla de reacción 1 se le agregó la mezcla de reacción 2 que contenía: 4 ml de albúmina de suero bovino (BSA) al 5%, 4 ml de sulfato de dextrán al 50% y 2 ml de 20XSSC. La reacción de hibridación se realizó en cortes ultrafinos montados en rejillas de oro cubiertas con formvar que se flotaron sobre la mezcla de hibridación (mezcla 1 + mezcla 2). La reacción de hibridación se incubó a 42°C toda la noche en una cámara húmeda y se reveló con una solución de estreptavidina acoplada a partículas de oro coloidal de 15 nm de diámetro (ver diagrama de flujo 2).

Cuando se hizo uso del ADN con digoxigenina se utilizaron 2 ml de ADN genómico marcado por el método de *nick translation* y se les agregó 2 ml de ARNt de *E. coli* (1mg/ml) y 10 ml de formamida al 100% (mezcla de reacción 1). La sonda se desnaturalizó durante 4 minutos a 90°C e inmediatamente se colocó en hielo para evitar la re-naturalización de los fragmentos de ADN. A la mezcla de reacción 1 se le adicionó la mezcla de reacción 2 que contenía: 4 ml de albúmina de suero bovino (BSA) al 5%, 4 ml de sulfato de dextrán al 50% y 2 ml de 20XSSC. La reacción de hibridación se realizó en cortes ultrafinos montados en rejillas de oro cubiertas con formvar que se flotaron sobre la mezcla de hibridación (mezcla 1 + mezcla 2). La reacción de hibridación se incubó a 42°C toda la noche en una cámara húmeda. El revelado de la marca se efectuó empleando una cadena de anticuerpos secundarios. El primer anticuerpo secundario utilizado fue un anticuerpo contra digoxigenina desarrollado en conejo. Posteriormente se usó un anticuerpo IgG desarrollado en cabra contra conejo. Esta IgG fue reconocida por medio de una proteína A acoplada a partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro. Para amplificar el marcado se aplicaron dos anticuerpos más, un GAR IgG acoplado a partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro y un RAG IgG acoplado a partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro (ver diagrama de flujo 3).

Para confirmar la naturaleza de la señal de ARN, algunos cortes se trataron con ribonucleasa 2mg/ml (tipo IA, Sigma) en 1 mM de amortiguador trietanolamina-ácido acético, pH 7.3 por 8 horas a 37 °C.

Una vez realizada la hibridación *in situ* las preparaciones se contrastaron con acetato de uranilo al 2.5% por 5 minutos y citrato de plomo al 0.4% por 1 minuto. Finalmente se observaron en un microscopio electrónico Carl Zeiss EM10.

**Autorradiografía óptica.**

Pequeños fragmentos de testículo de rata se incubaron a 37°C en medio mínimo esencial de Eagles suplementado con 100mCi/ml de 5,6 uridina tritiada (Amersham, Piscataway, NJ,USA; 48 Ci/mmol) por 30 ó 120 min. Se dieron pulsos cortos para determinar el rango de transcripción, y los pulsos largos se emplearon para estimar el rango de marcado del núcleo y del citoplasma. Todas las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2% en amortiguador de fosfatos por 1 hora a 4°C, posteriormente se enjuagaron con el mismo amortiguador, se deshidrataron en acetona y se incluyeron en resina epóxica.

Se realizaron cortes semifinos de un micrómetro de grosor los cuales se cubrieron con emulsión Ilford K2 . Las preparaciones se expusieron por 20 días a 4°C. El revelado se realizó con revelador D19 (Kodak) a 20°C por 3 minutos. Las preparaciones se enjuagaron en agua y se fijaron con fijador Kodak por 10 minutos; se tiñieron con azul de toluidina-bórax por 1 minuto a 60°C y se observaron en un microscopio Zeiss equipado con una cámara de TV. Las imágenes se analizaron con el programa Imagenia 5000, el cual nos permitió contar la cantidad de marca en el núcleo y el citoplasma considerando el área de cada uno de estos compartimentos. El cociente obtenido de la cantidad de marca por unidad de área nos dio la densidad numérica en cada uno de los compartimentos considerados.

**Diagrama de flujo 1**

En cámara húmeda flotar la rejilla en NGS diluido en PBS (1:100) por 3 minutos



Incubar en el anticuerpo primario diluido en PBS-Tween-BSA (PBS-Albumina de suero bovino (BSA) 1mg/ml. Tween 20 al 0.05%) por 18 horas a 4°C



Enjuague con PBS-BSA-Tween por goteo



Lavados con PBS por goteo



Flotar en PBS por 15 minutos



Incubar en NGS diluido en PBS (1:100) por 3 minutos



Incubar 30-60 minutos en el anticuerpo secundario acoplado con oro de 10 nm diluido en PBS (1:10 a 1:20) a temperatura ambiente



Lavar en PBS por goteo



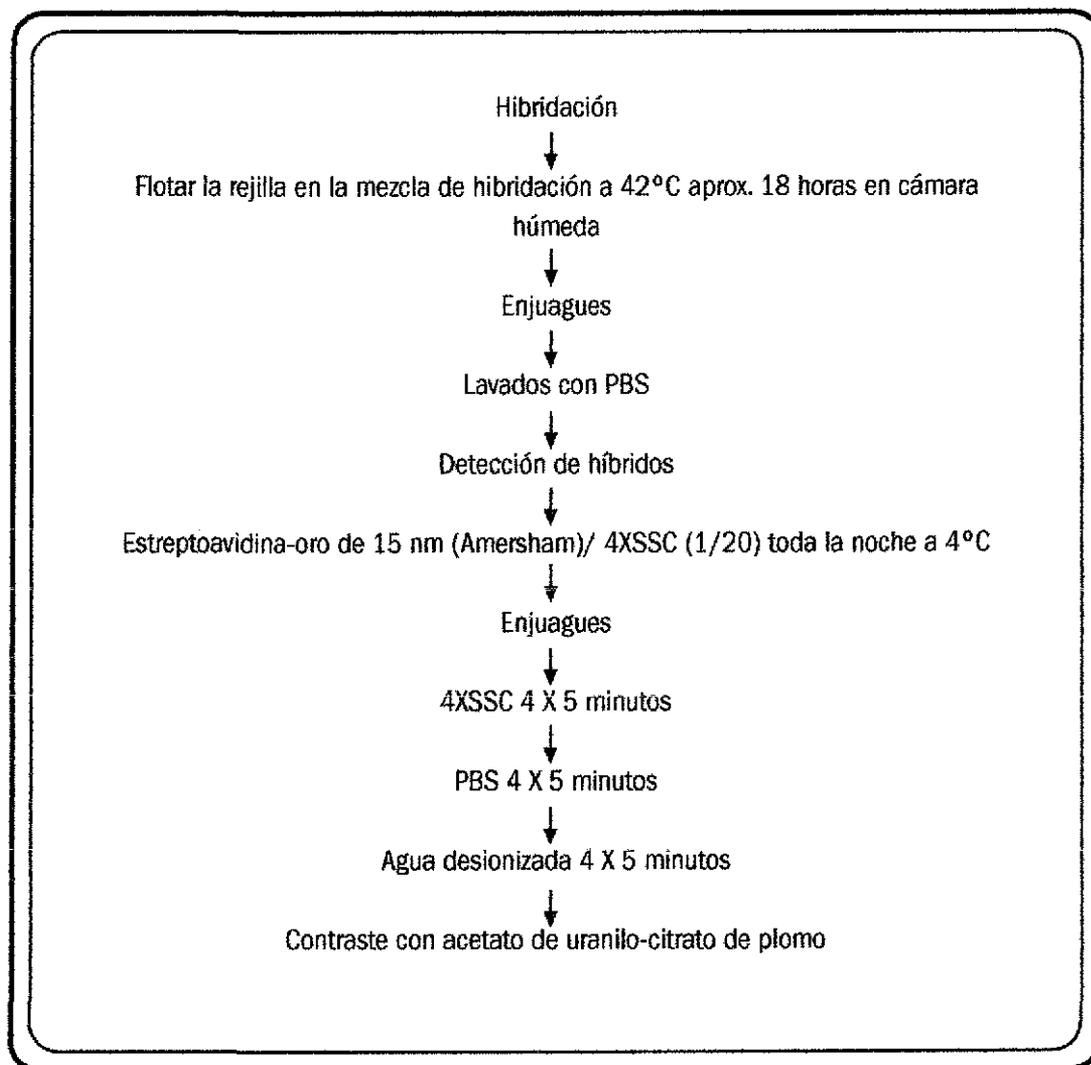
Flotar en PBS por 15 minutos

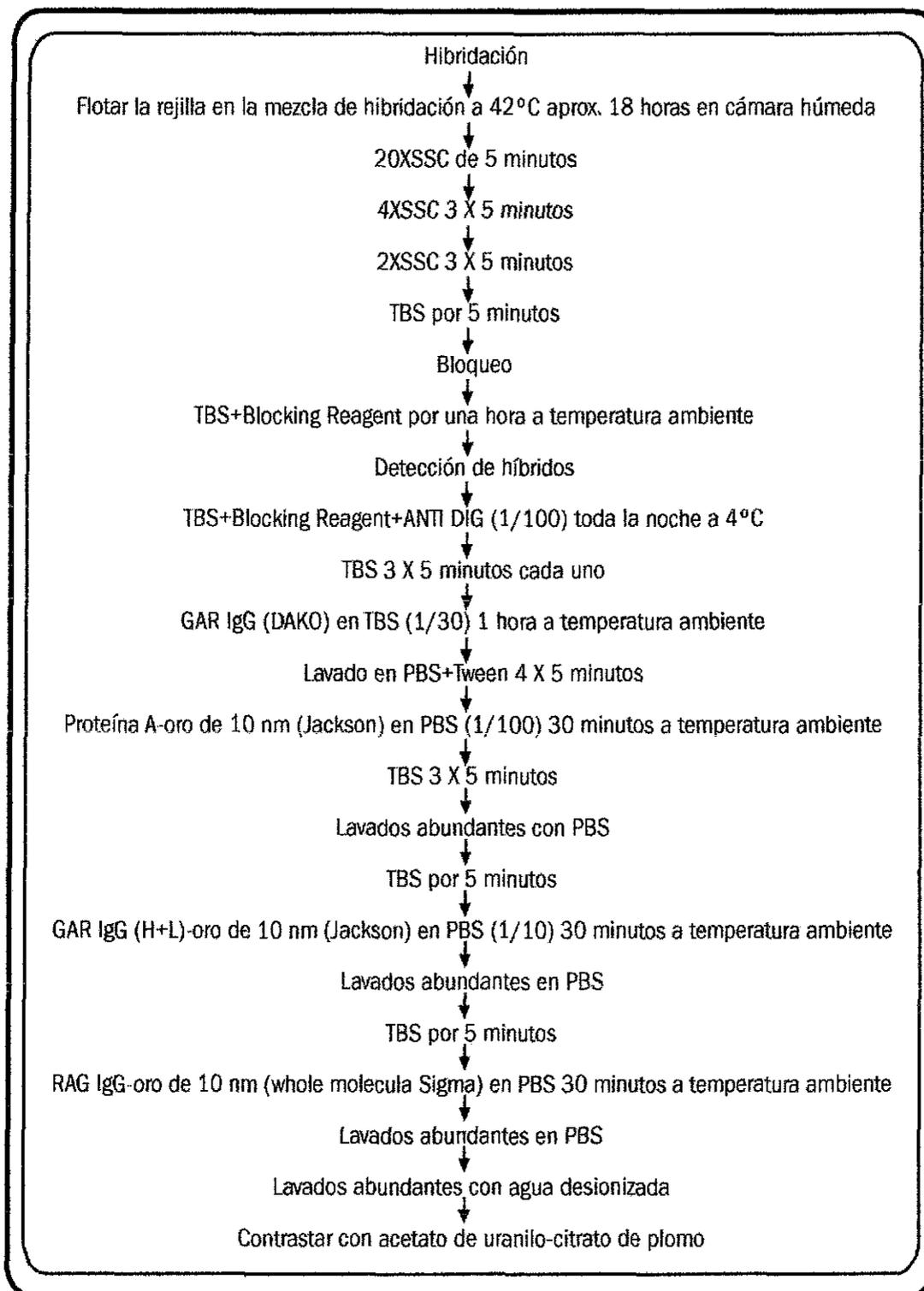


Enjuagar en agua desionizada por 15 minutos



Contraste con acetato de uranilo-citrato de plomo

**Diagrama de flujo 2**

**Diagrama de flujo 3**

## VI. RESULTADOS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### VI.1 Ultraestructura de las etapas de la profase meiótica I.

#### Espermatogonias tipo B

Los cortes seriados de espermatogonias tipo B contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, muestran todos los componentes estructurales de los núcleos en interfase (Figura 2).

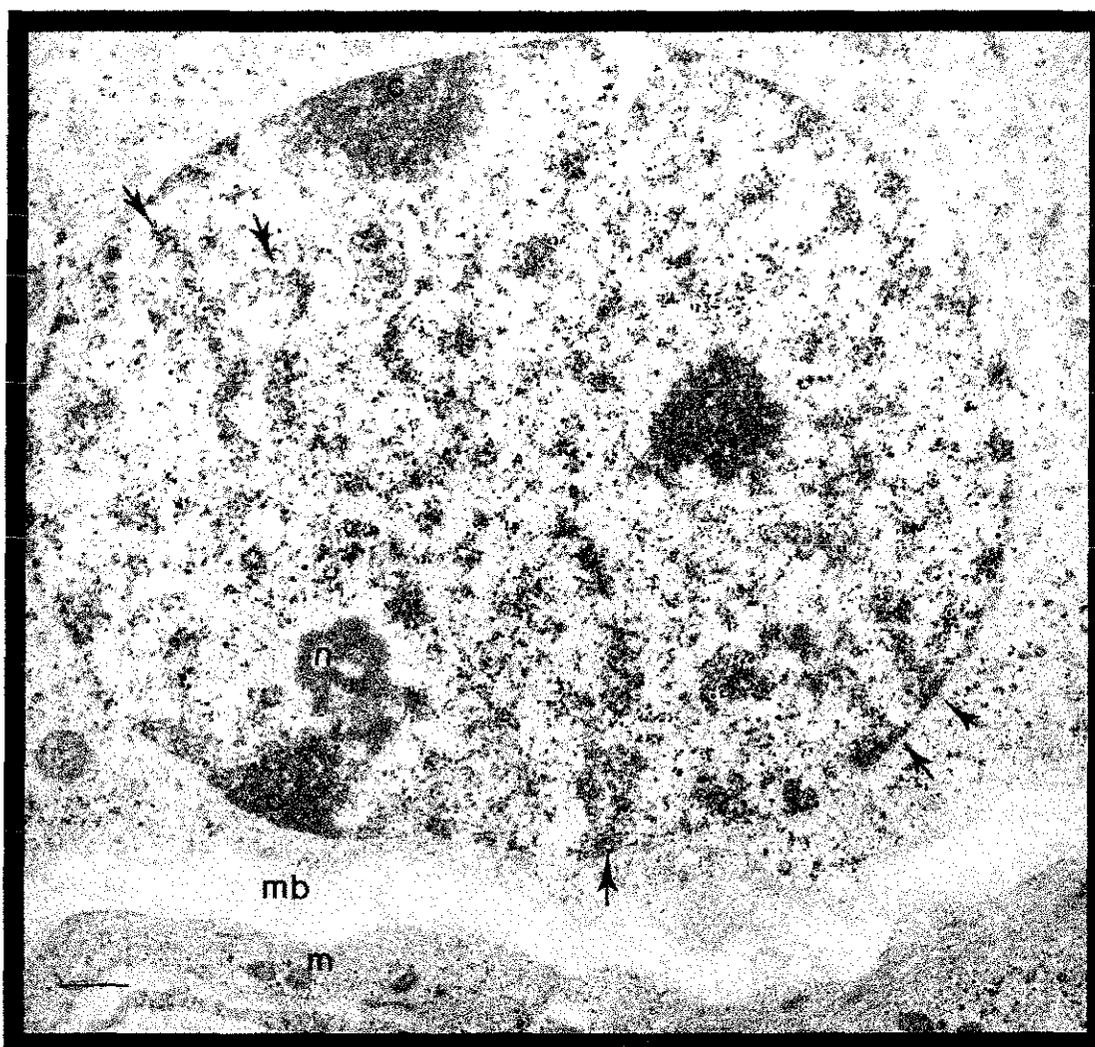


Figura 2

Espermatogonia B que muestra sucesiones de cromatina semicompacta y laxa (flecha) que recorren largas extensiones del volumen nuclear. Se observan cúmulos de cromatina compacta (c) adosados a la envoltura nuclear, así como el nucleolo. En el citoplasma de la espermatogonia tipo B existen escasos ribosomas y poco retículo endoplásmico. La espermatogonia está descansando sobre la lamina basal (mb). Se advierte una célula miode (m) del túbulo seminífero del testículo de cobayo. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 500 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Nuestras observaciones demuestran que existen dos arreglos muy particulares de la cromatina. Uno de ellos está formado por sucesiones de grumos de cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear, mientras hacia el interior del núcleo, los cúmulos de cromatina son semicompactos teniendo siempre continuidad con cromatina laxa, por lo que es notoria la alternancia de cromatina semicompacta y cromatina laxa. Esta alternancia en la disposición de la cromatina se proyecta hacia el interior del núcleo recorriendo largas distancias, ocupando hasta la mitad del diámetro nuclear (Figura 3).

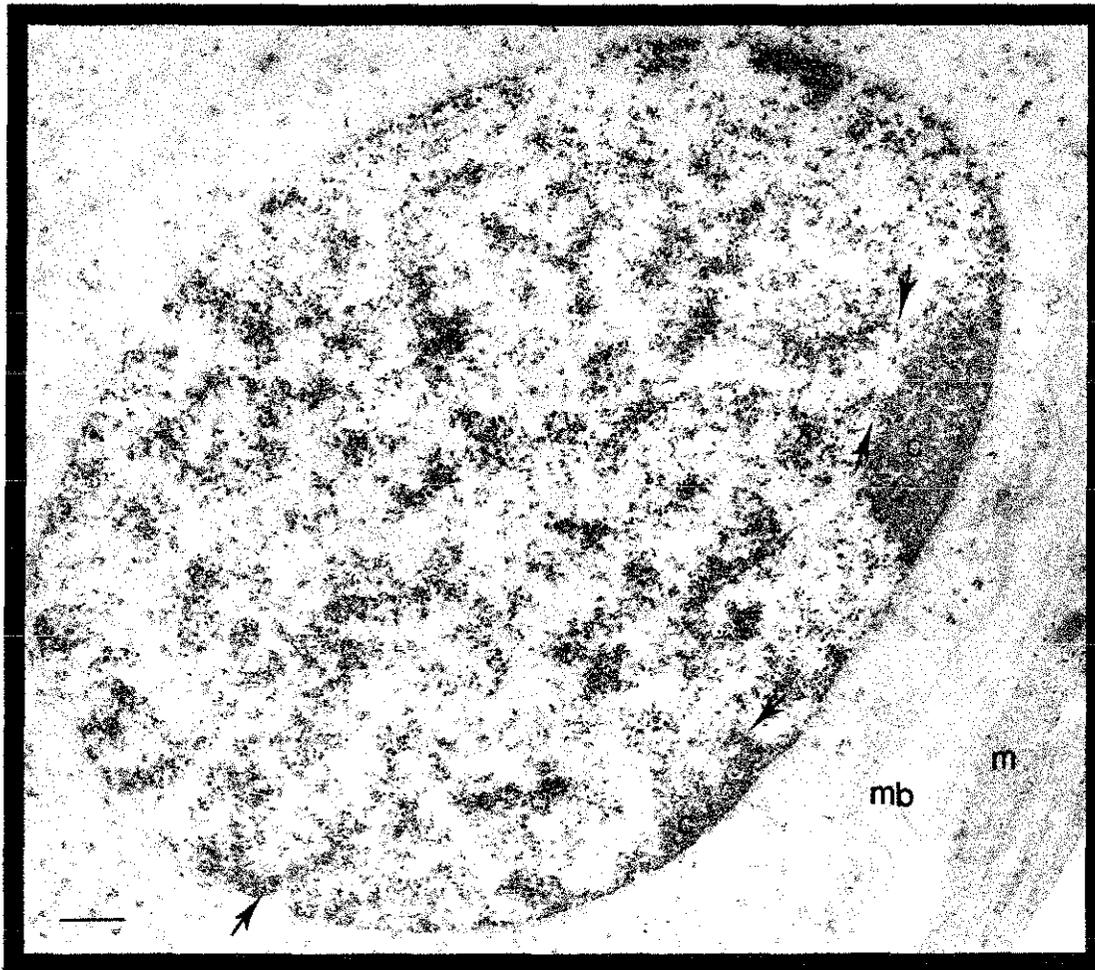


Figura 3.

Espermatogonia tipo B. Se observan las alternancias de cromatina compacta y laxa (flecha) que parten de cúmulos de cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear (c), no se nota la presencia de gránulos pericromatinianos. Se nota en el citoplasma de la espermatogonia tipo B escaso retículo endoplásmico y pocas ribosomas. La espermatogonia está descansando sobre la lamina basal (mb). Se advierte una célula hijode (m) del túbulo seminífero del testículo de cobayo. Contraste general de acetato de uranio-citrato de plomo. Barra 500 nm

Otro de los arreglos evidenciados en las espermatogonias tipo B, que constituye una característica particular, es la presencia de estructuras de cromatina laxa alineadas en paralelo. El eje principal y las ramas laterales de los ordenamientos en paralelo de cromatina laxa están

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

compuestos por estructuras tipo lampbrush o plumuladas, de las cuales parten asas de diferentes tamaños. Estas asas dependiendo de su longitud es posible observarlas en un corte, ya que su longitud no rebasa los 60 nm que es el grosor del corte. Sin embargo algunas de estas asas son de mayor longitud, por lo que se mostraron como filamentos o ramificaciones largas que parten del eje principal de la estructura plumulada. Los cortes seriados evidenciaron que los ordenamientos pueden ocupar dominios del espacio nuclear o pueden estar presentes en un sólo corte (Figura 4).

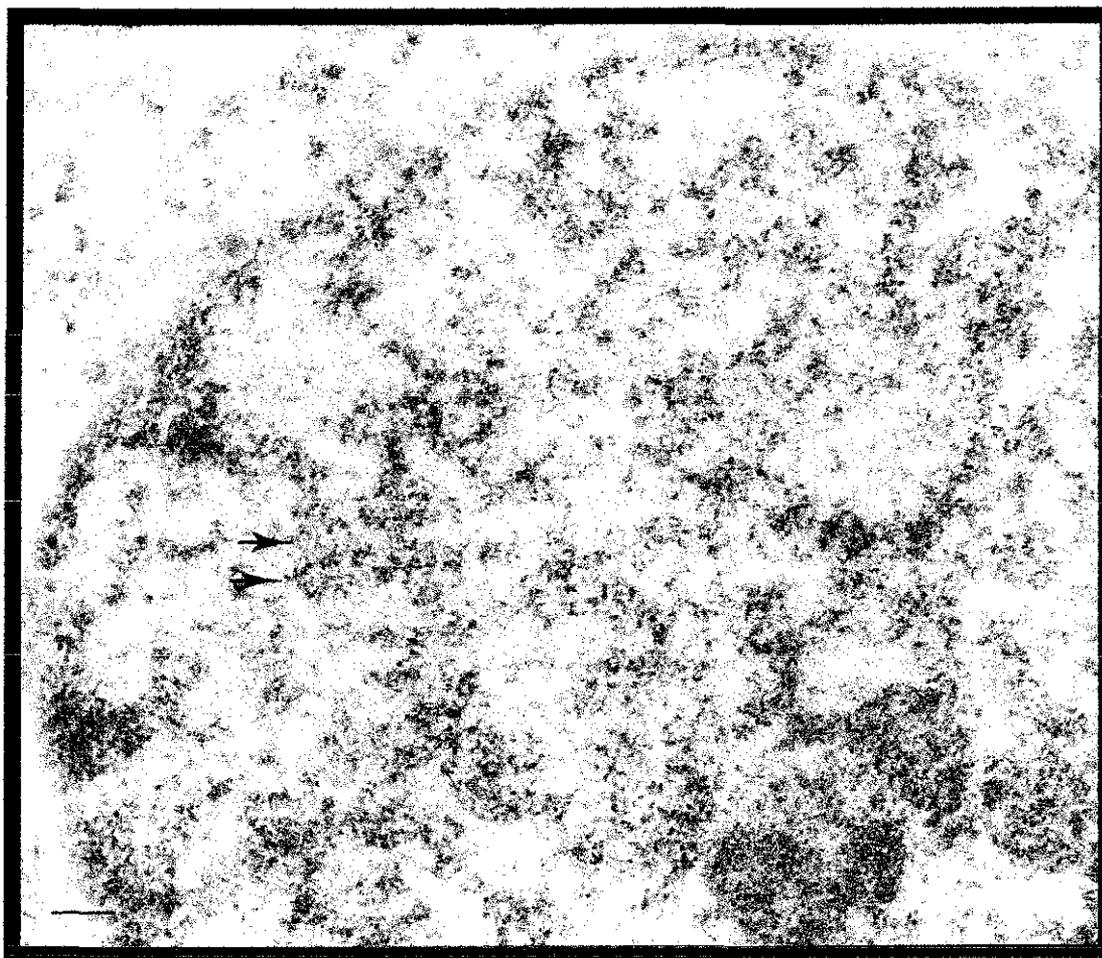


Figura 4.

Espermatogonia tipo B que muestra estructuras plumuladas (flecha) organizadas en paralelo de las que parten asas de diferentes tamaños. Estos ordenamientos pueden ocupar un tercio o más del volumen nuclear o estar presentes en un solo corte. Note que no se observan gránulos pericromatinianos en el nucleoplasma. Contraste general acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 250 nm.

Otra característica de las espermatogonias tipo B es la presencia de más de una ramificación de cromatina laxa saliendo de los grumos de cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear, dichas ramificaciones se dirigen hacia el centro del núcleo. En algunas regiones la cromatina semicompacta que se alterna con la cromatina laxa se puede encontrar agrupada

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

de manera paralela (Figuras 3 y 4).

Con la técnica de tinción específica de amina-osmio para ADN y la inmunolocalización para ADN, se pudo demostrar que estos arreglos característicos de las espermatogonias de tipo B se encuentran constituidos por ADN con diferentes grados de compactación, así como que los plumulados están formados por filamentos de cromatina (Figura 5).

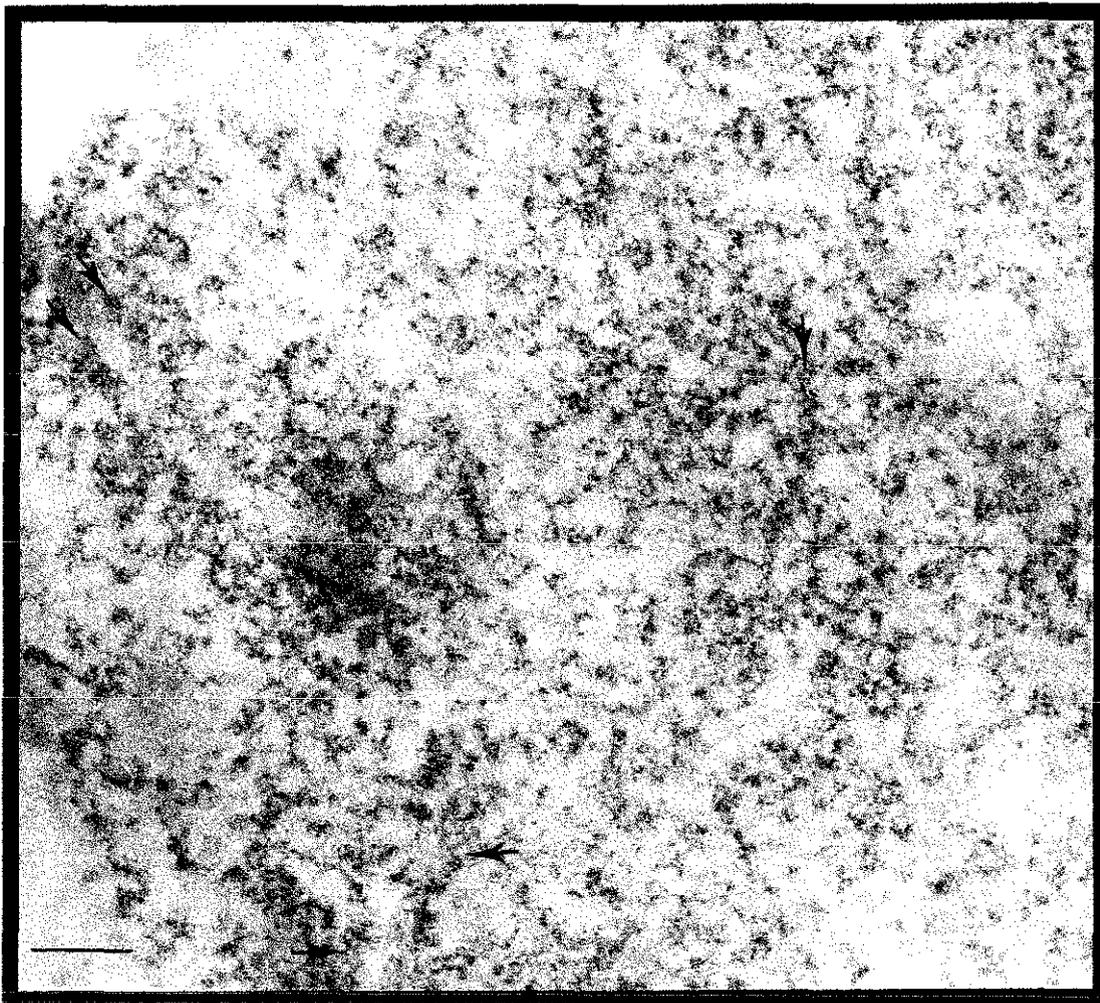


Figura 5.

Espermatogonia tipo B contrastada con el método de tinción de amina de osmio específico para ADN. Las estructuras plumuladas (flecha) están conformadas por ADN. Algunas de ellas se observan alineadas en paralelo o de manera aislada en el núcleo. Barra 250 nm

Las estructuras plumuladas están asociadas con fibrillas y gránulos de RNP que se tiñen con el método preferencial de acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo. Las estructuras tipo lampbrush o plumuladas se presentan como estructuras EDTA positivas que tienen ramificaciones muy finas que parecen tocarse cuando dos de ellas se encuentran alineadas en paralelo (Figura 6).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

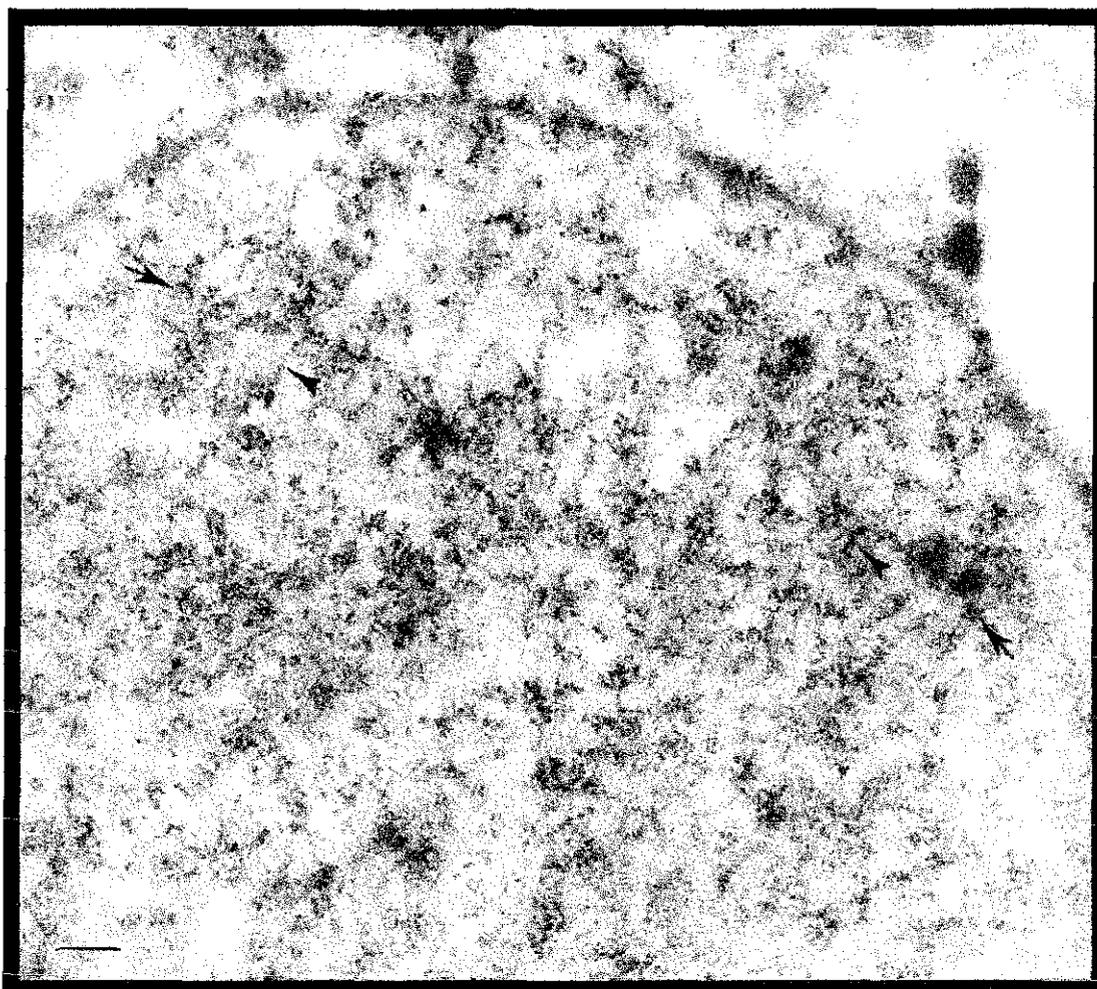


Figura 6.

Espermatogonia tipo B contrastada con el método preferencial para RNP. Se muestra la distribución del ARN en las estructuras plumuladas (flecha). Existen gránulos y fibras de RNP asociadas a las estructuras plumuladas. No se aprecia la presencia de gránulos pericromatinianos (cabeza de flecha). Barra 25 nm.

Otro dato muy interesante, es la escasa presencia de gránulos pericromatinianos en el interior del núcleo en esta etapa (Figuras 2 y 3).

### **Preleptoteno**

Durante la interfase meiótica o preleptoteno, los racimos de cromatina compacta en contacto con la envoltura nuclear son progresivamente más pequeños y el nucleolo migra a la periferia del núcleo. La descompactación de la cromatina da lugar a estructuras plumuladas largas de cromatina laxa asociada con fibrillas de RNP y gránulos (Figura 7).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

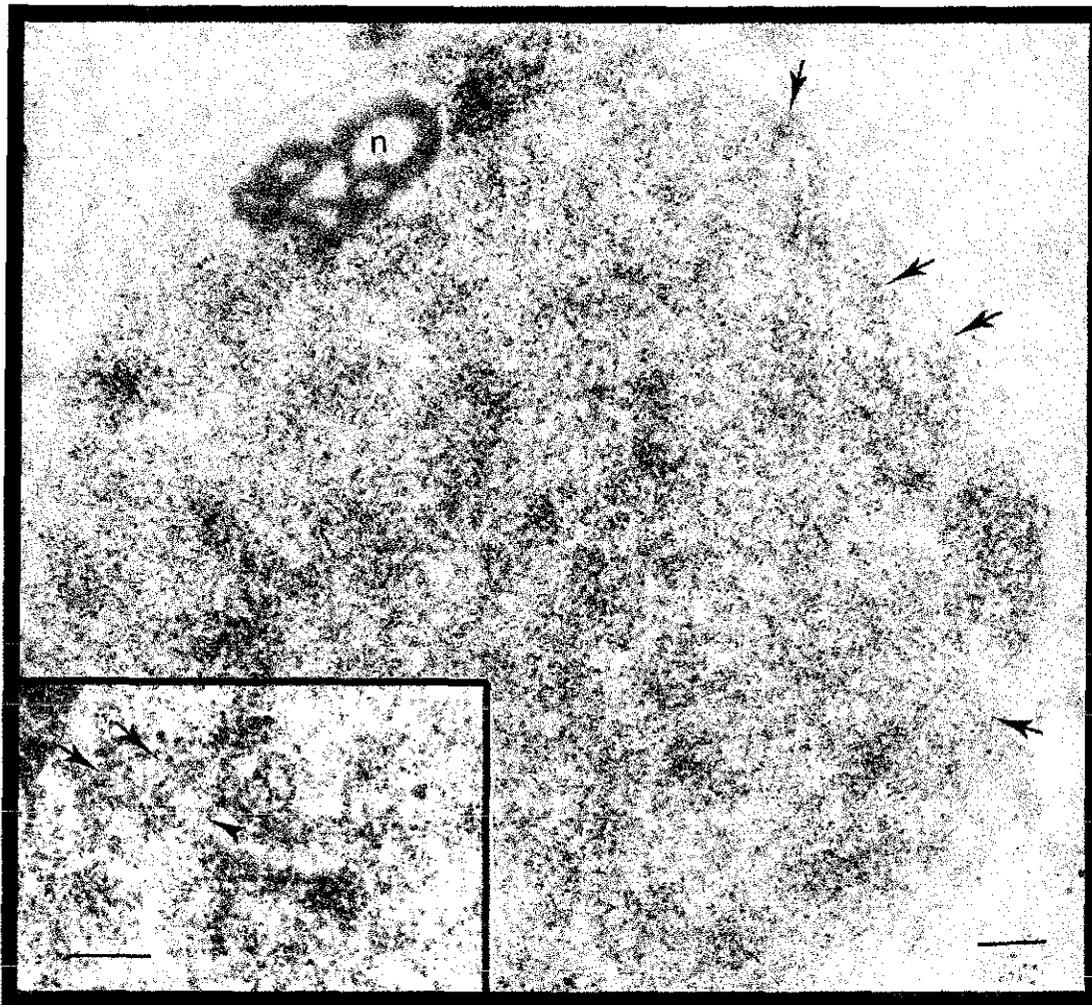


Figura 7

Célula premeiótica o en preleptoteno con escasa cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear y largas estructuras plumuladas alineadas en paralelo (flecha). El nucleolo se encuentra desplazado hacia la periferia. Barra 500 nm inserto. Se muestran dos elementos plumulados alineados en paralelo unidos por filamentos transversales (cabeza de flecha) formando una escalerilla de doble cuerda (flecha). Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo Barra 200 nm

Los cortes seriados demuestran que las células en preleptoteno contienen estructuras plumuladas cuyos ejes están formados generalmente por dos filamentos finos que contienen ADN situados a una distancia entre 10 a 20 nm. Frecuentemente los pares de las estructuras plumuladas se encuentran alineadas en paralelo y relacionadas por filamentos constituidos por ADN. Tanto los ejes como los filamentos transversales que los unen se asocian con fibrillas que contienen RNP. El conjunto de estos elementos forma una estructura semejante a una escalerilla de doble cuerda (Figura 7). La distancia entre el eje de los plumulados puede variar, pues en algunos casos se observan muy cercanas, entre 40 y 100 nm y en otros casos la distancia es mayor y va de 150 a 300 nm. La descondensación del material nuclear durante la interfase meiótica permite una clara visualización de fibras alineadas en paralelo de cromatina extendida e interrelacionadas por finos filamentos y estructuras semejantes a

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

cuentas de rosario que corresponden a fibrillas de RNP.

Las estructuras plumuladas se observan en el material que ha sido fijado con detergente en condiciones hipotónicas a pH de 9 y tratado con ARNasa al 2% con una disminución en las ramificaciones que parten del eje principal. Cuando estas estructuras plumuladas se encuentran alineadas en paralelo es evidente el vacío que existe entre los dos ejes de la *escalerrilla de doble cuerda*. Estos resultados nos indican que la mayor parte de dichos filamentos transversales están conformados por ARN, lo que nos sugiere que probablemente estas estructuras constituyan unidades transcripcionales (Figuras 8 y 9).

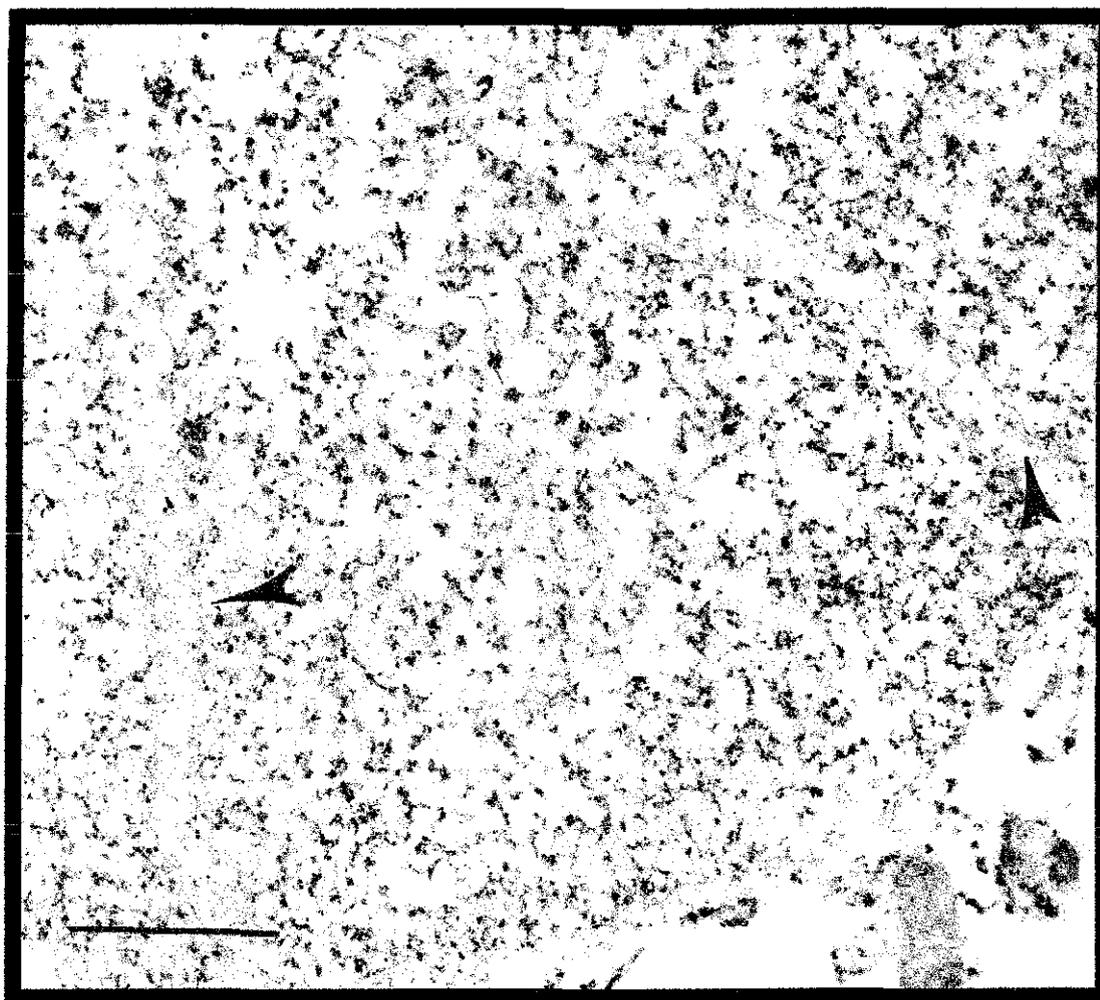


Figura 8

Célula premeiótica o en preleptoteno, fijada en condiciones hipotónicas en presencia de pequeñas concentraciones de detergente. La muestra se trató con ARNasa al 2%. Se observa que en la región en donde los plumulados se alinean en paralelo (cabeza de flecha), las regiones centrales de alineamiento de dos pares de estructuras plumuladas están menos contrastadas ya que la hidrólisis del ARN suprimió muchas de los filamentos RNP que abundan en la región de reconocimiento. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 600 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

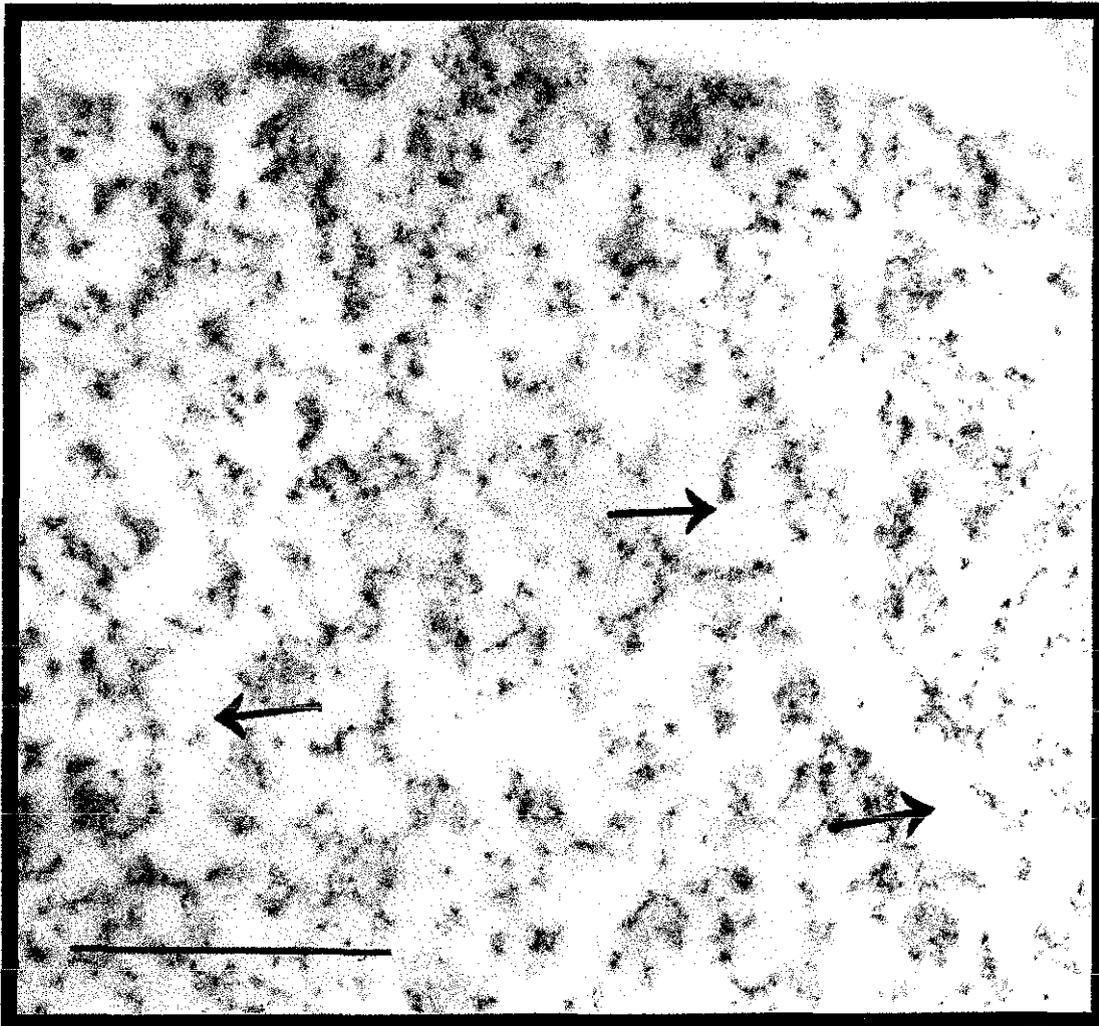


Figura 9.

Célula premeiótica o en preleptoteno, fijada en condiciones hipotónicas en presencia de pequeñas concentraciones de detergente. La muestra se trató con ARNasa al 2%. Los plumulados se encuentran contrastados por el método de tinción de amina de osmio específico para ADN. Se muestra la región central entre pares de estructuras plumuladas alineadas en paralelo en donde existen pocas fibrillas de cromatina (flecha). Barra 1000 nm

Al final del estado del preleptoteno la cromatina está completamente descompactada ocupando el espacio nuclear casi en su totalidad.

### Leptoteno

En los cortes seriados de espermatoцитos en leptoteno, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, se vio que existe una disminución muy notoria de los grumos de cromatina, observándose por lo tanto, cromatina laxa en todo el núcleo y unos cuantos grumos de cromatina semicompacta. Continúa la presencia de las estructuras plumuladas, así como, la organización de éstas en una disposición en paralelo o aisladas. Cada eje de las estructuras plumuladas está compuesto por dos filamentos axiales de cromatina que se encuentran

rodeados por asas radiales de manera muy cercana y en paralelo, semejando estructuras pequeñas microplumuladas (Figura 10).

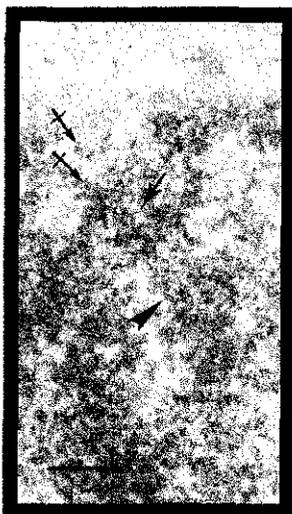


Figura 10

Espermatocito en leptoteno que muestra dos finos ejes paralelos (flecha atravesada) que se encuentran rodeados por numerosos filamentos laterales largos, los que probablemente corresponden a asas. Uno de los ejes parte de la envoltura nuclear, es posible observar algunas asas cortas (cabeza de flecha). Entre los dos ejes hay filamentos transversales que atraviesan de un lado a otro (flecha). Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 300 nm

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Estos filamentos axiales que constituyen la estructura plumulada, estan organizados en paralelo y se encuentran unidos por finas fibras que atraviezan de manera franca de un lado a otro (Figura 10). La asociación de estos filamentos axiales en paralelo constituyen una estructura plumulada común (Figura 11).

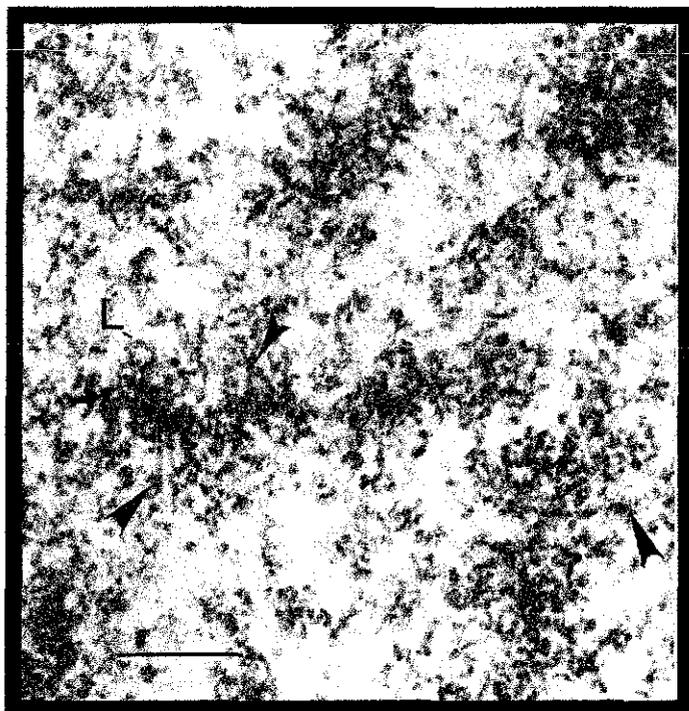


Figura 11.

Espermatocito en leptoteno que muestra un filamento axial constituido por dos estructuras microplumuladas (flecha). Se advierten numerosos filamentos laterales que se extienden por el nucleoplasma (cabeza de flecha). Note el asa de cromatina en forma de luz (L). Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 400 nm

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Nuestras observaciones muestran que la distancia entre estos filamentos axiales que forman la estructura plumulada es variable (20-80 nm). En este estadio los filamentos de cromatina que forman puentes entre las estructuras plumuladas paralelas son mucho más frecuentes que en los anteriores.

Cuando comienza a formarse el elemento axial se presenta el depósito de material que provoca la densificación de manera regional en los filamentos axiales de la estructura plumulada (Figura 12 y 13a).

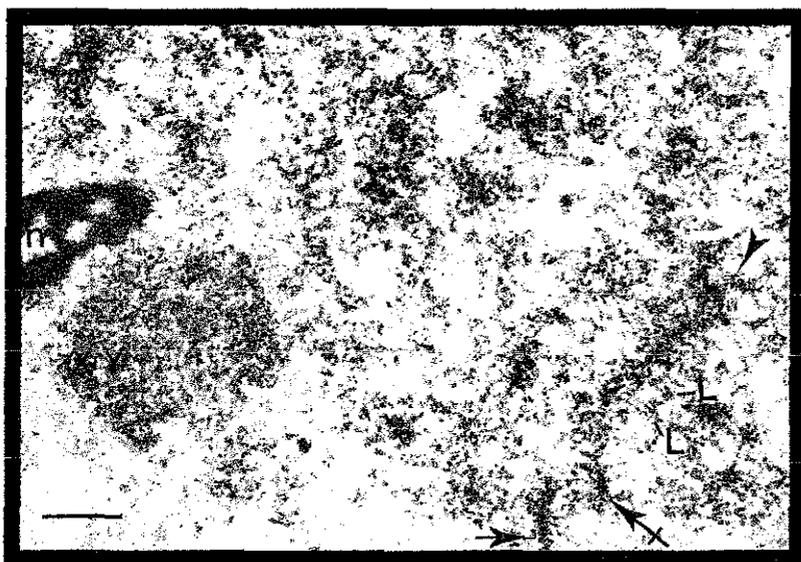


Figura 12.

Espermatocito en leptoteno. Se observan dos elementos axiales en formación que inician su desarrollo en la cercanía de la envoltura nuclear (flecha). La constitución del elemento axial se manifiesta por el depósito de material que provoca la densificación de los ejes cromosómicos leptoténicos. Estos ejes están conformados por dos finos filamentos que se encuentran muy cercanos y que se tiñen intensamente (flecha atravesada). Uno de los elementos axiales en formación muestra continuidad con estructuras plumuladas (cabeza de flecha). Algunas de las asas laterales de los ejes tienen en grosor del corta (L) esto lo sabemos por las reconstrucciones tridimensionales. Se observa el nucleolo (n) y el cuerpo XY cercanos a la envoltura nuclear. Contraste general de acetato de uranio-citrato de plomo. Barra 500 nm.

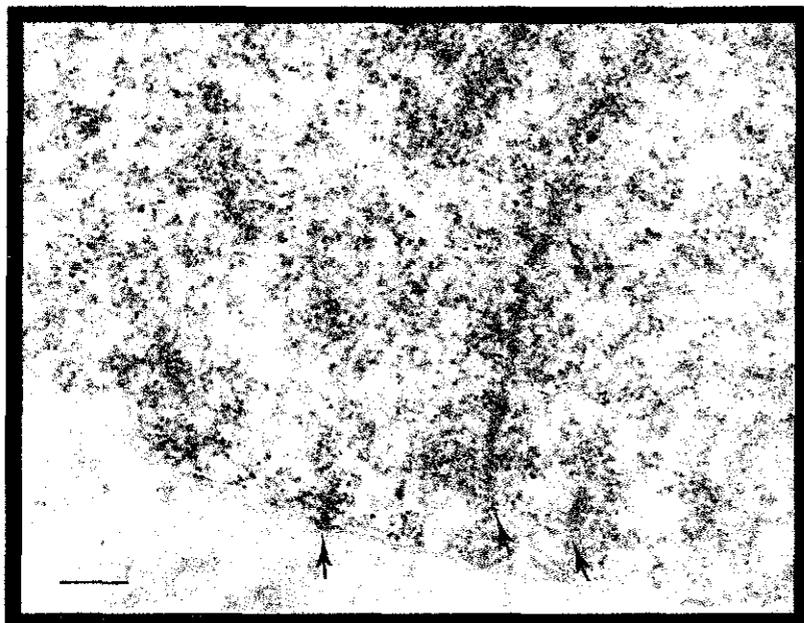


Figura 13a

Espermatocito primario en leptoteno. Elementos axiales partiendo de la envoltura nuclear arreglados en paralelo (flecha) que muestran continuidad con estructuras plumuladas. Contraste general de acetato de uranio-citrato de plomo. Barra 250 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Ambos filamentos axiales constituyen el eje cromosómico leptoténico. Los ejes cromosómicos leptoténicos muestran una clara continuidad con las estructuras plumuladas cuando ambos están contenidos en el grosor del corte. Los ejes cromosómicos leptoténicos son estructuras cilíndricas de 35 a 55 nm de diámetro las cuales contienen dos filamentos finos (Figura 13a). Los elementos axiales que se encuentran en paralelo en la proximidad de la envoltura nuclear se acercan uno al otro a distancias que varían (180-350 nm) y conforme se alejan hacia el interior del núcleo la distancia entre estos se incrementa (400-800 nm). Los filamentos radiales de estos elementos corresponden a asas largas que generalmente no es posible delinear en un corte, aunque algunas ocasiones están contenidas en el grosor del corte mostrándose como asas cortas (40-200 nm). La frecuencia con la que se presentan estas asas cortas se incrementa cuando los ejes cromosómicos leptoténicos comienzan a constituirse en elementos axiales. Estas asas están desnamente distribuidas y en forma casi periódica a lo largo del filamento (Figura 12).

Los elementos axiales en formación muestran una reacción fuertemente positiva con las técnicas citoquímicas para ARN (Figura 13b).

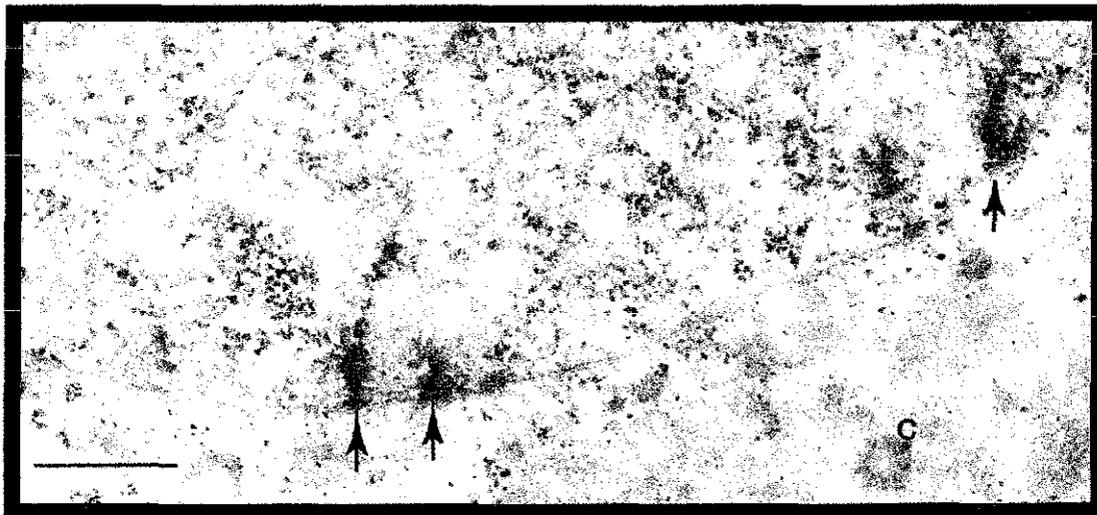
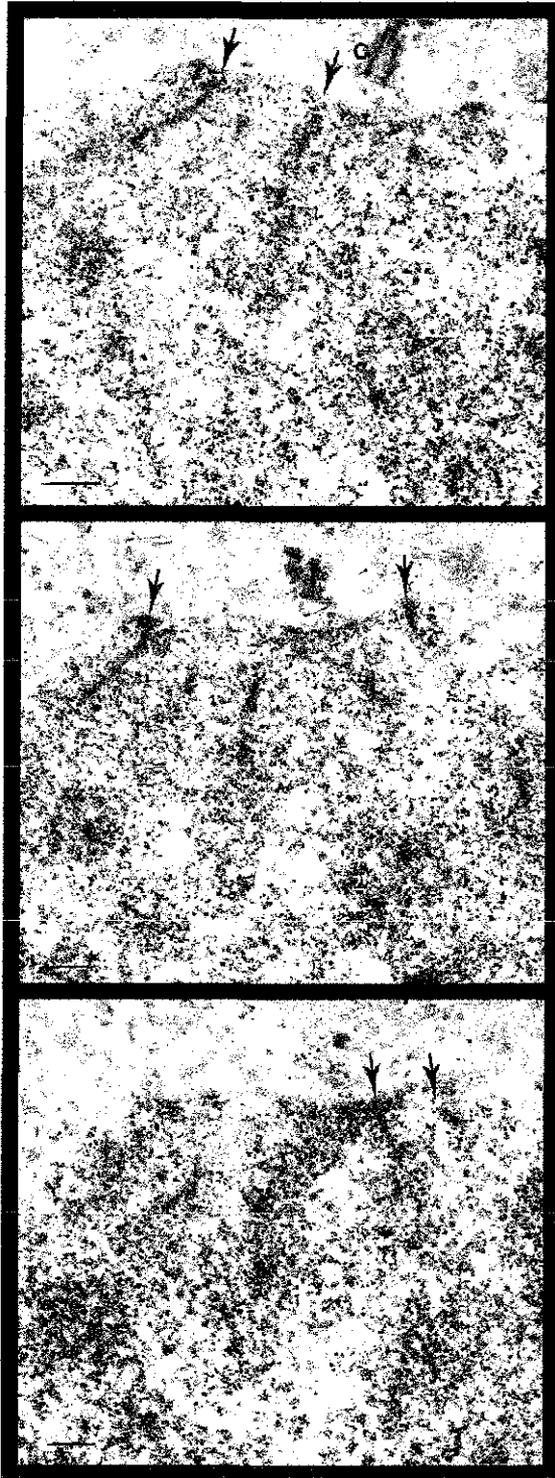


Figura 13b

Espermatozoide en leptoteno contrastado con el método de tinción preferencial de Bernhard (1969) para RNP. Se observan elementos axiales cortos cercanos a la envoltura nuclear que están intensamente teñidos (flecha). Dos de ellos se encuentran alineados en paralelo. Se muestran numerosas fibras y gránulos de RNP distribuidos por todo el nucleoplasma. Se evidencia en el citoplasma el centriolo (c). Barra 650 nm.

Cuando el elemento axial se está formando las regiones de densificación son generalmente cortas, discontinuas y la mayoría de ellas aparecen como pares en contacto con la envoltura nuclear, provocando que en ocasiones se observe una depresión en la envoltura nuclear. Los cortes seriados mostraron la presencia de centriolos durante el desarrollo de los elementos axiales alineados en paralelo adosados a la envoltura nuclear (Figura 14).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 14.

Espermatocito en la transición leptoteno-zigoteno. Tres cortes adyacentes de una serie que evidencia la formación de los elementos axiales (flecha) en contacto con la envoltura nuclear. Los elementos axiales en los diferentes cortes muestran continuidad con estructuras plumeadas. Se puede observar el centriolo (c) cercano al núcleo formando una concavidad. Estas características apuntan a que la célula está en la etapa del bouquet. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 400 nm.

La presencia de pares de elementos axiales no excluye que se observaran elementos axiales aislados.

En la etapa de leptoteno avanzado las regiones de cromatina comienzan a compactarse alrededor del eje o elemento axial y las asas radiales del eje se acortan. La reconstrucción tridimensional demuestra que el elemento axial guarda la disposición de las estructuras plumuladas alineadas las que recorren fracciones de micrómetros dentro del volumen nuclear. Frecuentemente observamos que los pares de elementos axiales se acercan uno del otro en la proximidad de la envoltura nuclear (Figuras 12 y 13). Estas características que hemos mencionado coinciden más con las descripciones morfológicas del cigoteno realizadas por los autores clásicos (Paniagua et al., 1993; Solari, 1999).

Es importante señalar que en el citoplasma de las células en leptoteno no se presentaron abundantes ribosomas o retículo endoplásmico rugoso como indicadores de síntesis proteica.

### Cigoteno

En las reconstrucciones tridimensionales durante la transición leptoteno-cigoteno se observan varios ejes incompletos en forma de bouquet. Así como la presencia de varios nucleolos hacia la periferia. En este estadio fue común observar a los nucleolos como estructuras conspicuas con centros fibrilares y su región fibrilar densa bien desarrollada. Al seguir las series se observó que la mayoría de los elementos axiales se localizan principalmente concentrados en un tercio del volumen nuclear que coincide con la presencia de los centriolos (Figura 14). La elongación de los elementos axiales alineados está frecuentemente acompañada por el inicio del apareamiento final, que es la formación del CS. La aparición de una región central con la exclusión de cromatina es una característica inicial de la sinapsis (Figura 15).

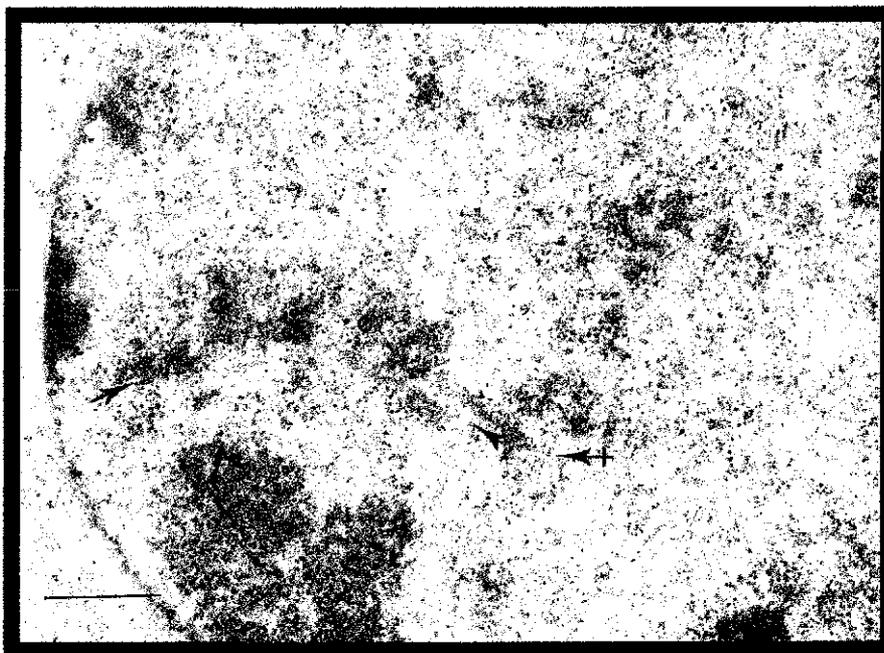


Figura 15

Espermatoocito en cigoteno. Se observa la formación de un CS. El elemento axial (flecha) tiene filamentos de cromatina hacia la parte externa (c). La zona central se muestra vacía lo que indica la formación de una zona de exclusión (cabeza de flecha). Se aprecia la continuidad entre el elemento axial y una estructura plumulada (flecha atravesada). Contraste acetato de uranio-citrato de plomo. Barra 750 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Con los métodos de tinción para ADN se observó que se llevan a cabo cambios importantes en la distribución de la cromatina cuando se da la formación del CS. El espacio central está desprovisto de las fibrillas que contienen ADN, excepto por algunas pocas fibrillas transversas de cromatina y cortas asas que salen del elemento lateral. En los espermatoцитos en cigoteno las estructuras plumuladas, mantienen las mismas características observadas en las etapas previas.

Durante el inicio del cigoteno se evidenció la aparición de extensiones cortas de CS con tres modalidades principalmente: en contacto con la envoltura nuclear; cercanos a la envoltura nuclear o en la región interna del núcleo (Figura 16).

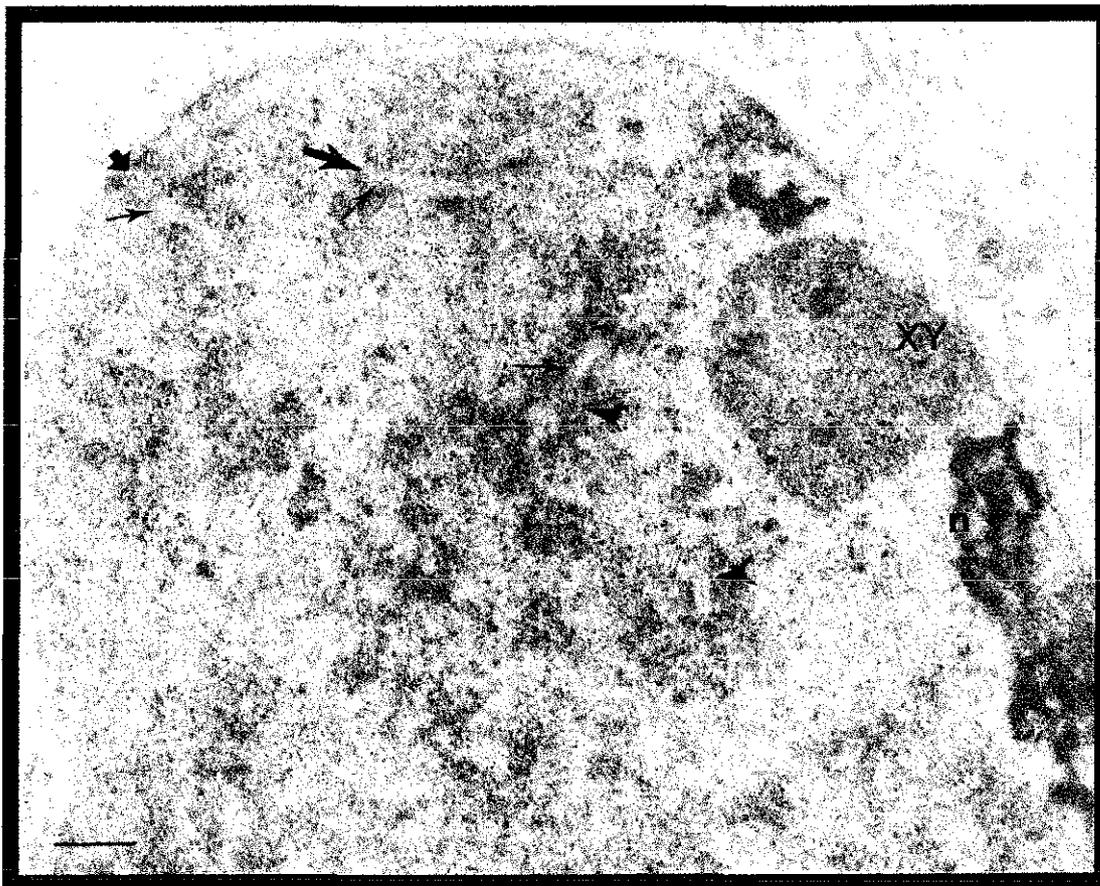
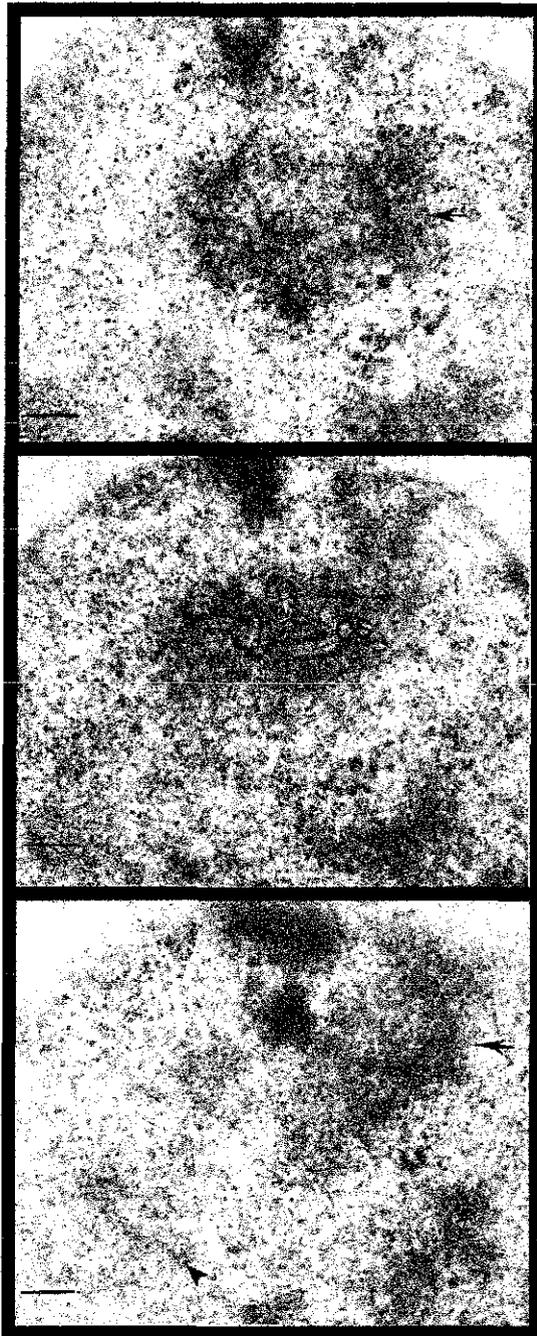


Figura 16

La formación de CS se puede dar partiendo de la envoltura nuclear (flecha gruesa) cercano a la envoltura nuclear (flecha) y en la región intersticial (cabeza de flecha). Durante la formación de los CS se observa en la región central una zona de exclusión (flecha doblada). Se observa en la periferia del núcleo el cuerpo XY y el nucleolo. Aun no son evidentes los gránulos pericromatinianos en el nucleoplasma. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 500 nm.

Los elementos axiales generalmente se encontraron ya alineados antes de la sinapsis. En los espacios entre ambos elementos axiales se observaron numerosos puentes de finos hilos compactos de cromatina asociados con fibrillas de RNP y gránulos. La distancia final entre los elementos axiales durante el apareamiento es ocasionalmente menor que la distancia de

100 nm entre los elementos laterales del CS. El elemento central y los filamentos transversos del CS aparecen de manera progresiva entre los elementos laterales, creando la zona de exclusión en la que no hay filamentos de cromatina ni estructuras RNP. Simultáneamente a este proceso, se da la compactación y reorganización espacial de la cromatina, manifestada por la disposición de las asas cortas y su incorporación en el interior de los elementos laterales del CS, así como de la aparición de una capa de cromatina compacta que rodea al CS en desarrollo. Comienzan a mostrarse en esta etapa pequeños cúmulos de cromatina compacta asociados a la envoltura nuclear (Figura 17).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 17

Espermatocito en cigoteno. Serie de tres cortes adyacentes en la que se observa un CS que no muestra continuidad en otros cortes. El sitio en el que se ubicaría el CS, hay fibras de cromatina en proceso de compactación en diferentes direcciones (flecha), así como estructuras plumuladas (cabeza de flecha). Se advierten además cúmulos de cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 400 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

No distinguimos con frecuencia imágenes claras de elementos axiales constituyendo estructuras semejantes a "Y griegas" que nos indicaran elementos axiales convergiendo para formar una sinapsis. Cuando los elementos axiales constituyen el CS se encuentran ya paralelos y cercanos. Durante el cigoteno se reconoció que los elementos axiales recorren distancias que varían entre fracciones de uno a dos micrómetros. La mayoría de los elementos axiales que seguimos en las series están estructurados de manera incompleta, por lo que la formación del CS a partir de elementos axiales largos rara vez fue observada. Los cortes seriados además evidenciaron que las extremidades del CS no siempre son continuas con elementos axiales. Los extremos de los CS en desarrollo en algunas ocasiones fueron continuos con las estructuras plumuladas o las escalerillas de doble cuerda (Figura 15). Frecuentemente advertimos que al final de la formación del CS se presentaba una maya de fibras de cromatina semicompacta que se elongaba en diferentes direcciones o cúmulos de cromatina semicompacta que aparecían varios nanómetros más adelante (Figura 17).

### Paquiteno

En los espermatocitos en paquiteno notamos en el núcleo las características ultraestructurales descritas por los clásicos, prácticamente es muy raro observar las estructuras plumuladas, así como las "escalerillas de doble cuerda". Otro contraste entre los espermatocitos en paquiteno y las células de las etapas previas, es la presencia de gránulos pericromatinianos en la periferia de la cromatina de los elementos laterales (Figura 18).

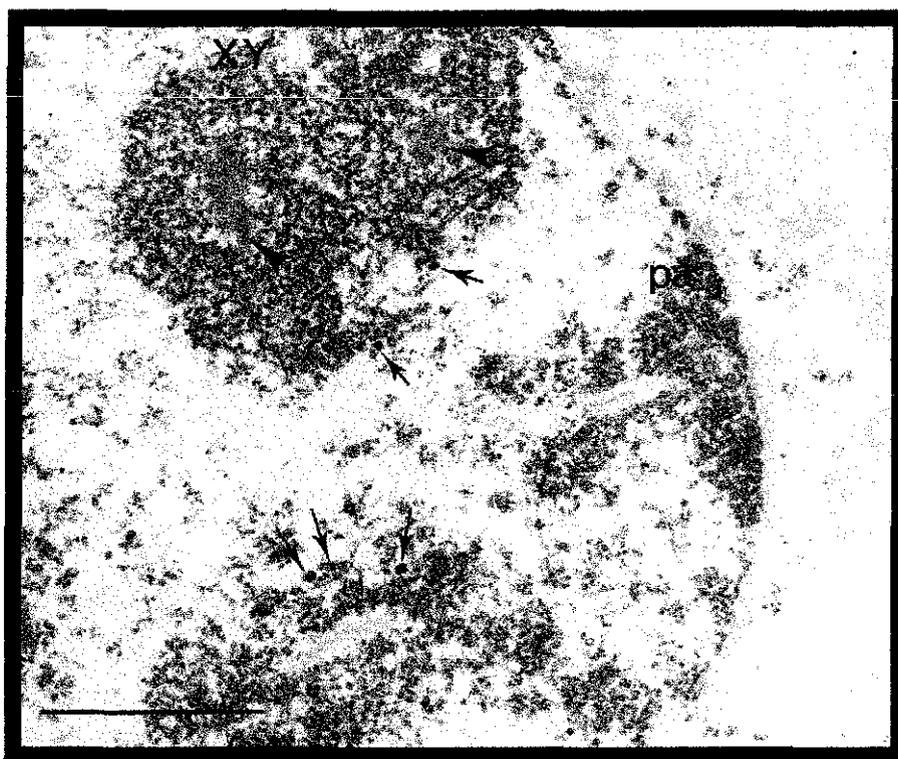


Figura 18.

Espermatocito en paquiteno que muestra un CS con su placa de adhesión (pa), y gran cantidad de gránulos pericromatinianos (flecha) en la cromatina de la periferia de los elementos laterales. En el cuerpo XY se observan fragmentos de los elementos laterales (cabeza de flecha), así como gránulos pericromatinianos en la periferia (flecha). Contraste general de acetato de uranio-citrato de plomo. Barra 300 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los complejos sinaptonémicos ya formados recorren largas extensiones en el núcleo. La vista de lado de los elementos laterales de los CS demuestran la existencia de estriaciones longitudinales de aproximadamente 0.2 micrómetros de ancho (Figura 19).

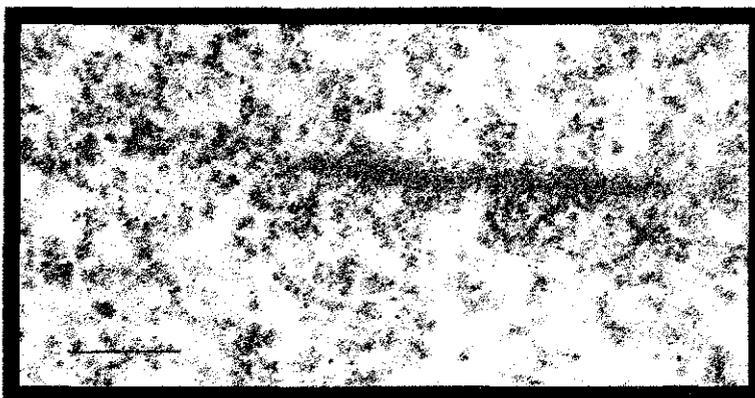


Figura 19

Elemento lateral de un CS de espermatocito en paquiteno. Se advierten estriaciones transversales que muestran una periodicidad. Contraste general de acetato de uranilo citrato de plomo. Barra 200 nm

En la cara interna (que da hacia la región central del CS) de los elementos laterales advertimos con los métodos de tinción general y específicos para ADN que corren uno o dos filamentos que tienen un grosor irregular. Estos filamentos frecuentemente los distinguimos como hilos de perlas que muestran un alineamiento (Figuras 20 y 21).

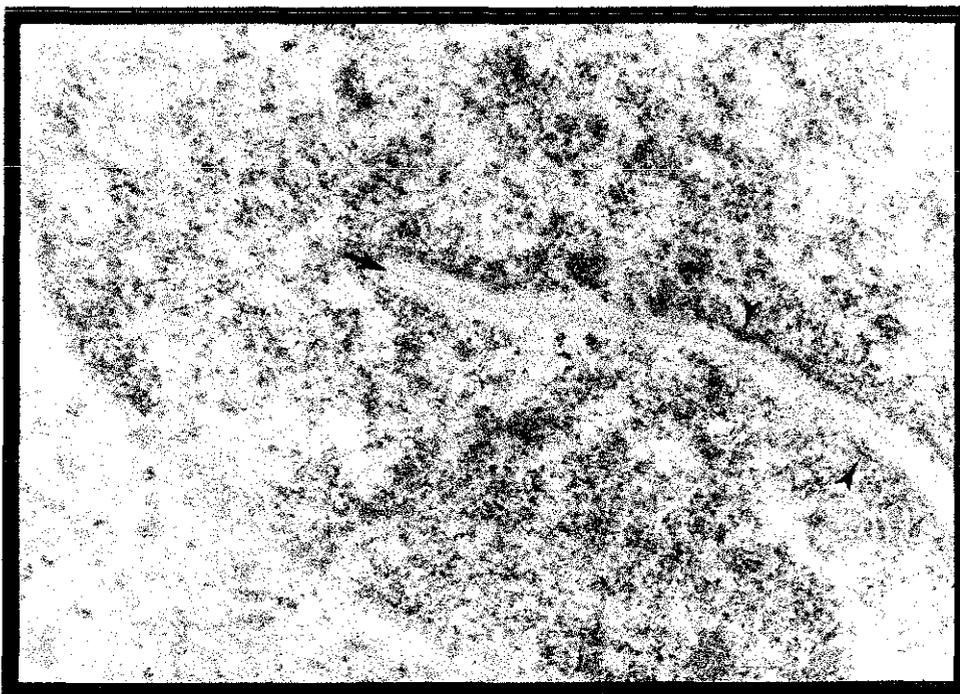


Figura 20

Espermatocito en paquiteno. Se nota un CS bien formado que muestra sus elementos laterales. En la cara interna de los elementos laterales se aprecian dos filamentos finos (cabeza de flecha). El CS muestra claramente su elemento medial (flecha) y los filamentos transversos que se encuentran atravesando el espacio central del CS. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 200 nm

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

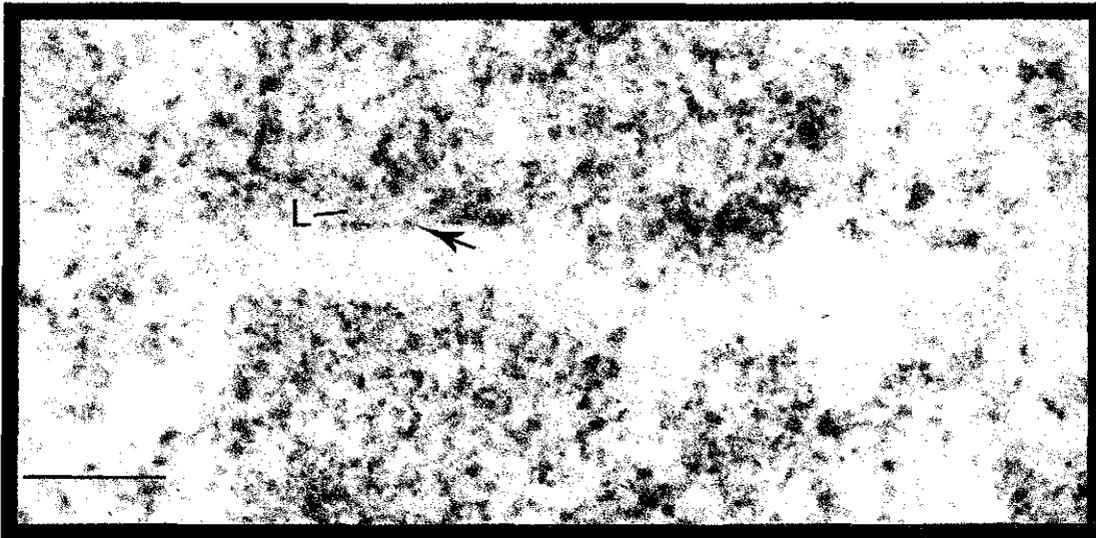


Figura 21.

Espermatocito en paquíteno contrastado con el método de tinción específico de amina de osmio para ADN. Se observa la presencia de un filamento irregular intensamente teñido localizado en la cara que da hacia el espacio central (flecha) del CS. Note que el espacio de apareamiento está desprovisto de cromatina. No es posible definir el límite externo del elemento lateral (L) porque sus fibras se continúan con la cromatina cercana. Barra 200 nm.

Los métodos de tinción para ADN revelaron la distribución de la cromatina alrededor del CS, además de mostrar que el espacio central se encuentra desprovisto de ADN, excepto por algunas pocas fibrillas transversas de cromatina y asas que salen del elemento lateral (Figura 22).

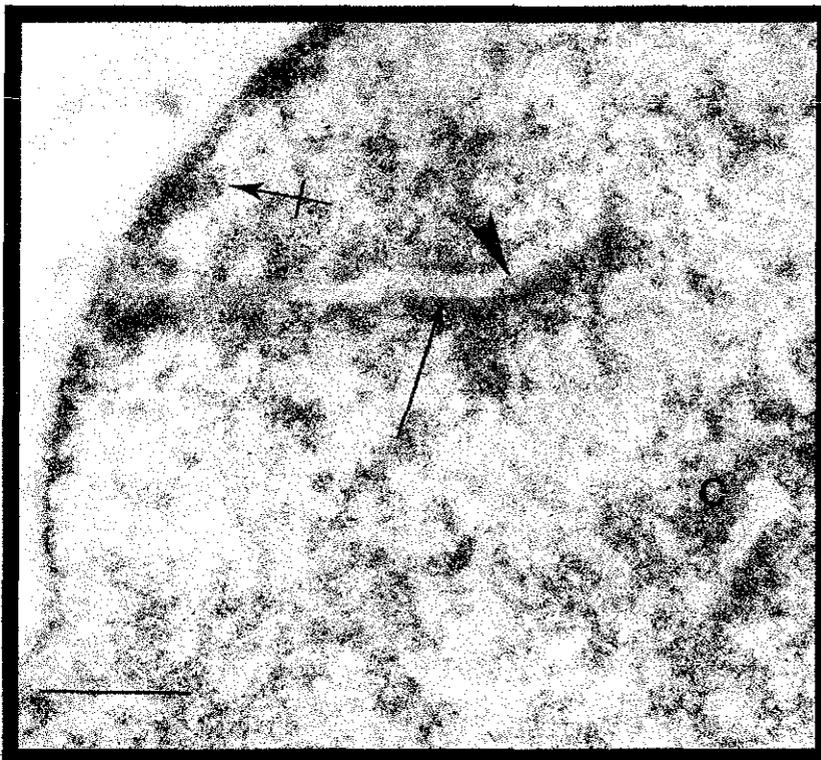


Figura 22.

Espermatocito en paquíteno contrastado con el método específico de amina de osmio para ADN. La cromatina está intensamente contrastada, los otros componentes están débilmente teñidos. Dos CS están rodeados por cromatina que se encuentra organizada de manera irregular (c). Escasas fibras de cromatina atraviesan el espacio central (flecha) del CS. Asas de cromatina cortas salen del elemento lateral hacia el espacio central (cabeza de flecha). Existen también cúmulos de cromatina compacta adosados a la envoltura nuclear (flecha atravesada). Los componentes del citoplasma no presentan contraste. Barra 500 nm.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Los cortes oblicuos de los CS indicaron la presencia de numerosas asas cortas que no rebasan el ancho del elemento lateral (Figura 23).

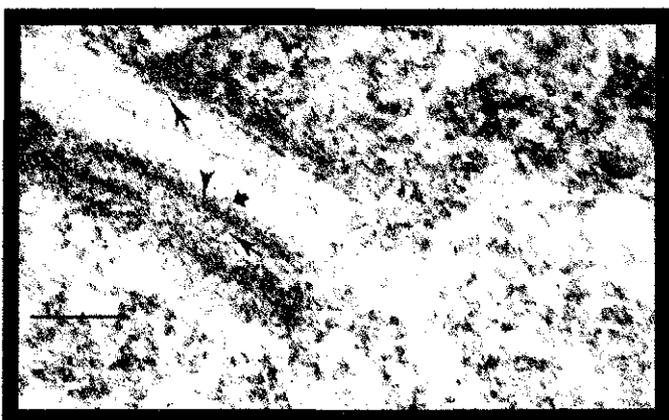


Figura 23. Espermatozoido en paquiteno contrastado con el método de tinción específico de amina de osmio para ADN. Se observan los dos elementos laterales cortados con diferente inclinación probablemente debido a la trayectoria del CS. Los filamentos que parecen cuentas sobre un hilo están claramente contrastados (flecha) en la cara interna del elemento lateral. Los filamentos de cromatina muestran continuidad con la cromatina que se encuentra en los elementos laterales. El elemento lateral inferior está cortado a todo lo ancho de su superficie pareciendo un listón. En él se evidencian asas cortas que se proyectan hacia el espacio de apareamiento (flecha gruesa), así como la presencia de numerosas fibras y asas cortas que se sitúan en todo el espesor del elemento lateral (flecha). Se advierten ejes de cromatina que se localizan en la cara interna del elemento lateral y que están constituidos por dos fibras muy delgadas de cromatina (cabeza de flecha). Los bordes externos del elemento lateral muestran un arreglo denso de los filamentos de cromatina. Barra 250 nm.

Algunas de las fibrillas de cromatina que atraviesan el elemento lateral se continúan con la cromatina que rodea el CS. A lo largo del paquiteno la cromatina que envuelve al CS progresivamente se hace más compacta. Las regiones cromosómicas en contacto con la envoltura nuclear están formadas por una densa masa de filamentos con una distribución aparentemente no al azar.

Con los métodos de tinción para RNP se pudo observar en el paquiteno temprano que los elementos laterales de CS tienen un contraste positivo lo que indica que se encuentran constituidos por ribonucleoproteínas.

En el paquiteno avanzado los elementos laterales pierden su positividad al método de tinción del EDTA para ribonucleoproteínas por lo que se mostraron tenuemente teñidos (Figura 24). Sin embargo en la vecindad del CS se presentaron numerosas fibrillas y gránulos EDTA positivos (Figura 24).

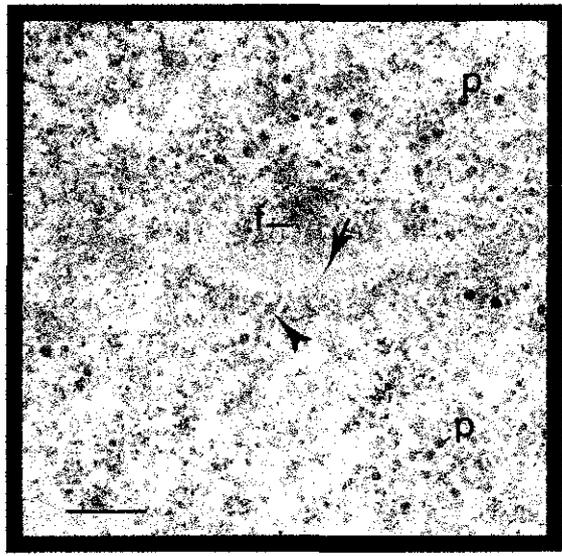


Figura 24. Espermatozoido en paquiteno. CS cortado lateralmente que muestra el elemento lateral contrastado débilmente (flecha). Se observan numerosas fibras pericromatinianas en las cercanías al elemento lateral (f). Los gránulos pericromatinianos que son abundantes están intensamente teñidos (p). Note el gránulo pericromatiniano que aún conserva un pedúnculo que indica su proceso de formación (cabeza de flecha). Contraste método de tinción preferencial del EDTA para RNP. Barra 250 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las estructuras que contienen RNP corresponden a fibrillas pericromatinianas y gránulos pericromatinianos caracterizados por Moneron y Bernhard (1969). Los gránulos pericromatinianos son claramente más numerosos en el paquiteno que en los estadios previos. El método de tinción de EDTA contrastó positivamente una hilera de pequeños gránulos correspondientes a los filamentos en forma de hilos de perlas, en la cara medial de los elementos laterales.

### Diploteno

El inicio del diploteno está caracterizado por un incremento en la densidad de la cromatina complementadas por zonas de cromatina extendida. Simultáneamente las características estructurales del CS cambian. Los filamentos transversos y el elemento central se pierden, la apariencia de los elementos laterales en forma de listón desaparece, y sus filamentos axiales abandonan el borde del espacio de apareamiento migrando hacia dentro de las masas de cromatina. En las áreas en las que se presentó la cromatina extendida, sólo se observaron los elementos laterales como dos filamentos paralelos rodeados por pequeñas masas de cromatina separadas por un espacio desprovisto de ADN y en el que quedan restos del CS (Figura 25).

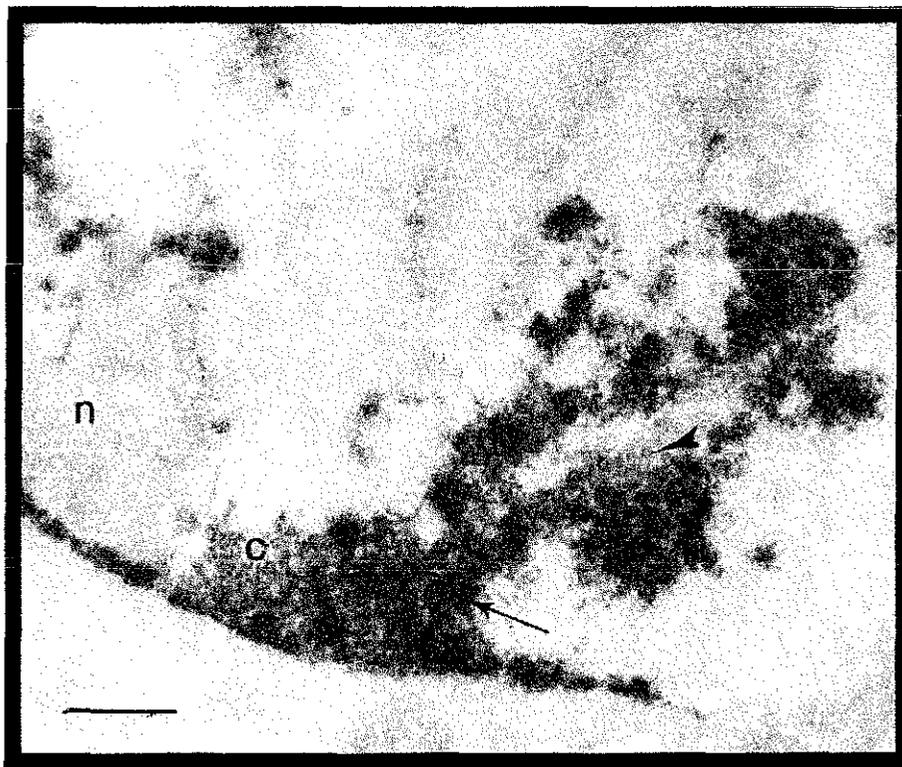


Figura 25.

Espermatozoide en diploteno contrastado con el método de tinción específico de amina de osmio para ADN. Se observan cúmulos de cromatina compacta (c) asociados a la envoltura nuclear. De estos cúmulos de cromatina sale cromatina compacta alineada que muestra restos de lo que fuera el elemento central (cabeza de flecha) de un CS. En el interior de la cromatina compacta se advierten dos finos filamentos alineados en paralelo (flecha). Junto al cúmulo de cromatina adosada a la envoltura nuclear se encuentra el nucleolo (n) teñido muy levemente. Barra 700 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VI.2 Inmunolocalización

En las espermatogonias tipo B, se encontró que las estructuras plumuladas dan una reacción positiva con el anticuerpo monoclonal anti-ARN-polimerasa II localizándose la marca en fibrillas que contienen ARN asociado con las estructuras plumuladas y también sobre fibrillas dispersas en el nucleoplasma, lo que demuestra una intensa transcripción de ARN mensajero por parte de la ARN polimerasa II. Las fibrillas que se encuentran asociadas con los plumulados están también marcadas por el anticuerpo anti-hnRNP indicando que las estructuras contienen ARN heterogéneo, el cual podría ser ARN-premensajero o ARNm. La inmunolocalización con el anticuerpo anti-Sm que detecta proteínas asociadas a los snURNAs (U1, U2, U5 y U6) y el anticuerpo contra el trimetil-guanosin cap, indicaron que los componentes del splicing son menos abundantes que los hnRNP y la ARN polimerasa II, en las estructuras plumuladas y en el nucleoplasma en general (Figura 26).

La inmunolocalización señala que la ARN polimerasa II está ubicada en los elementos axiales nascentes, en las estructuras plumuladas y fibras de cromatina extendida. Al comparar la distribución obtenida para la anti-Sm y del anti-trimetil-guanosin-cap se evidencia que su

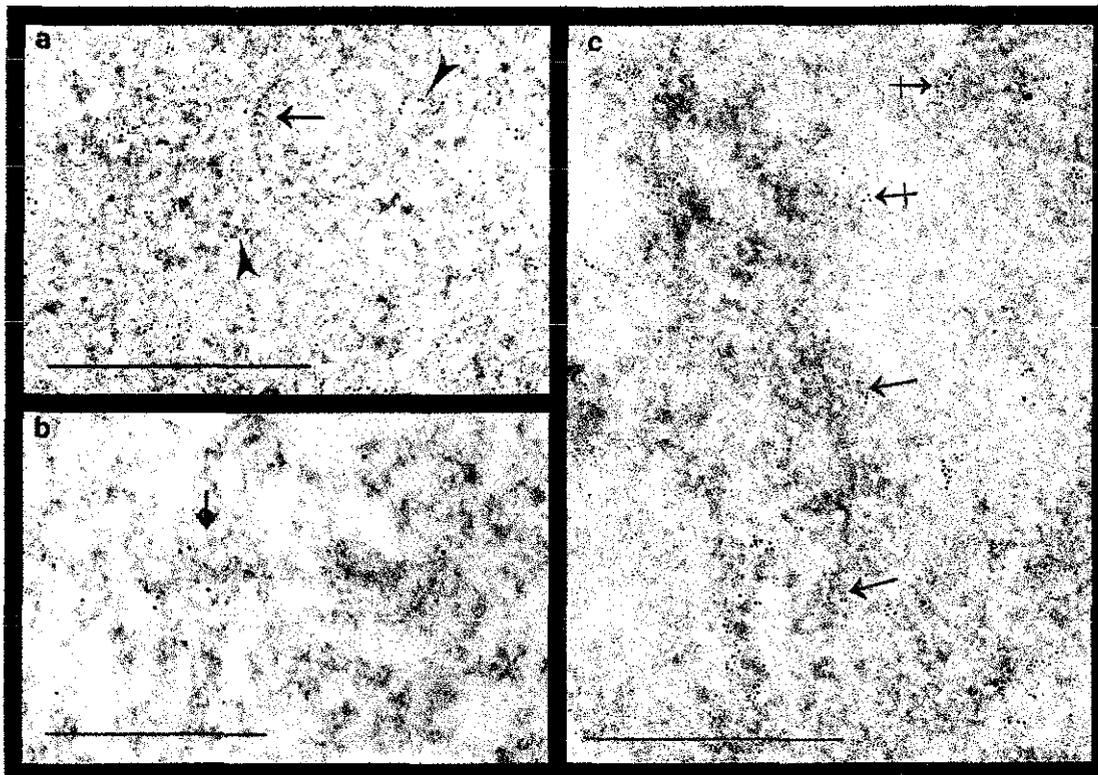


Figura 26.

- a) Espermatogonia tipo B marcada con anti-ADN. Se observa marca en los ejes centrales, así como las asas radiales de las estructuras plumuladas (flecha). Se aprecian numerosas fibras de cromatina laxa dispersas en el nucleoplasma también están marcadas (cabeza de flecha). Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 1mm.
- b) Se notan las fibras de RNP asociadas a una estructura plumulada (flecha) marcadas con el anti-ARN polimerasa II, así como múltiples fibras dispersas en el nucleoplasma. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 500 nm.
- c) Los filamentos radiales de las estructuras plumuladas (flecha), los gránulos pericromatinianos (cabeza de flecha), así como fibrillas dispersas en el nucleoplasma (flecha atravesada) están intensamente marcadas con el anticuerpo anti-hnRNP. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 500 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

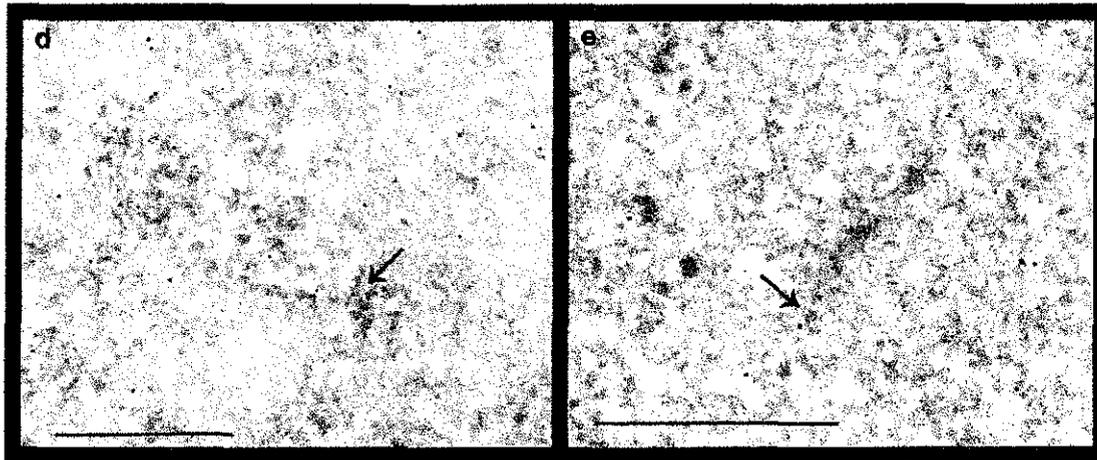


Figura 26

d) El anticuerpo anti-SM que localiza proteínas asociadas a los siRNAs, se une a las estructuras plumuladas (flecha), así como a fibrillas que se encuentran en el nucleoplasma. Es notoria la baja densidad de la marca. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 500 nm.  
e) Se observa que el inmunomarcaje con el anticuerpo anti-trimetil guanostil cap que localiza a los siRNA es muy escaso. Algunos granos de oro se aprecian asociados a una estructura plumulada (flecha). Unas cuantas fibrillas en el nucleoplasma también muestran marca. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 500 nm.

localización es similar a la de la ARN polimerasa II, sin embargo es notable que la densidad de la marca es mucho menor (Figura 26).

La inmunolocalización para RNPhn mostró la presencia de marca en las finas ramificaciones que salen de las estructuras plumuladas (Figura 26).

Durante el leptoteno la inmunolocalización con un anticuerpo anti-ADN detectó la presencia de cromatina laxa a los lados de los elementos axiales en formación.

### VI. 3 Hibridación *in situ* ultraestructural

Los resultados obtenidos con la técnica de hibridación *in situ* para localizar ARN en los espermatoцитos I del cobayo y de rata, puso de manifiesto que existe marca en los diferentes estadios de la profase meiótica, así como en las espermatogonias tipo B (Figura 27). Los datos producidos en esta investigación confirma que el eje central así como las ramas laterales de los plumulados están marcados por la prueba de hibridación *in situ* para el ARN utilizando como sonda ADN genómico de cobayo y de rata en preparaciones no desnaturalizadas. Cuando pares de estructuras plumuladas se asocian originando estructuras semejantes a "escaleras de doble cuerda", el ARN se localizó en ambos ejes alineados y en los filamentos transversos que se encuentran uniendo a los ejes de las estructuras plumuladas. Se advirtió un marcado abundante en las asas radiales de los ejes cromosómicos leptoténicos en formación, lo que indica la presencia de transcripción en dichas asas. Los ejes cromosómicos están menos marcados que las asas radiales lo cual se puede deber a la gran cantidad de proteínas presentes en esta estructura (Figura 27). Durante la formación del CS durante el cigoteno mostró la presencia de ARN en los elementos laterales y el elemento central de los CS, a diferencia de lo observado durante el paquiteno donde el CS maduro está escasamente marcado o desprovisto de marca (Figura 27).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

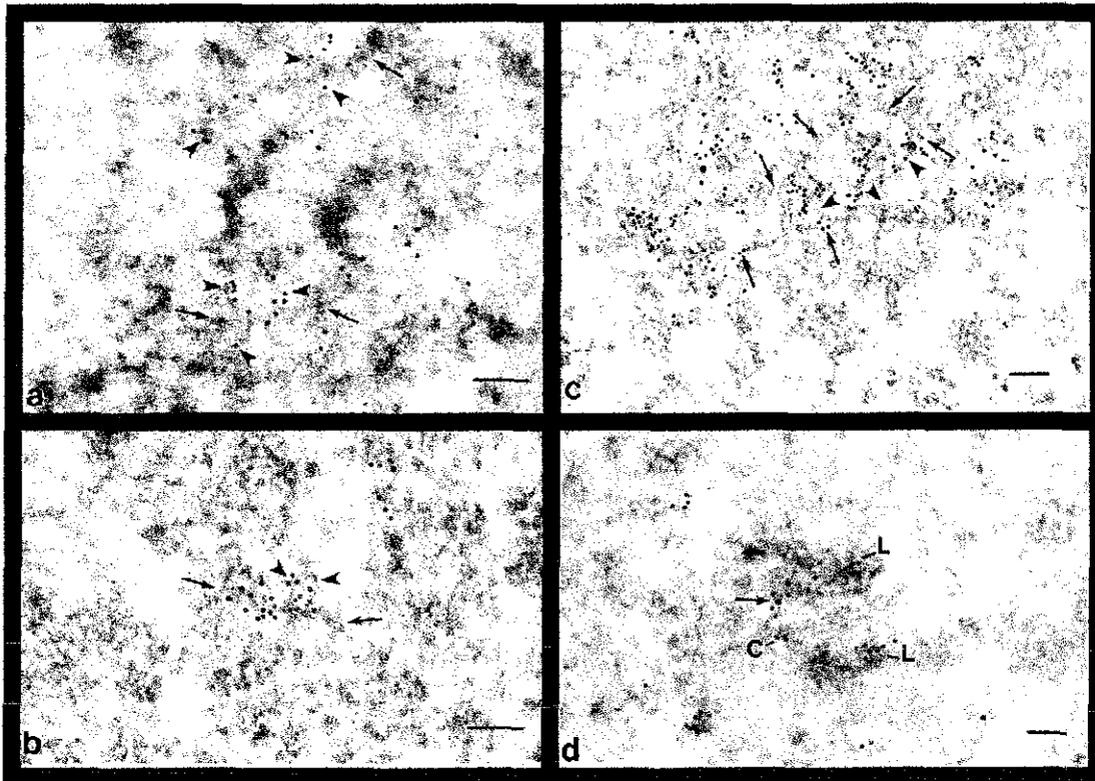


Figura 27

a, b, c y d) Hibridación in situ con sonda de ADN genómico de cobayo realizada sin desnaturalización del ADN de la muestra, lo que asegura que la sonda se unirá al ARN solamente.

a y b) Se aprecia la presencia de ARN en los ejes de los plumulados (flecha) y en los filamentos radiales (cabeza de flecha). Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 100 nm.

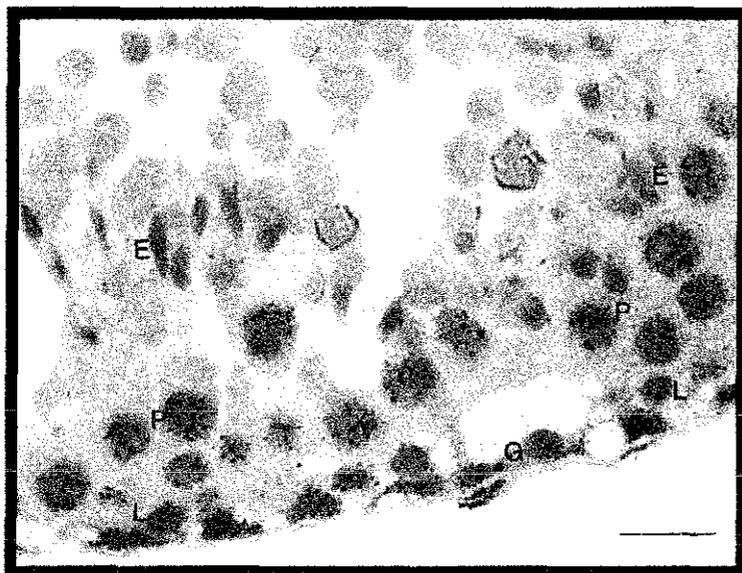
c) La región central de alineamiento de dos estructuras plumuladas está intensamente marcada indicando la presencia de ARN. Existe un intenso marcado en los filamentos que establecen uniones entre las dos estructuras plumuladas (cabeza de flecha). Las flechas señalan los ejes de los dos plumulados. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 100 nm.

d) Se observan elementos laterales (L), así como en el elemento central (C) intensamente marcados durante la formación de un GS en un espermatozoido en cigoteno. La intensa marca indica la presencia de gran cantidad de ARN (flecha). Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 100 nm.

#### VI.4 Autorradlografía óptica

Los resultados obtenidos por este método permitieron cuantificar la cantidad de ARN en el núcleo y el citoplasma de las espermatogonias tipo B y espermatozoides en leptoteno y paquíteno. En las espermatogonias tipo B así como los espermatozoides se evidenció una intensa marca después de administrar la uridina tritiada durante 120 minutos (Figura 28). Es importante destacar que en este tiempo de incubación los espermatozoides en la etapa de paquíteno final mostraron una marca menor a las células de los estadios previos. Esto nos indica que las células durante las etapas iniciales de la profase meiótica junto con las espermatogonias tipo B tienen una alta actividad transcripcional a diferencia de los espermatozoides en paquíteno tardío que muestran una baja actividad transcripcional. Cuando se incrementó el periodo de incubación a 120 min en la uridina-3H se apreció que el citoplasma de estas células está escasamente marcado. Al cuantificar el ARN sintetizado en las espermatogonias tipo B y los espermatozoides leptoteno y paquíteno puso de manifiesto que el ARN permanece

en el núcleo, en una proporción 7/1 (ver material y métodos) con respecto al citoplasma. Estos resultados confirman que aunque existe una alta actividad transcripcional en estas células y que el ARN está siendo sintetizado, por alguna razón permanece en el interior del núcleo (Tabla 1).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 28 Autorradiografía óptica de túbulo seminífero de rata incubado 120 min en uridina tritiada, que muestra los núcleos de espermátocitos primarios intensamente marcados. Los citoplasmas están desprovistos de granos de plata. Espermátogonias (G), espermátocitos en leptoteno (L), espermátocitos en paquíteno (P), espermátidas (E). Contraste azul de toluidina-bórax Barra 700 nm

**Tabla 1**

Relación de la marca nuclear con la marca citoplásmica después de un puiso de 120 minutos de uridina tritiada en las espermátogonias tipo B, espermátocitos en leptoteno y paquíteno.

	*Núcleo	*Citoplasma	N/C
Espermátogonia	0.45	0.057	7.9
Leptoteno	0.77	0.09	8.6
Paquíteno Inicial	0.48	0.056	8.5
Paquíteno medio	0.33	0.045	7.3
Paquíteno Final	0.08	0.015	5.3

\*Densidad numérica de la marca

Los cocientes N/C en las espermátogonias finales y espermátocitos del leptoteno, a paquíteno medio fluctúan entre 8.6 y 7.3, mientras que en células somáticas normales son de entre 2 y 3.5.

## VII. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que: 1) El núcleo de la espermatogonia tipo B presenta dos distribuciones particulares que no se encuentran en los núcleos de otros tipos celulares. Estas estructuras especiales son los ordenamientos de cromatina condensada y extendida y las estructuras plumuladas de cromatina extendida en transcripción. 2) Las estructuras plumuladas se asocian por medio de filamentos radiales en la interfase meiótica y el preleptoteno, llevando a los ejes a un alineamiento paralelo que los relaciona por numerosos filamentos radiales de cromatina extendida que se encuentran transcribiendo y formando estructuras que semejan *escaleras de doble cuerda*. 3) El eje cromosómico aparece en el leptoteno por la incorporación de material que tñe de oscuro al filamento axial de las estructuras plumuladas. 4) Los elementos axiales conservan la apariencia de la estructura plumulada de la que derivan. 5) En algunas regiones los elementos axiales en formación están alineados en paralelo a algunos cientos de nm de distancia. 6) Los largos filamentos radiales de cromatina laxa se acortan durante el leptoteno sin alterar las relaciones de los elementos axiales. 7) El inicio del apareamiento final (sinapsis), que se manifiesta por la formación del CS puede anticiparse a la formación completa del elemento axial. 8) Las hibridaciones *in situ* ultraestructurales demostraron que las asas radiales, los filamentos axiales de la estructura plumulada, así como los filamentos transversales de las *escaleras de doble cuerda* y los elementos laterales del CS durante el proceso de formación contienen ARN. 9) La inmunolocalización de la ARN polimerasa II y de los hnRNP demostró que la cromatina laxa en las espermatogonias tipo B y espermatocitos en las etapas estudiadas están transcribiendo ARN-premensajero. 10) El mismo tipo de células presenta una débil marca inmunocitoquímica de las RNPs relacionadas con el *splicing* y de la *trimetil-guanosin cap* de los snURNs. 11) La autorradiografía óptica cuntitativa después de marcar con la uridina-3H demostró un alto rango de transcripción en las espermatogonias tipo B y espermatocitos en leptoteno, paquíteno temprano, pero una exportación extremadamente lenta del ARN al citoplasma.

Estudios recientes en la meiosis sobre aspectos genéticos, bioquímicos y citológicos, indican que el proceso de búsqueda de homología opera independientemente de la recombinación y la sinapsis (Hawley y Arbel, 1993; Roeder, 1995, 1997; Kleckner, 1996). En pocos organismos la búsqueda de homología y apareamiento se dan previamente a la meiosis. Por ejemplo, en dípteros se han descrito algunas asociaciones de cromosomas (Wandall y Svendsen, 1985) así como en ciertas levaduras (Scherthan *et al*, 1994; Weiner y Kleckner, 1994) en las que al parecer dichas asociaciones desaparecen durante la replicación del ADN en la fase S meiótica. De acuerdo con Sybenga (1999) las asociaciones entre cromosomas homólogos en etapas anteriores a la meiosis, pueden ser alteradas por los movimientos relacionados con la formación del bouquet. Existen numerosos estudios en hongos, plantas y animales que demuestran la presencia de

alineamientos de los cromosomas homólogos antes de que los telómeros se organicen formando el bouquet (Kleckner y Weiner, 1993; Scherthan *et al.*, 1996; Zickler y Kleckner, 1999). Se piensa que la búsqueda de homología y el alineamiento de los cromosomas homólogos tiene lugar durante el leptoteno y cigoteno (Cook, 1997; Scherthan *et al.*, 1996, 1998). Nuestras observaciones demuestran que el alineamiento realizado por la asociación de las asas radiales de las estructuras plumuladas, se inicia en la espermatogonia tipo B, y permanece hasta el estado del cigoteno avanzado.

Es muy importante resaltar que las espermatogonias tipo B del cobayo que son células premeióticas, muestran arreglos en paralelo de sucesiones de cromatina compacta y extendida. En esta organización de cromatina extendida que se encuentra en transcripción, se localizan las estructuras plumuladas. El número de filamentos que unen a las unidades plumuladas van aumentando progresivamente, y a la vez la distancia que existe entre ellas se va reduciendo durante la interfase meiótica y el preleptoteno. Investigaciones acerca de la distribución de los cromosomas homólogos en espermatogonias del ratón y en humanos por medio de FISH, indican que los cromosomas homólogos ocupan territorios separados en etapas previas a la meiosis (Scherthan *et al.*, 1996, 1998). Sin embargo, nuestros resultados demuestran el establecimiento de uniones entre estructuras plumuladas de cromatina laxa a través de las asas radiales en transcripción. Algunas de esas estructuras plumuladas recorren hasta la mitad del diámetro nuclear. Estos filamentos radiales delgados, son asas que no pueden seguirse en toda su longitud, porque rara vez se extienden en el plano del corte. Aun en el caso de que fueran mucho más delgadas que el grosor del corte, la superposición con otras estructuras impediría su completa visualización. Las asas radiales de los plumulados pueden corresponder a pruebas a larga distancia que se requieren para el reconocimiento de las secuencias homólogas y probablemente estén relacionadas con el alineamiento progresivo de cromosomas a distancia. Este alineamiento puede llevarse a cabo por la estabilización del reconocimiento de secuencias homólogas de manera exitosa. Por lo que las estructuras plumuladas homólogas van relacionándose de manera progresiva por numerosas uniones de los filamentos radiales formando así las *escaleras de doble cuerda* antes de iniciar la fase del leptoteno. Esta distribución de amplio reconocimiento excluye, o al menos disminuye, el entrelazamiento de cromosomas en estadios posteriores. Esta interpretación de nuestros resultados está de acuerdo con puntos de vista teóricos sobre el papel de interacciones inestables en el apareamiento (Kleckner y Weiner, 1993). La distribución tan amplia de las asociaciones de los filamentos radiales, probablemente corresponden a las uniones de múltiples loci intersticiales propuestas en estudios de la profase meiótica de levaduras (Weiner y Klecker, 1994), así como a la búsqueda de homología general, propuesta por Smithies y Powers (1986) y más desarrollada por Kleckner (1997). Aunque debemos indicar que las uniones de apareamiento aquí descritas inician su formación en la espermatogonia tipo B, que es un estadio mucho más temprano que los previamente descritos. La mayoría de los pares de las estructuras plumuladas que se encuentran ya alineadas están a una distancia menor a los 700 nm cuando se inician los movimientos del bouquet. Es por eso que debemos resaltar que nuestros resultados indican que en el cobayo la mayoría de los cromosomas homólogos se reconocen y alinean previo a la formación del bouquet.

En la etapa del leptoteno la mayoría de los elementos axiales comienzan a formarse en contacto con la envoltura nuclear como pares cortos ya alineados en paralelo a partir de los ejes cromosómicos leptoténicos intensamente teñidos. Sin embargo, esto no excluye que existan algunos elementos axiales sin aparearse y sin alinearse.

De acuerdo a nuestras observaciones, encontramos que los cambios en los espermatoцитos del cobayo no permiten hacer una división entre el leptoteno y cigoteno como lo describen los clásicos, sino más bien considerar un estadio leptoteno-cigoteno por la continuidad entre los elementos axiales y las estructuras plumuladas y/o las *escalerillas de doble cuerda*, que regularmente observamos alineadas en paralelo previo a la formación del bouquet, así como la presencia de complejos sinaptonémicos en formación, por lo que los espermatoцитos presentaron tanto características de células en leptoteno y cigoteno a la vez.

Estas observaciones no excluyen que se presentaran algunos elementos axiales aislados, lo que interpretamos como un reconocimiento de homología y alineamiento durante el pre-leptoteno no exitoso. Por lo que estos elementos axiales transitan por las etapas de leptoteno y cigoteno clásicamente descritas, caracterizadas por el desarrollo de elementos axiales largos que posteriormente se aparean cuando comienza la formación del bouquet.

La organización del bouquet es un proceso altamente conservado y único de la meiosis, el cual frecuentemente se ha propuesto que juega un papel en el apareamiento de los homólogos (Scherthan, 1995; Zickler y Kleckner, 1998). Los resultados del presente trabajo indican que la mayoría de los cromosomas homólogos se reconocen y alinean antes de la constitución del bouquet en el cobayo. Cuando se da el establecimiento del bouquet en los espermatoцитos del cobayo, ya existen uniones bien establecidas entre los cromosomas homólogos manifestadas por la presencia de fibrillas compuestas por cromatina y RNP en la zona de reconocimiento entre las regiones de los cromosomas homólogos, por lo que una posible función del bouquet podría ser el asegurar el reconocimiento de todos los cromosomas homólogos llevándolos a un punto en el cual puedan estar cercanos (Scherthan, 1995). De hecho es poco probable que cuando se desarrolla el bouquet se promueva el primer contacto entre los cromosomas homólogos. Más bien, actualmente se propone que el bouquet debe proveer un mecanismo de *backup* que congrega a los cromosomas, para que los que han fallado en encontrar su homólogo en los procesos previos, lo logren a través de la cercanía proporcionada por el bouquet (Zickler y Kleckner, 1998). Diversas evidencias experimentales sugieren que los homólogos han tenido ya un contacto inicial previo a la formación del bouquet (Zickler y Kleckner, 1998).

Con la posible excepción de la hembra de *Drosophila melanogaster* (McKee, 1996), el apareamiento efectivo está asociado con secuencias codificantes (McKee, 1998; Sybenga, 1999). Los métodos de citoquímica ultraestructural utilizados en este estudio demuestran que las uniones entre las estructuras plumuladas de cromatina extendida están constituidas por fibrillas que contienen ARN y ADN. Las inmunolocalizaciones evidencian la presencia de ADN y de la ARN polimerasa II y de proteínas RNPhn.

La digestión de las uniones entre las fibrillas de las estructuras plumuladas por la ARNasa indica la presencia de fibras de RNP nacientes, las cuales están frecuentemente localizadas en el espacio

de apareamiento y que podrían estar involucradas en el proceso de reconocimiento. Los resultados obtenidos con la hibridación *in situ* ultraestructural, confirma la presencia de ARN en las estructuras plumuladas alineadas. Todas estas evidencias experimentales, nos permiten sugerir que las estructuras plumuladas están involucradas en la búsqueda de homología, el reconocimiento de homología y el apareamiento de los homólogos.

Por medio de autorradiografía óptica se ha demostrado que existe transcripción nucleolar y extranucleolar durante la profase meiótica I en diversas plantas y animales (Taylor, 1959; Muckenthaler, 1964; Monesi, 1965; Kierszénbaum y Tres, 1974a, b; Tres, 1975; Hartung y Stahl, 1976; Söderström, 1976; Geremia *et al.*, 1977).

Es de llamar la atención que en ciertos estadios de la profase meiótica I de *Lilium* (Taylor, 1959) y de rata (Söderström, 1976), la marca en el núcleo sea mayor que la que se localiza en el citoplasma. Nuestros resultados de autorradiografía óptica demuestran que existe una intensa incorporación de uridina tritiada y una diferencia significativa entre la marca contenida en el núcleo con respecto a la del citoplasma, en el caso de las espermatogonias tipo B, y los espermatoцитos en leptoteno y en paquiteno temprano y medio. Esto coincide con observaciones cualitativas llevadas a cabo por otros grupos de investigación (Taylor, 1959; Muckenthaler, 1964; Monesi, 1965; Kierszenbaum y Tres, 1974a, b; Tres, 1975; Hartung y Stahl, 1976; Söderström, 1976; Geremia *et al.*, 1977).

La diferencia de marca entre núcleo/citoplasma se puede explicar por la salida muy lenta de ARN del núcleo. Es sorprendente que nuestros resultados son similares a los obtenidos cuando se someten células a una supresión hormonal que provoca una disminución en el transporte de ARN al citoplasma (Vázquez-Nin *et al.*, 1997).

La inmunolocalización del complejo Sm de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares y del *trimetil guanosa cap* demuestran que las pequeñas fibras radiales que unen a los plumulados no sufren *splicing* cotranscripcional. El que haya un bajo rango de *splicing* puede evitar o retrasar el transporte del ARNm al citoplasma. Es importante notar que en las espermatogonias tipo B y en los estadios tempranos de la profase meiótica las fibrillas de RNP y los gránulos intercromatinianos son abundantes, pero los gránulos pericromatinianos son escasos. Los gránulos pericromatinianos se sabe son el almacén de los ARNm o pre-ARNm de larga vida media nuclear (Vázquez-Nin y Echeverría, 1996). La transcripción tan intensa que acontece durante este periodo, la velocidad de exportación tan baja y la escasez de partículas de almacenamiento por largos periodos, apunta a que el ARN pre-mensajero es sintetizado para una función nuclear y que probablemente es hidrolizado sin salir del núcleo.

Todos estos resultados son muy atractivos, ya que muestran en las mismas células en las que el proceso de reconocimiento de homología, alineamiento y apareamiento tiene lugar. Por lo que sugerimos que tal vez el ARN pre-mensajero esté involucrado en el reconocimiento de secuencias, alineamiento y apareamiento de los cromosomas homólogos, pues como lo indican nuestros resultados se localiza en el lugar y tiempo correcto.

La mayoría de las hipótesis aceptadas para el reconocimiento de las secuencias homólogas señalan la formación de uniones inestables (paranémicas) entre dúplex de ADN intactos (Smithies

y Powers, 1986; Loidl, 1990; Kleckner et al., 1991; Kleckner y Weiner, 1993; Moens, 1994; Weiner y Kleckner; 1994; Kleckner, 1996; McKee, 1996). Tales asociaciones son reversibles y pueden proveer un mecanismo que permita el inicio del apareamiento en diversos sitios. Estas interacciones inestables pueden ser suficientes para alinear a los cromosomas (Roeder, 1997). La participación del ARN en la búsqueda de homología pocas veces se ha considerado (Cook, 1997). Sin embargo, existen algunas evidencias acerca de características enigmáticas de la transcripción durante la profase meiótica. Estudios sobre la transcripción en levaduras sugieren que durante la meiosis y esporulación hay una pérdida en la regulación de la expresión génica (Kaback y Feldberg, 1985). Este proceso puede darse también en meiocitos de otros organismos, aunque en menor grado que en los hongos (Magee, 1987; Cook, 1997). Recientemente Klenne (2001) demuestra la sobreexpresión de ARNm, así como la presencia de una transcripción alterada en células meióticas de mamífero. Esto coincide con nuestros resultados en los que aparentemente el ARNm no tiene una función específica en la meiosis. El que se presenten hebras sencillas de ARN puede permitir un reconocimiento de secuencias complementarias más eficientemente que una doble cadena de ADN, así como el establecimiento de uniones durante la búsqueda de homología. Pensamos que la participación del ARN en el proceso de búsqueda y homología de secuencias complementarias permite que el proceso sea menos complejo. Es interesante señalar que se detectó ARN por medio de hibridación in situ en el elemento lateral y en una proporción menor en el elemento central y las fibrillas transversales de los CS en formación durante el cigoteno. En el estadio de paquiteno el ARN no se evidencio en ninguno de los componentes del CS ya formado. Estos resultados son coherentes con las observaciones previas realizadas por Vázquez-Nin y Echeverría (1976) en las que utilizaron métodos de tinción preferencial para RNP e hidrólisis enzimáticas. Sin embargo se ignora la función que desempeña dicho ARN. Durante el desarrollo del CS los elementos laterales están en contacto con cromatina compacta y abundantes hebras de cromatina en proceso de compactación que parecen rodear el CS en formación y relacionarse con la terminación en crecimiento. La escasez de continuidad entre el eje cromosómico leptoténico y el elemento lateral del CS en proceso de integración sugiere que la transformación a elemento lateral del CS es simultánea con el crecimiento del mismo. Esta fase de crecimiento probablemente esta centrada en estructuras de doble cuerda o plumuladas. Este evento está acompañado también por un importante rearreglo de la cromatina, la cual frecuentemente aparece como una maya de fibras condensadas alargadas en varias direcciones asociadas con el extremo del CS en crecimiento.

En cuanto a la constitución de los elementos laterales del CS, se han descrito como estructuras dobles en espermatoцитos de rata (Sotelo y Trujillo-Cenoz, 1958), de paloma (Nebel y Coulon, 1962), así como en otros animales y plantas (Moses, 1968). Esta disposición doble se ha interpretado como la representación de las dos cromátidas de cada uno de los cromosomas (Nebel y Coulon, 1962; Baker y Franchi, 1967; Moses, 1968). Sin embargo, nuestros resultados indican que en la rata y en el cobayo los filamentos de ADN son muy delgados y no corresponden al espesor de los filamentos que se distinguen en la estructura proteica de los elementos laterales. Coleman y Moses (1964) estudiaron la distribución del ADN en el CS maduro en paquiteno por

medio de la tinción de tricloruro de indio complementado con hidrólisis con DNasa. Ellos concluyeron que no existe o que existe muy poco ADN en el elemento central, y que el espacio central esta atravesado por unas cuantas fibras que contienen ADN. Estos datos coinciden con estudios de inmunolocalización de ADN ultraestructural realizados por Vázquez-Nin y col (1993). Nuestros resultados muestran en cortes frontales de CS paquiténicos que los filamentos que contienen ADN se encuentran en la cara interna de los elementos laterales (Figuras 20 y 22), así como en los cortes oblicuos del CS frecuentemente observamos la presencia de dos filamentos paralelos que contienen ADN. Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos por Coleman y Moses (1964).

Algunas asas cortas que se originan en los filamentos de cromatina descansan en el lado interno de los elementos laterales localizándose en el espacio central, siendo probablemente estas asas alargamientos de las cromátidas homólogas que pueden interactuar con los nódulos de recombinación y eventualmente participar en la recombinación.

A partir de CS puros se ha aislado y secuenciado el ADN (Pearlman *et al.*, 1992). Al estudiar las características de los fragmentos de ADN que se encuentran asociados al CS se ha demostrado que presentan microsatélites y repeticiones múltiples de GT/CA, así como fragmentos de secuencias LINE y SINE, las cuales se interpretan como secuencias de unión especializadas (Pearlman *et al.*, 1992; Moens, 1994; Moens *et al.*, 1998). Las asas de ADN que descansan dentro del elemento lateral probablemente corresponden a estas secuencias asociadas a las proteínas del elemento lateral.

Con todos los resultados obtenidos en esta investigación podemos proponer la secuencia de los eventos que se pueden dar durante las etapas premeióticas e iniciales de la meiosis durante la búsqueda y reconocimiento de secuencias mediado por el ARN:

1. La búsqueda de secuencias homólogas a larga distancia comienza en la espermatogonia tipo B y se manifiesta por los ordenamientos de cromatina compacta y laxa y las estructuras plumuladas que se encuentran en transcripción.
2. El reconocimiento de secuencias homólogas a distancia en interfase meiótica, se manifiesta por la presencia de filamentos radiales uniendo los ejes de los plumulados que se encuentran en transcripción y que contienen ADN y gran cantidad de RNPs.
3. El alineamiento de secuencias homólogas en interfase meiótica y leptoteno, puede ser advertida por la presencia de *escalerillas de doble cuerda* y elementos axiales alineados en paralelo al inicio de su formación.
4. El apareamiento final de regiones homólogas en leptoteno y cigoteno, corresponde a la formación de los ejes cromosómicos alineados en paralelo y a la constitución de CS.

## VIII. CONCLUSIONES

- 1.- En el núcleo de las espermatogonias tipo B se inicia la búsqueda de homología de los cromosomas, manifestada por la presencia de estructuras que no se encuentran en el núcleo de células en interfase. Estas estructuras son sucesiones de cromatina laxa y compacta, así como estructuras plumuladas constituidas por cromatina, fibras y gránulos de ribonucleoproteínas. Estos eventos de búsqueda de homología son exclusivos de las células germinales (espermatogonias tipo B, células en interfase meiótica, leptoteno y cigoteno).
- 2.- Las *escaleras de doble cuerda* que aparecen en la interfase meiótica son la expresión de la búsqueda de homología exitosa, proceso que clásicamente se pensaba sucedía en el cigoteno de la profase meiótica.
- 3.- La hibridación in situ a nivel de microscopía electrónica demuestra que el ARN se localiza en la zona de reconocimiento y alineación de las regiones homólogas en las estructuras plumuladas y en las *escaleras de doble cuerda*.
- 4.- Las inmunolocalizaciones evidencian que el ARN mensajero es sintetizado en grandes cantidades en las estructuras plumuladas y que el procesamiento del ARNm es poco frecuente.
- 5.- La autorradiografía óptica señala que el ARN transcrito permanece periodos largos en el núcleo o que nunca es exportado al citoplasma en las espermatogonias tipo B, células de la interfase meiótica, leptoteno, cigoteno y paquiteno temprano.
- 6.- El eje axial en el leptoteno conserva las estructuras plumuladas de las que se origina y con las que mantiene continuidad.
- 7.- La mayor parte de los ejes axiales durante el leptoteno se forman como pares de elementos uno frente al otro simultáneamente en los ejes más cercanos y alineados, aunque esto no excluye la presencia de elementos axiales aislados.
- 8.- El CS comienza a desarrollarse antes de que los elementos axiales estén completamente formados.

## IX. PERSPECTIVAS

El que se demuestre que a partir de las espermatogonias tipo B se inicia la búsqueda de homología plantea nuevas interrogantes, en cuanto a si es un mecanismo que se pueda presentar en otro tipo de organismos como un mecanismo de búsqueda más universal. La sugerencia de que el reconocimiento de secuencias pueda estar mediado por el ARNm desde etapas premeioticas y durante la meiosis, abre la posibilidad de estudiar con mayor detalle la transcripción durante este periodo, así como el papel que pudiera estar teniendo el ARN en la búsqueda de homología. Si efectivamente el ARN es el que media el reconocimiento de homología, habría que analizar si se establecen relaciones ARN-ARN y/o relaciones ARN-ADN.

Otro aspecto de interés que se abre a partir de nuestros resultados es si las proteínas descritas como parte de los elementos axiales y laterales como la SCP3 y SCP2 forman parte de las estructuras plumuladas o de las escalerillas de doble cuerda.

Es probable que estas proteínas se incorporen hasta que el eje cromosómico se comienza a formar. Nuestras observaciones señalan que en el cigoteno se inicia el desarrollo del CS a partir de los ejes cromosómicos en crecimiento. Esto plantea la interrogante de cómo estas proteínas estructurales del CS se ensamblan a los elementos axiales o de cómo podrían estar en las estructuras plumuladas. Otro aspecto de interés sería valorar el efecto de los inhibidores de la transcripción sobre la ultraestructura y la citofisiología de la meiosis.

## X. REFERENCIAS

- Anderson L., Stack S., Todd R. and Ellis R. 1994. A monoclonal antibody to lateral element proteins in synaptonemal complexes of *Lilium longiflorum*. *Chromosoma* 103: 357-367.
- Anderson L.K., Offenbergh H.H., Verkuijlen W.M.H.C. and Heyting C. 1997. RecA-like proteins are components of early nodules in lily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 6868-6873.
- Anderson L.K., Reeves A., Webb L.M. and Ashley T. 1999. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics* 151: 1569-1579.
- Ashley T., Plug A., Xu J., Solari A., Reddy G., Golub E. and Ward D. 1995. Dynamic changes in Rad51 distribution on chromatin during meiosis in male and female vertebrates. *Chromosoma* 104: 19-28.
- Bähler J., Wyler T., Loidl J. and Kohli J. 1993. Unusual nuclear structures in meiotic prophase of fission yeast: a cytological analysis. *J. Cell Biol.* 121: 241-256.
- Baker T.G. and Franchi L.L. 1967. The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries. *J. Cell Sci.* 2: 213-224.
- Barlow A.L., Benson F.E., West S.C. and Hulten M.A. 1997. Distribution of the Rad51 recombinase in human and mouse spermatocytes. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 16: 5207-5215.
- Batanian J. and Hulten M. 1987. Electron microscopic investigation of synaptonemal complexes in a infertile human male carrier of a pericentric inversion inv(1)(p32q42). *Hum. Genet.* 76: 81-89.
- Bernhard W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27: 250-265.
- Biggiogera M., Fakan S., Kaufmann S.H., Black A., Shaper J.H. and Bush H. 1989. Simultaneous immunoelectron microscopic visualization of protein B23 and C23 distribution in the HeLa cell nucleolus. *J. Histochem. Cytochem.* 9: 1371-1374.
- Biggiogera M. and Fakan S. 1998. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27: 250-265.
- Bishop D.K., Park D., Xu L. and Kleckner N. 1992. DMC1: A meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* 69: 439-456.
- Callan H.G. 1972. Replication of DNA in the chromosomes of eukaryotes. *Proc. Royal Soc. Lon. B* 181: 19-41.
- Carpenter A. 1975. Electron microscopy of meiosis in *Drosophila melanogaster* females: II: The recombination nodule - a recombination-associated structure at pachytene? *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72: 3186-3189.
- Carpenter A. 1979a. Recombination nodules and synaptonemal complex in recombination-defective females of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 75: 259-292.

- Carpenter A. 1979b. Synaptonemal complex and recombination nodules in wild-type *Drosophila melanogaster* females. *Genetics* 92: 511-541.
- Carpenter A.T.C. 1994. The recombination nodule story - Seeing what you are looking at. *BioEssays* 16: 69-74.
- Chandley A.C. 1986. A model for effective pairing and recombination at meiosis based on early replicating sites (R-bands) along chromosomes. *Hum. Genet.* 72: 50-57.
- Clermont Y. 1960. Cycle of the seminiferous epithelium of the guinea pig. A method for identification of the stages. *Fertil. Steril.* 6: 563-573.
- Cogliati R. and Gautier A. 1973. Mise en évidence de l'ADN et des polysaccharides à l'aide d'un nouveau réactif de type Schiff. *C R Acad. Sci. D* 276: 3041-3044.
- Coleman J. and Moses M. 1964. DNA and the fine structure of synaptic structures in the domestic rooster. *J. Cell Biol.* 23: 63-78.
- Comings D.E. and Riggs A.D. 1971. Mechanisms of chromosome pairing during meiosis. *Nature* 227: 451-456.
- Cook P.R. 1997. The transcriptional basis of chromosome pairing. *J. Cell Sci.* 110: 1033-1040.
- Darlington C.D. 1931. Meiosis. *Biol. Rep.* 6: 221-264.
- Dawe R.K. 1998. Meiotic chromosome organization and segregation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 371-395.
- de los Santos T. and Hollingsworth N.M. 1999. Red1p, a MEK1-dependent phosphoprotein that physically interacts with Hop1p during meiosis in yeast. *J. Biol. Chem.* 274: 1782-1790.
- Di Carlo A., Travia G. and De Felici M. 2000. The meiotic specific synaptonemal complex protein SCP is expressed by female and male primordial germ cells of the mouse embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 44: 241-244.
- Drapkin R., Sancar A. and Reinberg D. 1994. Where transcription meets repair. *Cell* 77: 9-12.
- Eddy E.M. and O'Brien D.A. 1998. Gene expression during mammalian meiosis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 37: 141-200.
- Eijpe M., Heyting C., Gross B. and Jessberger R. 2000. Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *J. Cell Sci.* 113: 763-682.
- Esponda P. and Stockert J.C. 1971. Localization of RNA in the synaptonemal complex. *J. Ultrastruct. Res.* 35: 411-417.
- Esponda P. and Jimenez-Martin C. 1973. The attachment of synaptonemal complex to the nuclear envelope. An structural and cytochemical analysis. *Chromosoma* 30: 405-417.
- Esponda P. and Jiménez-Martín C. 1975. Nucleolar organizer ultrastructure in *Allium cepa*. *Chromosoma* 52: 73-87.
- Esponda P. 1981. El complejo sinaptonémico y la estructura del cromosoma meiótico. *Bioteria-Genética* II: 83-123.
- Esquivel C., Rovira P., Echeverría O.M. and Vázquez Nin G.H. 1987. A simple staining method for chromatin in electron microscopy compatible with serial sectioning. *Ultramicroscopy* 21: 103-109.
- Fawcett D.W. 1956. The fine structure of chromosome in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 403-406.

- Friedman B., Bouchard R. and Stern H. 1982. DNA sequences repaired at pachytene exhibit strong homology among distantly related higher plants. *Chromosoma* 87: 409-424.
- Fussell C.P. 1987. The Rab1 Orientation: A prelude to synapsis. In *Meiosis*. Ed. Moens P.B. Academic Press. USA.
- Geremia R., Boitani C., Conti M. and Monesi V. 1977. RNA synthesis in spermatocytes and spermatids and preservation of meiotic RNA during spermiogenesis in the mouse. *Cell Differentiation* 5: 343-355.
- Gerke V. and Steitz J.A. 1986. A protein associated with small nuclear ribonucleoprotein particles recognizes the 3' splice site of pre-messenger RNA. *Cell* 47: 973-984.
- Gillies C.B. 1975. Synaptonemal complex and chromosome structure. *Annu. Rev. Genet.* 9: 91-109.
- Glamann J. 1986. Crossing over in the male mouse as analysed by recombination nodules and bars. *Carlsberg Res. Commun.* 51: 143-162.
- Haber J.E. 1998. Meiosis: Avoiding inappropriate relationships. *Curr. Op. Cell Biol.* 8: R832-R835.
- Hartung H. and Stahl A. 1976. Incorporation of tritiated uridine during pachytene and diplotene stages in the oocytes of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Experientia* 32: 96-97.
- Hasenkampf C.A. 1996. The synaptonemal complex - a chaperone of crossing over. *Chromosome Res.* 4: 133-140.
- Hawley R.S. and Arbel T. 1993. Yeast genetics and the fall of the classical view of meiosis. *Cell* 72: 301-303.
- Heyting C., Dietrich A.J.J., Redeker E.J.W. and Vink A.C.G. 1985. Structure and composition of synaptonemal complex, isolated from rat spermatocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 36: 307-314.
- Heyting C. 1996. Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr. Op. Cell Biol.* 8: 389-396.
- Heyting C., Dettmers R., Dietrich A., Redeker E. and Vink A. 1988. Two major components of synaptonemal complex are specific for meiotic prophase nuclei. *Chromosoma* 96: 325-332.
- Holliday R. 1977. Recombination and meiosis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 277: 359-370.
- Hotta Y. and Stern H. 1981. Small nuclear molecules that regulate nuclease accessibility in specific chromatin regions of meiotic cells. *Cell* 27: 309-319.
- Ikeya T., Shinohara A., Sato S., Tabaka S. and Ogawa T. 1996. Localization of mouse Rad1 and Lim15 proteins on meiotic chromosomes at late stages of prophase I. *Genes Cells* 1: 379-389.
- Jenkins G. and Okumus A. 1992. Indiscriminate synapsis in achiasmatic *Allium fistulosum* L. (Liliaceae). *J. Cell Sci.* 103: 415-422.
- John B. 1990. *Meiosis*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Jones H. 1973. Light and electron microscope studies of chromosome pairing in relation to chiasma localization in *Stethophyma grossum* (Orthoptera: Acrididae). *Chromosoma* 42: 145-162.
- Jones R.E., Okamura C.S. and Martin T.E. 1980. Immunofluorescent localization of the proteins of nuclear ribonucleoprotein complexes. *J. Cell Biol.* 86: 235-243.
- Kaback D.B. and Feldberg L.R. 1985. Yeast cells exhibit a sporulation-specific temporal program of transcript accumulation. *Mol. Cell Biol.* 5: 751-761.
- Karpova O., Penkina M., Dadashev S., Mil'shina N., Hernandez J., Radchenko Y and Bogdanov Y.

1995. Features of primary structure of DNA from the synaptonemal complex of the golden hamster. *Mol. Biol. (Mosk)* 29: 512-521.
- Kierszenbaum A.L. and Tres L.L. 1974 a. Nucleolar and periochromosomal RNA synthesis during meiotic prophase in the mouse testis. *J. Cell Biol.* 60: 39-53.
- Kierszenbaum A.L. and Tres L.L. 1974 b. Transcriptional sites in spread meiotic prophase chromosomes from mouse spermatocytes. *J. Cell Biol.* 63: 923-925.
- Kim W.Y. and Dahmus M.E. 1986. Immuno-cytochemical analysis of mammalian RNA polymerase II subspecies. Stability and relative in vivo concentration. *J. Biol. Chem.* 261: 14219-14225.
- Kleckner N., Padmore R. and Bishop D.K. 1991. Meiotic chromosome metabolism: one view. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 56: 729-743.
- Kleckner N. and Weiner B.M. 1993. Potential advantages of unstable interactions for pairing of chromosomes in meiotic, somatic and premeiotic cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58: 553-565.
- Kleckner N. 1996. Meiosis: How could it work? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8167-8174.
- Kleckner N. 1997. Interactions between and along chromosomes during meiosis. *The Harvey Lectures* 91: 21-45
- Kleene K.C. 2001. Possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mechanisms of Development* 106: 3-23.
- Klein F., Mahr P., Galova., M., Buonomo S.B.C., Michaelis C., Nairz K. and Nasmyth K. 1999. A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* 98: 91-103.
- Kurata N. and Ito M. 1978. Electron microscope autoradiography of <sup>3</sup>H-thymidine incorporation during zygotene stage in microsporocytes of Lily. *Cell Struct. Function* 3: 349-356.
- Langer P.R., Waldrop A.A. and Ward D.C. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 6633-6637.
- Latos-Bielenska A. Trautmann and Vogel W. 1990. Visualization of DNA in pachytene by monoclonal antibodies against BrdU reveals synaptonemal complex-like structures. *Cytogenet. Cell Genet.* 54: 24-28.
- Leblond C.P. and Clermont Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 55: 548-569.
- Lerner E.A., Lerner M.R., Janeway C.A. and Steitz J.A. 1981. Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituents: probes for molecular biology and autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2737-2741.
- Loidl J. 1990. The initiation of meiotic chromosome pairing: the cytological view. *Genome* 33: 759-778.
- Loidl J. 1994. Cytological aspects of meiotic recombination. *Experientia* 50: 285-294.
- Loidl J., Nairz K. and Klein F. 1991. Meiotic chromosome synapsis in haploid yeast. *Chromosoma* 100: 221-228.
- López-Velázquez G., Segura-Váldez L., Alcantara-Otigoza M.A. and Jiménez-García L.F. 1998. Localization of intranuclear RNA by electron microscopy in situ hybridization using a genomic DNA

- probe. Arch. Med. Res. 29: 185-190.
- Loseva E., Kolomiets O., Il'inskaia L. and Bashkirov V. 1996. Localization of RecA-like proteins in preparations of spread nuclei of mouse spermatocytes at meiotic prophase I. Genetika 32: 523-531.
- Magee PT. 1987. Transcription during meiosis. In Moens PB, Ed. Meiosis. Orlando: Academic Press.
- Maguire M.P. 1995. Is the synaptonemal complex a disjunction machine? J Heredity 86: 330-340.
- McKee B.D. 1996. The license to pair: identification of meiotic pairing sites in *Drosophila*. Chromosoma 105: 135-141.
- McKee BD. 1998. Pairing sites and the role of chromosome pairing in meiosis and spermatogenesis in male *Drosophila*. In Handel MA, Ed. Meiosis and gametogenesis. San Diego: Academic Press.
- Miyazaki W.Y. and Orr-Weaver T.L. 1994. Sister-chromatid cohesion in mitosis and meiosis. Ann. Rev. Genet. 28: 167-187.
- Moens P.B., Heyting C., Dietrich A.J.J., van Raamsdonk W. and Chen Q. 1987. Synaptonemal complex antigen location and conservation. J. Cell Biol. 105: 93-103.
- Moens P.B. and Pearlman R.E. 1988. Chromatin organization at meiosis. Bio Essays. 9: 151-161.
- Moens P.B. 1994. Molecular perspectives of chromosome pairing at meiosis. BioEssays 16: 101-106.
- Moens P.B., Pearlman R.E., Traut W. and Heng H.H.Q. 1998. Chromosome cores and chromatin at meiotic prophase. Curr. Top. Dev. Biol. 37: 241-262.
- Monesi V. 1964. Ribonucleic acid synthesis during mitosis and meiosis, in the mouse testis. J. Cell Biol. 22: 521-532.
- Monesi V. 1965. Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse. Exp. Cell Res. 39: 197-224.
- Monesi V., Geremia, R., D'Agostino A. and Biotani C. 1978. Biochemistry of male germ cell differentiation in mammals. RNA synthesis in meiotic and postmeiotic cells. Curr. Top. Dev. Biol. 12: 11-36.
- Moses M.J. 1956. Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2: 215-218.
- Moses M.J. 1968. Synaptonemal complex. Annu. Rev. Genet. 2: 363-412.
- Moses M.J. 1969. Structure and function of synaptonemal complex. Genetics 61 Suppl. 1: 41-51.
- Muckenthaler FA. 1964. Autoradiographic study of nucleic acids synthesis during spermatogenesis in the grasshopper, *Melanoplus differentialis*. Exp. Cell Res. 35: 531-547.
- Nebel B.R. and Coulon E.M. 1962. The fine structure of chromosomes in pigeon spermatocytes. Chromosoma 13: 272-291.
- Offenberg H.H. Dietrich A.J.J. and Heyting C. 1991. Tissue distribution of two major components of synaptonemal complexes of the rat. Chromosoma 101: 83-91.
- Paniagua, R., Nistal M., Sesma M.P., Alvarez-Uría M. y Fraile B. 1993. Citología e Histología Vegetal y Animal. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid
- Passy S.I., Yu X., Li Z., Radding Ch. M., Masson J.Y., West S. and Egelman E.H. 1999. Human Dmc1

- protein binds DNA as an octameric ring. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 10684-10688.
- Pathak S. and Hsu T.C. 1979. Silver stained structures in mammalian meiotic prophase. Chromosoma 70: 195-203.
- Pearlman R., Tsao N. and Moens P. 1992. Synaptonemal complexes from DNase-treated rat pachytene chromosomes contain (GT)<sub>n</sub> and LINE/SINE sequences. Genetics 130: 865-872.
- Peltari J., Hoja M.R., Yuan L., Liu J.G., Brundell E., Moens P., Santucci-Darmanin S., Jessberger R., Barbero J.L., Heyting C. and Höög C. 2001. A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. Mol. Cell. Biol. 21: 5667-5677.
- Plug A.W., Xu J., Reddy G., Golub E.I. and Ashley T. 1996. Presynaptic association of Rad 51 protein with select sites in meiotic chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5920-5924.
- Prescott D.M. 1976. Reproduction in eukaryotic cells. Academic Press. New York.
- Puvion-Dutilleul F. and Puvion E. 1980. New aspects of intranuclear structures following partial decondensation of chromatin: A cytochemical and high resolution autoradiographical study. J. Cell. Sci. 42: 305-321.
- Rasmussen S.W. 1977. Meiosis in *Bombix mori* females. Phil. Trans. R. Soc. B. 277: 343-350.
- Rhoades M.M. 1961. Meiosis. In Brachet J, Mirsky AE, editors. The Cell: Biochemistry, Physiology, and Morphology, Vol. 3. Meiosis and Mitosis. New York: Academic Press.
- Rockmill B., Sym M., Scherthan H. and Roeder G. 1995. Roles of two RecA homologues in promoting meiotic chromosome synapsis. Genes Dev. 9: 2684-2695.
- Roeder G.S. 1995. Sex and the single cell: Meiosis in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 10450-10456.
- Roeder G.S. 1997. Meiotic chromosomes: It takes two to tango. Gen. Dev. 11: 2600-2621.
- Sakaguchi K., Takagami M.H. and Ito M. 1983. Inhibition of RNA synthesis in meiotic cells and effect on meiotic development. Cell Struct. Func. 8: 127-135.
- Satyanarayana K. and Strominger J. 1992. DNA sequences near a meiotic recombinational breakpoint within the human HLA-DQ region. Immunogenetics 35: 235-240.
- Schalk J.A.C., Dietrich A.J.J., Vink A.C.G., Offenbergh H.H., van Aalderen M. and Heyting C. 1998. Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. Chromosoma 107: 540-548.
- Sekelsky J.J. and Hawley R.S. 1995. The bond between sisters. Cell 83: 157-160.
- Sherman J.D., Herickhoff L.A. and Stack M.S. 1992. Silver staining two types of meiotic nodules. Genome 35: 907-915.
- Scherthan H., Bähler J. and Kohli J. 1994. Dynamics of chromosome organization and pairing during meiotic prophase in fission yeast. J. Cell Biol. 127: 273-285.
- Scherthan H. 1995. Chromosome behaviour in earliest meiotic prophase. In Chromosoma Today. Ed. H. Gill J.S Parker and M. Puertas.
- Scherthan H., Weich S., Schwegler H., Heyting C., Härle M. and 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.

- Scherthan H., Elis R., Trelles-Sticken E., Dietsel S., Cremer T., Walt H. and Jauch A. 1998. Aspects of three-dimensional chromosome reorganization during the onset of human male meiotic prophase. *J. Cell Sci.* 111: 2337-2351.
- Schmekel K. and Daneholt B. 1995. The region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions. *Trends Cell Biol.* 5: 239-242.
- Schmekel K., Meuwissen R.L.J., Dietrich A.J.J., Vink A.C.G., van Marle J. van Veen H. and Heyting C. 1996. Organization of SCP1 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Exp. Cell Res.* 226: 20-30.
- Schulz-Schaeffer J. 1980. *Cytogenetics: Plants, Animals, Human.* Springer-Verlag, New York
- Shinohara A., Ogawa H., Matsuda Y., Ushio N., Ikeo K. and Ogawa T. 1993. Cloning of human, mouse, and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and RecA. *Nature Genet.* (Lond.) 4: 239-243.
- Smith A. and Benavente R. 1992. Identification of a structural protein component of rat synaptonemal complexes. *Exp. Cell Res.* 198: 291-297.
- Smithies O. and Powers P. (1996) Gene conversion and their relation to homologous chromosome pairing. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 312: 291-302.
- Söderström K.O. 1976. Characterization of RNA synthesis in mid-pachytene spermatocytes of the rat. *Exp. Cell Res.* 102: 327-245.
- Solari A.J. 1972. Ultrastructure and composition of the synaptonemal complex in spread and negatively stained spermatocytes of the golden hamster and the albino rat. *Chromosoma* 39: 231-263.
- Solari, A.J. 1999. *Génética Humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina.* 2ª Ed. Panamericana Argentina.
- Sotelo J.R. 1969. Ultrastructure of chromosomes at meiosis. In: Lima de Faria A. Ed. *Handbook of molecular cytology.* North-Holland, Amsterdam.
- Sotelo J.R. and Trujillo-Cenoz O. 1958. Microscopic structure of meiotic chromosomes during prophase. *Exp. Cell Res.* 14: 1-8.
- Stack S. 1973. The synaptonemal complex and the achiasmatic condition. *J. Cell Sci.* 13: 83-95.
- Stern H. 1993. The process of meiosis. In *Cell and Molecular Biology of the Testis.* De Claude Desjardins and Larry L. Ewing Eds. New York Oxford.
- Storlazzi A., Xu L., Schwacha A. and Klecker N. 1996. Synaptonemal complex (SC) component Zip1 plays a role in meiotic recombination independent of SC polymerization along the chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93: 9043-9048.
- Swanson C.P., Merz T. and Young W.J. 1981. *Cytogenetics: the chromosoma in division inheritance and evolution.* Prentice Hall, Englewood Cliffs, New York. 2ª Edición.
- Sybenga J. 1999. What makes homologous chromosomes find each other in meiosis. A review and an hypothesis. *Chomosoma* 108: 209-219.
- Sym M., Engebrecht J. and Roeder S. 1993. ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell* 72: 365-378.
- Sym M. and Roeder S. 1994. Crossover interference is abolished in the absence of a synaptonemal

- complex protein. *Cell* 79: 283-292.
- Sym M. and Roeder G. 1995. Zip1-induced changes in synaptonemal complex structure and polycomplex assembly. *J. Cell Biol.* 128: 455-466.
- Tarsounas M., Pearlman R.E., Gasser P.J., Park M. S. and Moens P.B. 1997. Protein-Protein interactions in synaptonemal complex. *Mol. Biol. Cell* 8: 1405-1414.
- Tarsounas M., Pearlman R.E. and Moens P.B. 1999. Meiotic activation of rat pachytene spermatocytes with okadaic acid: the behaviour of synaptonemal complex components SYN1/SCP1 and COR1/SCP3. *J. Cell Sci.* 112: 423-434.
- Taylor J.H. 1959. Autoradiographic studies of nucleic acids and protein during meiosis in *Lilium longiflorum*. *Am. J. Bot.* 46: 477-484
- Terasawa M., Shinohara A., Hotta Y., Ogawa H. and Ogawa T. 1995. Localization of RecA-like recombination proteins on chromosomes of lily at various meiotic stages. *Genes and Development* 9: 925-934.
- Tres L.L. 1975. Nucleolar RNA synthesis of meiotic prophase spermatocytes in the human testis. *Chromosoma* 53: 141-151.
- Vázquez-Nin, G.H. and Echeverría, O.M. 1976. Ultrastructural study on the meiotic prophase nucleus of rat oocyte. *Acta Anatomica (Basel)* 96: 218-231.
- Vázquez-Nin G.H., Ortiz A., López A. and Echeverría O.M. 1989. Electron microscope study of ribonucleoprotein polyparticles and their relation to perichromatin granules. *Biol. Cell* 65: 133-138.
- Vázquez-Nin G.H., Flores E., Echeverría O.M., Merkert H., Wettstein R. and Benavente R. 1993. Immunocytochemical localization of DNA in synaptonemal complexes of rat and mouse spermatocytes, and chick oocytes. *Chromosome* 102: 457-463.
- Vázquez-Nin G.H., Biggiogera M. and Echeverría O.M. 1995. Activation of osmium ammine by SO<sub>2</sub>-generating chemicals for electron microscopy Feulgen-type staining of DNA. *Eur. J. Histochemistry* 39: 101-106.
- Vázquez-Nin G.H. and Echeverría O.M. 1996. The polytene nucleus in morphological, cytochemical, and functional studies of messenger RNA transcription, processing and transportation. *Eur. J. Histochem.* 40: 7-16.
- Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M., Ortiz R., Ubaldo E. and Fakan S. 1997. Effects of hypophyseal hormones on transcription and RNA export to the cytoplasm. *Exp. Cell. Res.* 236: 519-526.
- von Wettstein D., Rasmussen S.W. and Holm P.B. 1984. The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu. Rev. Genet.* 18: 331-413.
- Wandall A. and Svendsen A. 1985. Transition from somatic to meiotic pairing and progression changes of the synaptonemal complex. *Chromosoma* 92: 254-264.
- Weiner B.M. and Kleckner N. 1994. Chromosome pairing via multiple interstitial interactions before and during meiosis yeast. *Cell* 77: 977-991.
- Welsch B. 1973. Synaptonemal complex und chromosomenstruktur in der achiasmatischen Spermatogenese von *Panorpa communis* (Mecoptera). *Chromosoma* 43: 19-74.
- Wettstein R. and Graver A. 1973. Film-supporting frames for mounting sections grids. *J. Ultrastruct.*

Res. 43: 436-447.

Wolfe S.L. 1972. *Biology of the cell*. Belmont Cal. Wadsworth Publishing Company.

Wolstenholme D.R. and Meyer G.F. 1966. Some facts concerning the nature and formation of axial core structures in spermatids of *Gninus domesticus*. *Chromosoma* 18: 272-280.

Yuan L., Brundell E., Bjorkroth B., Daneholt B. and Höög C. 1996. Localization of the N-terminus of SCP1 to the central element of the synaptonemal complex and evidence for direct interactions between the N-terminus of SCP1 molecules organized head-to-head. *Exp. Cell Res.* 226: 11-9.

Yuan L., Pettari J., Brundell E., Bjorkroth B., Zhao J., Liu J.G., Brismar H., Daneholt B., and Höög C. 1998. The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded, cross-striated fibers in vivo. *J. Cell Biol.* 142: 331-339.

Zickler D. and Kleckner N. 1998. The leptotene-zigotene transition of meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 32: 619-697.

Zickler D. and Kleckner N. 1999. Meiotic chromosomes: Integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* 33: 603-754.

## XI. AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin, quien ha sido un paciente maestro y me ha apoyado a lo largo de estos años de estudios, siendo un tutor excepcional que me ha mostrado que es un maestro y científico extraordinario.

A la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, por toda su experiencia y enseñanza aportada durante esta investigación con consejos siempre acertados. Muchas gracias por su apoyo incondicional durante todo este tiempo.

A la Dra. Sara Frías Vázquez, por haber aceptado ser parte de mi comité tutorial, colaborar con sus comentarios en el desarrollo del trabajo experimental y haberme enriquecido con su opinión todo este tiempo.

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, por haber aceptado ser parte del comité tutorial y colaborar con sus sugerencias en este trabajo y haber sido una influencia positiva en mi desarrollo académico.

Al M. en C. Gabriel López Velázquez por haber tenido la disposición y paciencia al enseñarme todo lo relacionado con la metodología de la hibridación *in situ* ultraestructural.

A la M. en C. Ernestina Ubaldo Pérez por su apoyo técnico en el desarrollo de esta investigación.

Al M.V.Z. Mario Soriano Bautista por proporcionarme el material biológico empleado en esta investigación.

A mis amigos Gabriel, Rocio, Paty, Lety y Silvia con quienes pude compartir mis dudas y encontrar el apoyo siempre.

A cada uno de mis compañeros del laboratorio de Microscopía Electrónica de quienes siempre recibí apoyo para el desarrollo de este trabajo.

Durante este tiempo tuve la oportunidad de ser becaria de la DGAPA, agradezco al Departamento de Biología Celular, a la Subcomisión de Superación Académica del Personal Académico de la Facultad de Ciencias, así como al Consejo Técnico de esta facultad el apoyo que recibí durante mis estudios de doctorado.

## XII. DEDICATORIAS

**A ti, oh Dios de mis padres, te doy gracias y te alabo, porque me has dado sabiduría y fuerza.**

**Daniel 2:23.**

A la memoria de mi padre

Me es muy difícil en unas cuantas palabras, describir la profunda gratitud que siento hacia Dios, mi esposo, mi mami, mis hermanos y mi familia en la carne y en la fe, por el apoyo que me han brindado durante estos años de estudio. Este no es un logro personal, pues siempre todos ustedes han estado conmigo dándome ánimos para seguir adelante. Muchas gracias por su amor hacia mi y el gozo que han manifestado al poder compartir conmigo el que por fin alcance esta meta tan anhelada. Este logro que hoy puedo experimentar, es el fruto del apoyo incondicional que he recibido de todos ustedes. Me siento muy contenta de poder dedicarles con todo mi amor este trabajo que es fruto de un esfuerzo compartido.

Muchas gracias Miguel Angel por amarme y amar lo que es parte de mi vida, mi carrera.

Mami muchas gracias por apoyarme siempre en todo.

A Pili, Tito, Ale, Toño, y mis sobrinas Rebe y Ale que siempre han expresado respeto y admiración a mi trabajo.

A mi amada familia Almanza que siempre han estado conmigo cuando los he necesitado.

A mi entrañable familia de Berith que siempre me han sostenido en oración.

**XIII. LISTA DE ABREVIATURAS**

CS	Complejo sinaptonémico
DSB	Ruptura de doble cadena
FISH	Hibridación in situ fluorescente
RNP	Ribonucleoproteínas
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
SCP1	Proteína del complejo sinaptonémico 1
SCP2	Proteína del complejo sinaptonémico 2
SCP3	Proteína del complejo sinaptonémico 3
ARNhn	Ribonucleoproteína heterogeneo nuclear
ARNpnu	Ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares
BSA	Albumina de suero bovino
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
GAR	Anticuerpo contra conejo hecho en cabra
IgG	Inmunoglobulina G
MAG	Anticuerpo contra cabra hecho en ratón
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
PTA	Tinción de ácido fosfotúnstico
ARNasa	Ribonucleasa

## Cytochemical study of the distribution of RNA and DNA in the synaptonemal complex of guinea-pig and rat spermatocytes

R. Ortiz<sup>1</sup>, O.M. Echeverría<sup>1</sup>, E. Úbaldo<sup>1</sup>, A. Carlos<sup>1</sup>, C. Scassellati<sup>2</sup>, G.H. Vázquez-Nin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Electron Microscopy, Department of Cell Biology, Faculty of Sciences, UNAM, Apartado Postal 70-438, México D.F. México and <sup>2</sup>Center of Electron Microscopy, University of Lausanne, 27 rue Bugnon, CH-1005 Lausanne, Switzerland

Accepted: 6/3/2002

Key words: mammalian testis, ribonucleoprotein, meiosis, *in situ* hybridization, electron microscopy

### SUMMARY

The distribution of DNA and RNA in the synaptonemal complex and related structures, was studied using high resolution cytochemical methods and *in situ* hybridization, in guinea pig and rat testis. Serial sectioning demonstrates that frequently the formation of the synaptonemal complex (SC) occurs without a previous development of isolated chromosomal axes. The lateral elements of the forming SC are in continuity with pairs of DNA-containing thin filaments. These chromatin filaments fold in numerous short loops just before incorporating to the lateral elements. Some of these loops are included in the ribbon-like structure of the lateral elements of the mature SC. We propose that these short loops contain the DNA attachment sequences associated with the proteins of the LE. During the formation of the SC one of the two chromatin filaments incorporates at the central surface of the forming lateral element (LE) and the other is located at the external side of the LE. This unexpected distribution does not correspond to the pair of thick filaments previously discerned in structure of the LE. The presence of RNA associated with the DNA-containing thin filaments, as well as with the axial chromatin elements of the forming SC, may be related with the

transcription occurring during meiotic prophase, specially during zygotene stage. We propose that RNA is involved in a still uncharacterized process essential for pairing.

### INTRODUCTION

The synaptonemal complex (SC) was observed for the first time by Watson (1952) in rat spermatocytes as filamentous structures, and described more accurately four years later by Moses (1956) in a crayfish and by Fawcett (1956) in the pigeon. In few years, structures corresponding to SCs were found in the meiotic prophase of protists, fungi, plants and animals (see review by Westergard and Wettstein, 1972). Three-dimensional reconstructions of complete nuclei of pachytene spermatocytes demonstrated that the total number of SC per nucleus is equal to the haploid number of chromosomes of the species, allowing the conclusion that this structure corresponds to a bivalent (Wettstein and Sotelo, 1967). The classical hypothesis that SC is related with crossing-over formation was supported by: a) its constant presence in meiotic prophase and their absence when pairing does not take place; b) its extension all along each bivalent; c) the regular

occurrence of the bridging system (see review by Sotelo, 1969). The presence of short stretches of SC in relation with chiasma in diplotene stage, also suggested a specific role for the SC in homologous exchanges (Westergaard and Wettstein, 1972). However, some findings cast some doubts on its relationships with chiasma development: the pairing space contains little or no DNA, and the SC occurs in circumstances other than orthodox pairing (Sotelo, 1969). The finding of recombination nodules provided support for the notion that SC is involved in chiasma formation (Carpenter, 1975, 1979 a, b). Posterior studies on the meiosis of yeast using synchronized cultures (Kleckner *et al.*, 1991), and fluorescent *in situ* hybridization (Scherthan *et al.*, 1992), demonstrated that in this group, double strand breaks (DSB) and recombination occur before synapsis and SC formation (Kleckner, 1996; Padmore *et al.*, 1991; see review by Hawley and Arbel, 1993). Experiments with meiotic mutants showed that the alteration of DSB prevents the formation of a normal SC (Bishop *et al.*, 1992; Roeder, 1995; Baker *et al.*, 1995). These results support the view that in yeast the SC is not involved in recombination and that its formation depends on previous DSB and recombination. However, electron microscopical studies demonstrated that in *Drosophila* females meiotic mutants eliminating crossing over and gene conversion do not alter the formation of the SC (McKim *et al.*, 1998).

Immunocytochemical localization of the DNA at the level of electron microscope in mouse and rat spermatocytes and chick oocytes, demonstrated the presence of significant amounts of DNA in the lateral elements (LEs). The labeling of the central space is very low except for few specific sites: the recombination nodules and few fibrils not related to these nodules (Vázquez-Nin *et al.*, 1993).

However, the precise location of the two sister chromatids in the SC is not yet known. As stated several years ago, the key to the knowledge of cytophysiological role of the SC is to find out the distribution of DNA in the SC (Sotelo, 1969).

RNA has not been related to recombination or other possible functions of the SC. Nevertheless, the presence of RNA in the LEs of the SC was suggested by Wolstenholme and Meyer (1966) using optical histochemistry and electron microscopy. The use of a preferential staining procedure for ribonucleoprotein (RNP)-containing structures in electron microscopy, indicated the presence of RNP in the

LEs of the synaptonemal complex, as well as in leptotene and zygotene axial cores (Esponda and Stocker, 1971; Vázquez-Nin and Echeverría, 1976). Furthermore, hydrolyses with RNase were found to cause profound alterations of the LEs (Vázquez-Nin and Echeverría, 1976). However, the precise distribution of RNA-containing structures associated with the forming SC, has not been studied.

The aim of the present work is to study the distribution of both nucleic acids during the formation and the maturity of the SC.

## MATERIALS AND METHODS

Testes of young adult guinea pigs and rats were used in all experiments.

The standard procedure for preparing the samples involves fixation with 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M phosphate buffer pH 7.3 for 1 h at room temperature, rinsing in the same buffer, dehydration with ethanol, and embedding in an epoxy resin (glycide ether 100, Merck, Darmstadt, Germany).

One micrometer thick sections were stained with toluidine blue. The cellular associations present in the seminiferous tubules were studied at light microscope and compared with the classical descriptions of the spermatogenic cycle of the guinea pig (Clermont, 1960) and of the rat (Leblond and Clermont, 1952).

In order to stain RNP structures, the uranyl acetate-EDTA-lead citrate (Bernhard, 1969) procedure was used. DNA was stained using the osmium-amine procedure (Cogliati and Gautier, 1973) modified by Vázquez-Nin and coworkers (1995).

### Immunolocalization

Samples of seminiferous tubules were fixed in 2-4% paraformaldehyde in 0.15 M phosphate buffer pH 7.3 and embedded in Lowicryl K4M. Polymerization was carried out using UV at -20 °C. The ultrathin sections were mounted in Formvar coated nickel grids, and processed for postembedding immunolocalization as described previously (Biggiogera *et al.*, 1989; Vázquez-Nin *et al.*, 1990).

### Ultrastructural *in situ* hybridization

Specimens were fixed in 2% paraformaldehyde with 0.2% glutaraldehyde added and embedded in Lowicryl K4M.

Genomic DNA from guinea pig liver and spleen was labeled with digoxigenin-11-dUTP by nick translation according with the manufacturer's protocol (Boehringer Mannheim, Germany).

The *in situ* hybridization was performed on the grids with the denatured probe with or without pre-annealing for 24-48 h at 37-45 °C. The probe was used at 10 ng/ml final concentration in a hybridization solution containing 10% deionized formamide, 10% Dextran sulfate and 1X saline sodium citrate buffer (0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate; pH 7.0). The DNA in the specimen was not denatured. The hybrids were detected by incubation of the grids on a drop of mouse anti-digoxigenin (Boehringer, Mannheim, Germany). The mouse anti-digoxigenin was detected by a rabbit anti-mouse IgG (Aurion, Wageningen, The Netherlands).

In order to confirm the specificity of the hybridization signal, some sections were pre-treated with 2mg/ml ribonuclease (type IA, Sigma) in 1 mM tri-ethanolamine-acetic acid buffer, pH 7,3 for 8 hr. at 37°C.

All preparations were contrasted with 2.5% uranyl acetate for 5 min and lead citrate for 1 min.

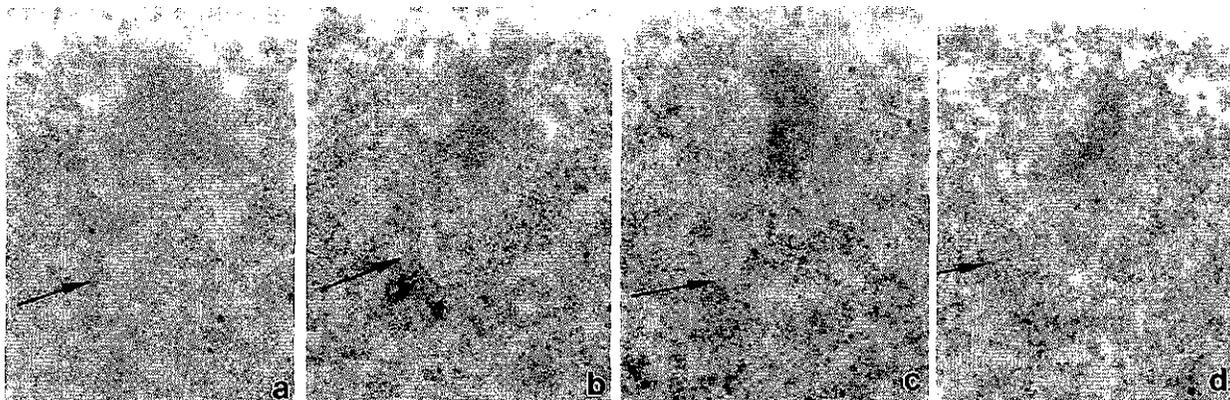
## RESULTS

### General Morphology

To describe the organization of the SC it is necessary to situate the sections in relation to the axes of the complex. The frontal plane contains lateral

and central elements lengthwise. The transverse plane is perpendicular to the main axis of the SC. Lateral plane is parallel to this axis and perpendicular to the frontal plane. It contains some, but not all the elements of the SC. This nomenclature has been used by Moses (1968) and Sotelo (1969).

Serial sectioning of the nuclei of spermatocytes in early meiotic prophase demonstrated the presence of short SC between 0.5 and 1.8 mm in length. One extremity of some of them is in contact with nuclear envelope, but others are distant from the nuclear periphery (Fig. 1). The reconstruction of 29 SC of 10 different nuclei showed that the ends of the lateral elements of most of these short SC are not in continuity with converging axial elements. Continuities of the lateral elements of the forming SC with a pair of thin filaments can be seen when both structures are contained in the thickness of one section (Figs. 2, 3). Frontal sections show that one of these filaments is incorporated in the external side of the lateral element and the other at the central side, that is in the border of the pairing space (Fig. 2). The pairs of thin filaments and the LE are surrounded by loops of different length and filaments of chromatin that correspond to long loops not contained in the section (Fig. 3). The frequency of short loops (40 to 200 nm in length, measured from the tip to the axial filament) increases in the proximity of the forming chromosomal axis or lateral element of the growing SC. These short loops are

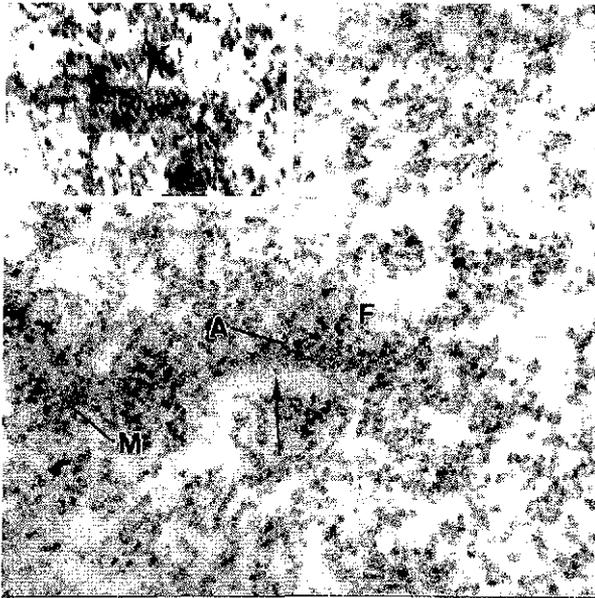


**Fig. 1** - Serial sections of a synaptonemal complex in the process of formation. The arrows indicate the position of the synaptonemal complex. Figure a. No synaptonemal complex can be seen. Figure b. The three elements of the synaptonemal complex are depicted. The lower tip of the lateral elements are apparently in continuity with aligned structures (arrow head). Figures c and d. No structure related to the forming synaptonemal complex is visible. The complex is 530 nm in length, no contact with the nuclear envelope or continuity with converging axial elements can be seen. X 28,500.



**Fig. 2 - Forming synaptonemal complex.** General staining. A continuity between the fibers of the lateral element (arrow heads) and a pair of filaments (arrow), can be seen. p - perichromatin granules. X 40,000. Inset. The external and central filaments of the forming lateral element (arrow head) are clearly continuous with the precursor fine filaments (arrow). X 55,000.

closely distributed in quasi-periodic form along the filament (Fig. 3 inset). The period is about 22

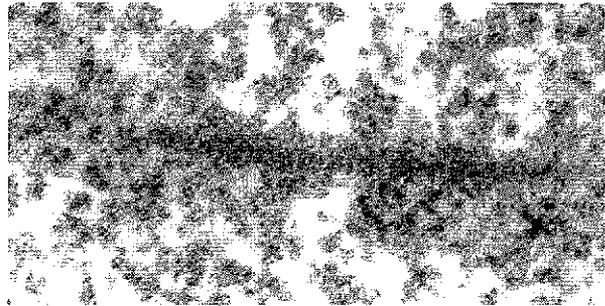


**Fig. 3 - Zygotene.** The formation of the chromosome axis is simultaneous with final pairing. The lateral element (A) is continuous with two fine filaments (M). The central space of the forming synaptonemal complex is visible as a chromatin exclusion zone (arrow). F - filaments of chromatin surrounding the complex. X40,000. Inset. Numerous short loops form a quasi-periodic structure (arrow head). X26,500.

nm ( $X=22.3$ ,  $SD=3.98$ ,  $N=87$ ). It was estimated from measures carried out in 24 LEs of 8 nuclei.

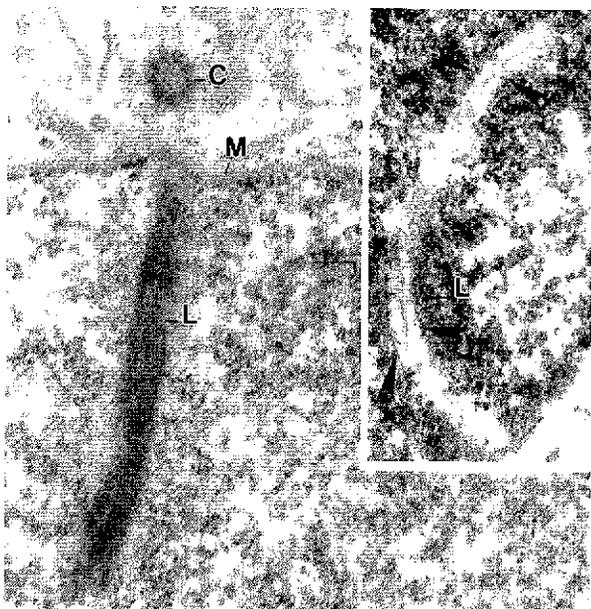
The LEs of mature SCs present a transverse striation (Fig. 4) with a period about 20 nm ( $X=20.5$ ,  $SD=2.39$ , 36 LEs were measured in 10 nuclei). The lateral views show that the LEs of pachytene SC are longitudinal striated ribbons about 0.2  $\mu$ m wide, in which some thick irregular bundles of fibrils can be discerned, but no cross striation can be seen (Fig. 5).

Frontal sections demonstrate the presence of a dark stained filament of irregular thickness in the border between central space and the LEs. This filament frequently appears as beads on a string or aligned beads (Fig. 5 inset).

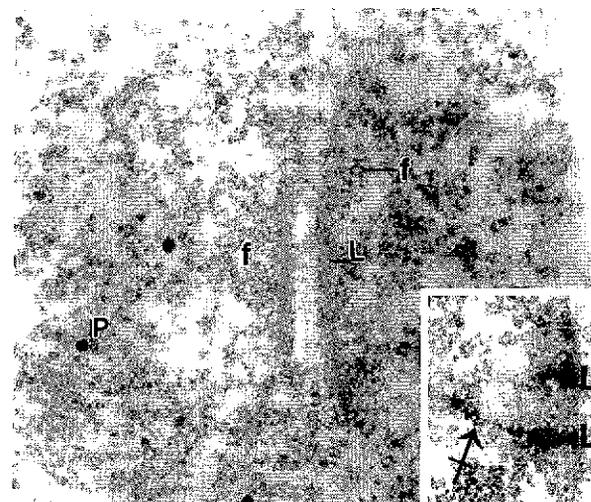


**Fig. 4 - Pachytene.** General staining. A lateral element of a synaptonemal complex showing a periodic transverse striation. X74,000

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 5 - Pachytene. General staining.** Lateral view of the ribbon-like lateral element (L) of a synaptonemal complex. Longitudinal ill defined bundles of fibrils can be seen. No periodic pattern can be discerned. C- centriole. M- nuclear envelope X34,500. Inset. Frontal section of a synaptonemal complex. Portions of a dark stained filament (arrow heads) can be seen in the central side of the lateral elements (L). X37,000.



**Fig. 6 - Advanced pachytene. EDTA staining.** The lateral elements are stained clear gray (L). A row of dark stained granules can be seen in the central surface of the lateral elements. The central space is devoid of RNP structures. Numerous perichromatin fibrils (f) are located in the vicinity of the synaptonemal complex and to a lesser extent in the rest of nucleoplasm. Perichromatin granules (p) are dark stained. X37,000. Inset. Two forming axial elements aligned in the vicinity of the nuclear membrane are dark stained (L). The crossed arrow indicates the continuity of a forming axial element with a dark stained fibril depicting short folds. X24,000.

**Distribution of RNP**

The lateral elements of the mature pachytene SC are faintly stained with EDTA procedure. A row of small granules positively contrasted with this staining method can be seen in contact with the medial face of the LEs of the SC in frontal sections (Fig. 6). The forming chromosome cores and the developing LE are frequently darkly stained. The fine folding fibrils found in continuity with the growing end of these structures are also positively contrasted with EDTA procedure. These fibrils present short loops as those depicted with standard contrast techniques (Fig. 6 inset).

The fibrils and granules surrounding the SC are intensively labeled by *in situ* hybridization of a genomic probe carried out without denaturation of the DNA of the sample (Fig. 7). The internal face of the LE is also labeled. The sections treated with RNase before hybridization present few or no gold grains (data not shown).

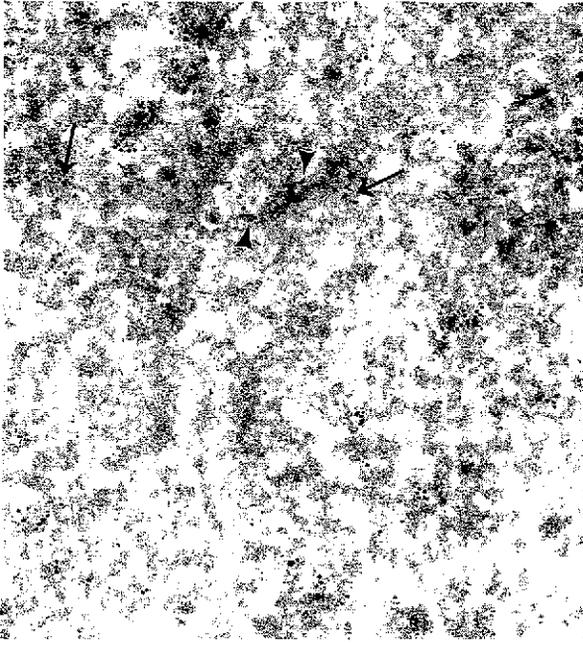
**Distribution of DNA**

Osmium-ammine procedure specific for DNA contrasts positively the fine filaments aligned in pairs.

These filaments correspond to those found in continuity with the lateral elements of the SC in preparations stained with general contrasting method. The loops of different length surrounding the fine filaments are also contrasted with osmium-ammine. Short loops are specially abundant (Fig. 8).

Important changes in the distribution of chromatin take place at the moment of the formation of the SC. The central space is almost empty of DNA-containing fibrils, except for few transverse fibrils of chromatin. A longitudinal fibril located to the central surface of the LE is positively contrasted with osmium ammine staining method (Figs. 9, 10). This fibril corresponds to the filament of irregular diameter showed by general staining (Fig 5 inset), and to the row of small granules found with EDTA procedure for RNP (Fig. 6). Oblique sections of the LE demonstrate the presence of numerous short DNA-containing loops and fibrils inside the LE (Figs. 10, 11). Some of the fibrils crossing the LE are continuous with the chromatin surrounding the SC (Figs. 9, 10).

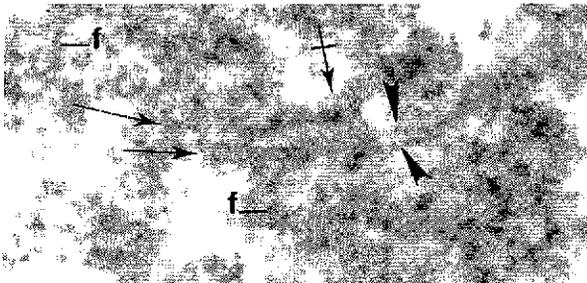
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



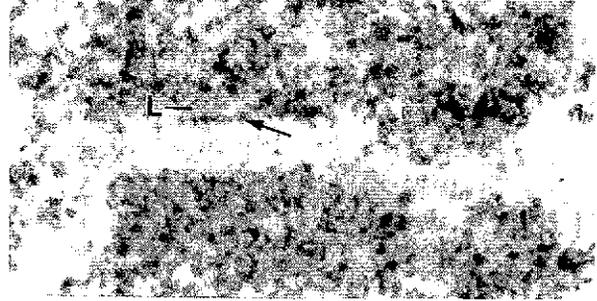
**Fig. 7** - *In situ* hybridization using a genomic probe to detect RNA. General staining. Pachytene stage. Numerous RNP fibrils and granules located in the nucleoplasm are labeled. Gold grains are also associated with fibrils surrounding a synaptonemal complex (arrows). The boundary between the lateral element and the central space is also labeled (arrow heads). X74,000.

## DISCUSSION

The distribution of DNA in the mature pachytene SC has been studied by Coleman and Moses (1964) using of indium trichloride staining complemented with DNase hydrolysis. They concluded



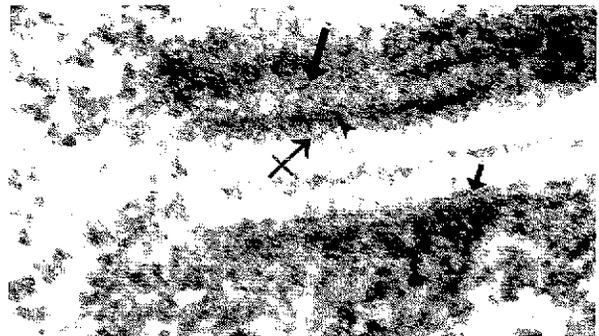
**Fig. 8** - Osmium-amine staining specific for DNA. Zygotene stage. Two aligned fine filaments are positively contrasted (arrows). The two filaments composing the forming lateral elements are clearly depicted (arrow heads). At this stage the fine filaments are folded forming short loops (crossed arrow). Abundant fibers of extended chromatin are present in the nucleoplasm (f). X75,000.



**Fig. 9** - Pachytene. Osmium-amine staining specific for DNA. An irregular filament located in the central side of the lateral element is dark stained (arrow). The pairing space is devoid of chromatin. No precise external limit of the lateral element (L) can be seen. X80,000.

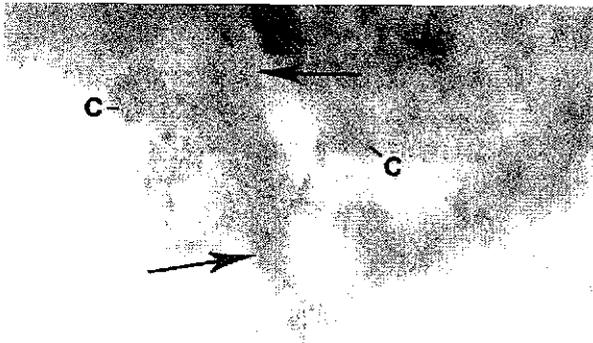
ed that there is few or no DNA in the central element and that the central space is traversed by some fibrils containing DNA. These results were supported by a study using immunolocalization of DNA at the level of the electron microscope (Vázquez-Nin *et al.*, 1993).

The use of the osmium-amine method allowed us a precise and specific determination of the distribution of the DNA-containing structures in forming and mature SC. The present results demonstrate that, in rat and guinea-pig spermatocytes, each lateral element of the SC in the process



**Fig. 10** - Pachytene. Osmium-amine staining. Both lateral elements of the synaptonemal complex are sectioned at different inclination probably due to a turn of the complex. The beads on a string aspect of the filament located in the central side of the lateral element is clearly depicted (short arrow). The thicker regions of these filaments are dark stained. The filaments of the surrounding chromatin are continuous with those of the LE. The upper LE is cut along the wider surface of the ribbon. Short loops protrude to the pairing space (crossed arrow). Numerous fibrils and short loops lay in the thickness of the LE (long arrow). The external border of the element indicated by a denser arrangement of the filaments of chromatin. X70,000.

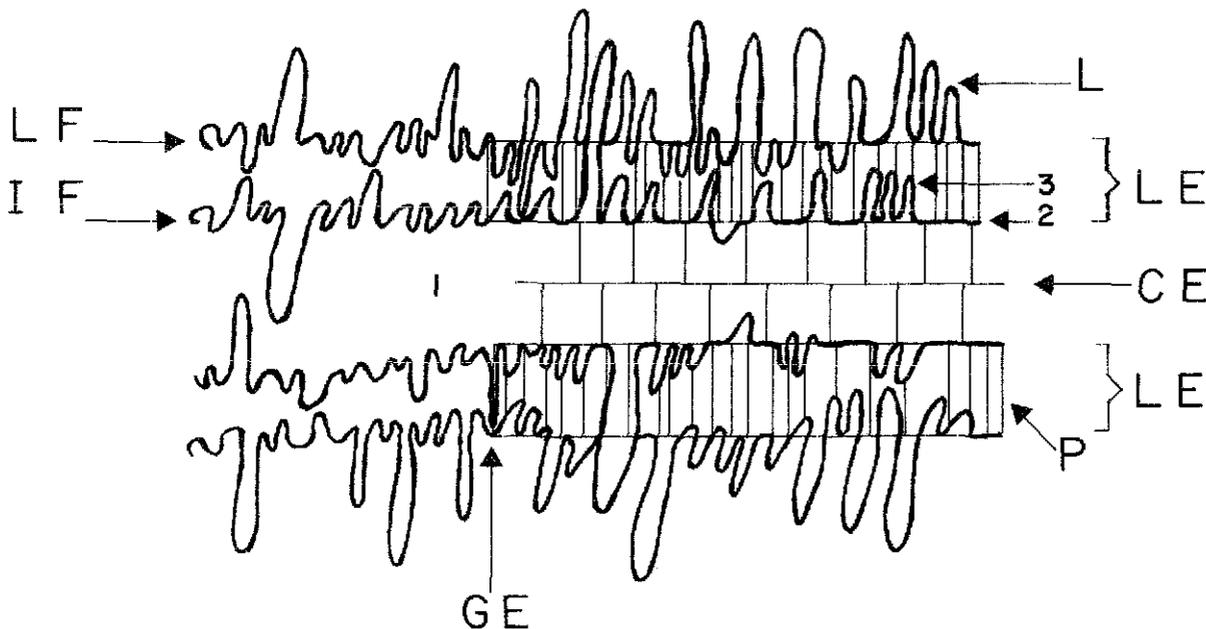
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 11** - Pachytene. Osmium-ammine staining Lateral view of a LE. Positively contrasted short loops can be seen immersed in a ribbon-like region stained clear gray (arrows). C- filaments of the chromatin surrounding the complex. X57,000.

One of these filaments is located at the medial side of the LE, while the other is folded in numerous loops at the external face of the LE. The presence of a chromatid axis at the internal side and the other at the external side of the LE is an unexpected distribution, its cytophysiological interpretation is open to discussion in terms of the opportunities of each filament to become involved in different meiotic processes. If the SC is essential for the initiation of recombination, in organisms other than yeast as was classically proposed (see review by Hawley and Arbel, 1993), the proximity of each chromatid with the recombination nodules located in the central space may influence its opportunity to become involved in a recombination event. Nevertheless, the filament located at the external side of the LE may gain access to the medial space by means of the inward oriented loops or by changing positions with the filament situated at the internal side of the LE. However, if in mam-

of formation is frequently continuous with a pair of thin DNA-containing filaments folded in loops of different length representing the sister chromatids of one of the homologous chromosomes.



**Fig. 12** - Schematic drawing of a frontal view of a forming synaptonemal complex showing the distribution of some of its macromolecular components. The lateral elements (LE) extend to the right of the growing end (GE) of the synaptonemal complex. At a short distance from the GE the central element (CE) and the transversal filaments appear. The lateral thin DNA-containing filament (LF), situated to the left of the growing end, is continuous with the filament located in the external side of the lateral element. The loops of these filaments are associated with RNA-containing structures. The internal DNA-containing filament (IF) is continuous with the filament located in the internal border of the lateral element (2). These filaments are also associated with RNP. Numerous DNA-containing loops (3) are located inside the protein structure (P) of the lateral elements. Proteins form cross striation in a periodic pattern (P) that can be seen in frontal section. The appearance of a zone of exclusion of DNA and RNA (1), takes place before the formation of the classical elements of the synaptonemal complex.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

mals the recombination is initiated before the SC formation as in yeast (Padmore *et al.*, 1991; Sym *et al.*, 1993; Borde *et al.*, 2000), the association of the chromatids with the both sides of the LE may be only relevant to crossover interference and disjunction process (Maguire, 1995).

The two DNA-containing thin filaments are present in frontal sections of the SC. Doubleness of the LE has been observed in rat spermatocytes (Sotelo and Trujillo-Cenoz, 1958), in pigeon (Nebel and Coulon, 1962) and in various other animals and plants (see review by Moses, 1968). These pairs of thick fibers frequently found in lateral sections of the LE, were interpreted as representing the two chromatids of one chromosome (Nebel and Coulon, 1962; Baker and Franchi, 1967; Moses, 1968). The results of the present work indicate that in rat and guinea-pig the DNA-containing filaments do not correspond to thicker fibers that can be discerned in the protein structure of the lateral elements.

The development of the SC is accompanied by an intense rearrangement of chromatin characterized by: 1) the formation of a region of almost complete exclusion of DNA and RNA, the central space, and 2) the folding of the fine filaments to form multiple short loops before incorporating into the SC. These short loops are included in the ribbon-like structure of the LE in mature SC.

Periodical striated patterns were described in animals, fungi and plants (see reviews by Westergaard and Wettstein, 1972; Zickler and Kleckner, 1999). When SCP3 is expressed in cultured somatic cells, cross-striated filaments with a periodicity of about 20 nm are formed (Yuan *et al.*, 1998). This period approximately coincides with the spacing of the bands of the LEs found in some animals and in an Ascomycete (Zickler and Kleckner, 1999). The periodicity of the numerous short loops contained in the thickness of the ribbon-like structure of the LE is also about 20 nm, although there is some dispersion of data. The DNA isolated and sequenced from purified SC was found to be different from random genomic sequences (Pearlman *et al.*, 1992). It presents excess of microsatellites, mostly GT/CA repeats, and fragments of LINE and SINE sequences, which are interpreted as specialized attachment sequences (Pearlman *et al.*, 1992; Moens, 1994; Moens *et al.*, 1998). The loops of DNA lying inside the LE probably correspond to

these attachment sequences associated with the proteins of the LE.

The irregular filament located at the central face of the LE of SC is stained with EDTA procedure and labeled by *in situ* hybridization carried out without the denaturation of the DNA of the sample. These features demonstrate that RNA is associated with the DNA-containing axial filament situated at the medial side of the LE in mature SC. The presence of the RNA in the fine axial chromatin filaments is detected short before these filaments are incorporated in the forming LE, and disappears progressively during the course of pachytene stage. It is difficult to ascertain the whether the filament located at the external side of the LE also contains RNA, due to its numerous loops and the multiple RNP structures, as perichromatin fibrils and perichromatin granules (Monneron and Bernhard, 1969), associated with it. The appearance of RNA bound to the chromosome axes during final pairing may represent the newly synthesized RNAs previously found using biochemical procedures and referred to as PsnRNA and zygRNA. A small nuclear RNA 125 nucleotides in length (PsnRNA) transcribed by RNA polymerase III was found to be synthesized during meiotic prophase in *Lilium* (Hotta and Stern, 1981). The transcription of a DNA replicated during chromosome pairing has been reported in lily and mouse meiocytes (Hotta *et al.*, 1985). These transcripts (zygRNA) contain poly(A) and are found only in meiocytes (Hotta *et al.*, 1985). Furthermore, autoradiographic experiments at the light microscope level have demonstrated nucleolar and extranucleolar transcription during meiotic prophase in various animals and plants (Taylor, 1959; Muckenthaler, 1964; Monesi, 1965; Kierszenbaum and Tres, 1974; Tres, 1975; Hartung and Stahl, 1976; Söderström, 1976; Geremia *et al.*, 1977). The inhibition of transcription during meiotic prophase results in strong interference with meiotic process (Sakaguchi *et al.*, 1983). When the inhibitor was applied in leptotene or zygotene, meiotic development arrests and synapsis does not take place (Sakaguchi *et al.*, 1983). The authors suggest that late zygonema probably represents a physiological distinctive stage in meiotic development with respect to RNA metabolism which is related to the completion of synapsis. Taking into account all these results, the asso-

ciation of RNA with the axial filaments before the formation of the SC and its presence in the chromatin axes of the LE during early pachytene is probably related to a still uncharacterized process essential for the achievement of final pairing. The intensity of the positive contrast of the forming leptotene and zygotene chromosomal axes with EDTA procedure for RNP is much higher than that of the lateral element of the forming SC. During pachytene stage the specific contrast due to RNA fades and finally disappears from the lateral elements of the SC. These observations lead us to speculate that the RNA is probably related to the assembly of the component of the axial element and its transformation to lateral element of the SC.

Further work aimed at characterizing morphologically and cytochemical the structures associated with homology search and with the formation of the SCs is in progress. In order to interpret the presence of RNA in the SC it is important to study the localization of the transcriptional activity in several stages of meiotic prophase.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant I/74 348 of the Volkswagen-Stiftung and by UNAM, PAPIIT IN227398 grant. The authors are indebted with Ricardo Benavente for helpful and critical reading of the manuscript. We also wish to thank Mario Soriano for animal care and Porfirio Munguía Reyes for drawing the diagram.

## REFERENCES

- Baker S.M., Bronner C.E., Zhang L., Plug A.W., Robatzek M., Warren G., Elliott E.A., Yu J., Ashley T., Arnheim N., and Liskay M.: Male mice defective in the DNA mismatch repair gene *PNS2* exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell* 82, 309-319, 1995
- Baker T.G., and Franchi L.L.: The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries. *J. Cell Sci.* 2, 213-224, 1967.
- Bernhard W.: A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27, 250-265, 1969
- Biggiogera M., Fakan S., Kaufmann S.H., Black A., Shaper J.H., and Bush H.: Simultaneous immunoelectron microscopic visualization of protein B23 and C23 distribution in the HeLa cell nucleolus. *J. Histochem Cytochem.* 9, 1371-1374, 1989.
- Bishop D.K., Park D., Xu L., and Kleckner N.: DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* *recA* required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* 69, 439-456, 1992.
- Borde V., Goldman S.H., and Lichten M.: Direct coupling between meiotic replication and recombination initiation. *Science* 290, 806-809, 2000.
- Carpenter A.T.C.: Electron microscopy of *Drosophila melanogaster* females. II. The recombination nodule: a recombination associated structure at pachytene? *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 3186-3189, 1975.
- Carpenter A.T.C.: Synaptonemal complex and recombination nodules in wild type of *Drosophila melanogaster* females. *Genetics* 92, 511-541, 1979a
- Carpenter A.T.C.: Recombination nodules and synaptonemal complex in recombination defective females of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 75, 259-292, 1979b.
- Clermont Y.: Cycle of the seminiferous epithelium of the guinea pig. *Fert. Steril* 6, 563-573, 1960.
- Cogliati R., and Gautier A.: Mise en évidence de l'ADN et des polysaccharides à l'aide d'un nouveau réactif de type Schiff. *C. R. Acad. Sci. D* 276, 3041-3044, 1973.
- Coleman J., and Moses M.: DNA and the fine structure of synaptic structures in the domestic rooster. *J. Cell Biol.* 23, 63-78, 1964.
- Esponda P., and Stockert J.C.: Localization of RNA in the synaptonemal complex. *J. Ultrastruct. Res.* 35, 411-417, 1971.
- Fawcett D.W.: The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2, 403-406, 1956.
- Geremia R., Boitani C., Conti M., and Monesi V.: RNA synthesis in spermatocytes and spermatids and preservation of meiotic RNA during spermiogenesis in the mouse. *Cell Differentiation* 5, 343-355, 1977.
- Hartung H., and Stahl A.: Incorporation of tritiated uridine during pachytene and diplotene stages in the oocytes of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Experientia* 32, 96-97, 1976.
- Hawley R.S., and Arbel T.: Yeast genetics and the fall of the classical view of meiosis. *Cell* 72, 301-303, 1993.
- Hotta Y., and Stern H.: Small nuclear RNA molecules that regulate nuclease accessibility in specific chromatin region of meiotic cells. *Cell* 27, 309-319, 1981.
- Hotta Y., Tabata S., Stubbs L., and Stern H.: Meiosis-specific transcripts of a DNA component replicated during chromosome pairing: homology across the phylogenetic spectrum. *Cell* 40, 785-793, 1985.
- Kierszenbaum A.L., and Tres L.L.: Transcription sites in spread meiotic prophase chromosomes from mouse spermatocytes. *J. Cell Biol.* 63, 923-925, 1974.
- Kleckner N.: Meiosis: How could it work? *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93, 8167-8174, 1996.

- Kleckner N., Padmore R., and Bishop D.K.: Meiotic chromosome metabolism: one view. *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* 56, 729-743, 1991.
- Leblond C.P., and Clermont Y.: Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. New York Acad. Sci.* 55, 548-569, 1952.
- Maguire M.P.: Is the synaptonemal complex a disjunction machine? *J. Heredity* 86, 330-340, 1995.
- McKim K., Green-Marroquin B.L., Sekelsky I.I., Chin G., Steinberg C., Khodosh R., and Hawley R.S.: Meiotic synapsis in the absence of recombination. *Science* 279, 876-878, 1998.
- Moens P.B.: Molecular perspectives of chromosome pairing at meiosis. *BioEssays* 16, 101-106, 1994.
- Moens P.B., Pearlman R.E., Heng H.H.Q., and Traut W.: Chromosome cores and chromatin at meiotic prophase. *Curr. Topics Develop. Biol.* 37, 241-262, 1998.
- Monneron A., and Bernhard W.: Fine structural organization of the interphase nucleus of some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* 27, 266 - 288, 1969.
- Monesi V.: Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse. RNA and protein. *Exp. Cell Res.* 39, 197-224, 1965.
- Moses M.J.: Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2, 215-218, 1956.
- Moses M.J.: Synaptonemal complex. *Ann. Rev. Genet.* 2, 363-412, 1968.
- Muckenthaler F.A.: Autoradiographic study of nucleic acids synthesis during spermatogenesis in the grasshopper, *Melanoplus differentialis*. *Exp. Cell Res.* 35, 531-547, 1964.
- Nebel B.R., and Coulon E.M.: The fine structure of chromosomes in pigeon spermatocytes. *Chromosoma* 13, 272-291, 1962.
- Padmore R., Cao L., Kleckner N.: Temporal comparison of recombination and synaptonemal complex formation during meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell* 66, 1239-1256, 1991.
- Pearlman R.E., Tsao N., and Moens P.B.: Synaptonemal complexes from DNase-treated rat pachytene chromosomes contain (GT)<sub>n</sub> and LINE sequences, but no MARs/SARs. *Genetics* 130, 865-872, 1992.
- Roeder G.S.: Sex and the single cell: Meiosis in yeast. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92, 10450-10456, 1995.
- Sakaguchi K., Miyako H., Takagami M.H., and Ito M.: Inhibition of RNA synthesis in meiotic cells and its effect on meiotic development. *Cell Struct. Funct.* 8, 127-135, 1983.
- Scherthan H., Loidl J., Schuster T., and Schweitzer D.: Meiotic chromosome condensation and pairing in *Saccharomyces cerevisiae* studied by chromosome painting. *Chromosoma* 101, 590-595, 1992.
- Söderström K.O.: Characterization of RNA synthesis in mid-pachytene spermatocytes of the rat. *Exp. Cell Res.* 102, 327-245, 1976.
- Sotelo J.R.: Ultrastructure of the chromosomes at meiosis. In *Handbook of Molecular Cytology*. (Ed. Lima de Faria A) North-Holland Pub. Co., Amsterdam, pp. 412-434, 1969.
- Sotelo J.R., and Trujillo-Ccnos O.: Microscopic structure of meiotic chromosomes during prophase. *Exp. Cell Res.* 14, 1-8, 1958.
- Sym M., Engebrecht J., and Roeder G.S.: ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell* 72, 365-378, 1993.
- Taylor J.H.: Autoradiographic studies of nucleic acids and proteins during meiosis in *Lilium longiflorum*. *Am. J. Botany* 46, 477-484, 1959.
- Tres L.L.: Nucleolar RNA synthesis of meiotic prophase spermatocytes in the human testis. *Chromosoma* 53, 141-151, 1975.
- Vázquez-Nin G.H., Biggiogera M., and Echeverría O.M.: Activation of osmium ammine by SO<sub>2</sub>-generating chemicals for electron microscopy Feulgen-type staining of DNA. *Eur. J. Histochemistry* 39, 101-106, 1995.
- Vázquez-Nin G.H., and Echeverría O.M.: Ultrastructural study on meiotic prophase nucleus of rat oocytes. *Acta Anat.* 96, 218-231, 1976.
- Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M., Fakan S., Leser G., and Martin T.E.: Immunoclectron microscope localization of snRNPs in the polytene nucleus of salivary glands of *Chironomus thummi*. *Chromosoma* 99, 44-51, 1990.
- Vázquez-Nin G.H., Flores E., Echeverría O.M., Merkert H., Benavente R., and Wettstein R.: Immunocytochemical localization of DNA in synaptonemal complexes of rat and mouse spermatocytes and chick oocytes. *Chromosoma* 102, 457-463, 1993.
- Watson M.L.: Spermatogenesis in the adult albino rat as revealed by tissue sections in the electron microscope. *Univ. Rochester Atomic Energy Report UR-185*, 1952.
- Westergaard M., and Wettstein D.: The synaptonemal complex. *Ann. Rev. Genet.* 6, 71-110, 1972.
- Wettstein R., and Sotelo J.R.: Electron microscope serial reconstruction of the spermatocyte I nuclei at pachytene. *J. Microscop.* 6, 557-576, 1967.
- Wolstenholme D.R., and Meyer G.F.: Some facts concerning the nature and formation of axial core structures in spermatids of *Gryllus domesticus*. *Chromosoma* 18, 272-286, 1966.
- Yuan L., Pelttari J., Brundell E., Bjorkroth B., Zhao J., Liu J.G., Brismar H., Daneholt B., and Hoog C.: The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded cross-striated fibers in vivo. *J. Cell Biol.* 142, 331-339, 1998.
- Zickler D., and Kleckner N.: Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* 33, 603-754, 1999.

## II. INTRODUCCIÓN

### II. 1 Generalidades de la meiosis

Algunos organismos unicelulares y pluricelulares se reproducen por división directa o por mitosis, de forma que las células hijas son genéticamente iguales a la progenitora. En este mecanismo de reproducción no interviene el sexo, por lo que se denomina reproducción asexual. Un mecanismo más complejo de reproducción es la reproducción sexual, la cual está mediada por algunas células de los órganos reproductores masculinos y femeninos. Este mecanismo exige que células diploides, mediante un proceso denominado meiosis (del griego *meioun* que significa disminuir), formen células haploides llamadas gametos (Prescott, 1976; Paniagua *et al.*, 1993). La reproducción sexual está extendida en los eucariontes porque permite una evolución más eficaz de los organismos. Esta mayor eficacia de la reproducción sexual respecto de la asexual reside en la rapidez con la cual los organismos sexuados pueden adquirir combinaciones ventajosas de genes (Solarí, 1999). La capacidad de los organismos sexuados de obtener combinaciones génicas favorables se debe a una característica esencial de la meiosis, la *recombinación genética*.

Hemos mencionado que la meiosis es el proceso por medio del cual el número de cromosomas se reduce, de modo que se forman células que sólo contienen un miembro de cada par de cromosomas homólogos (Moens, 1994).

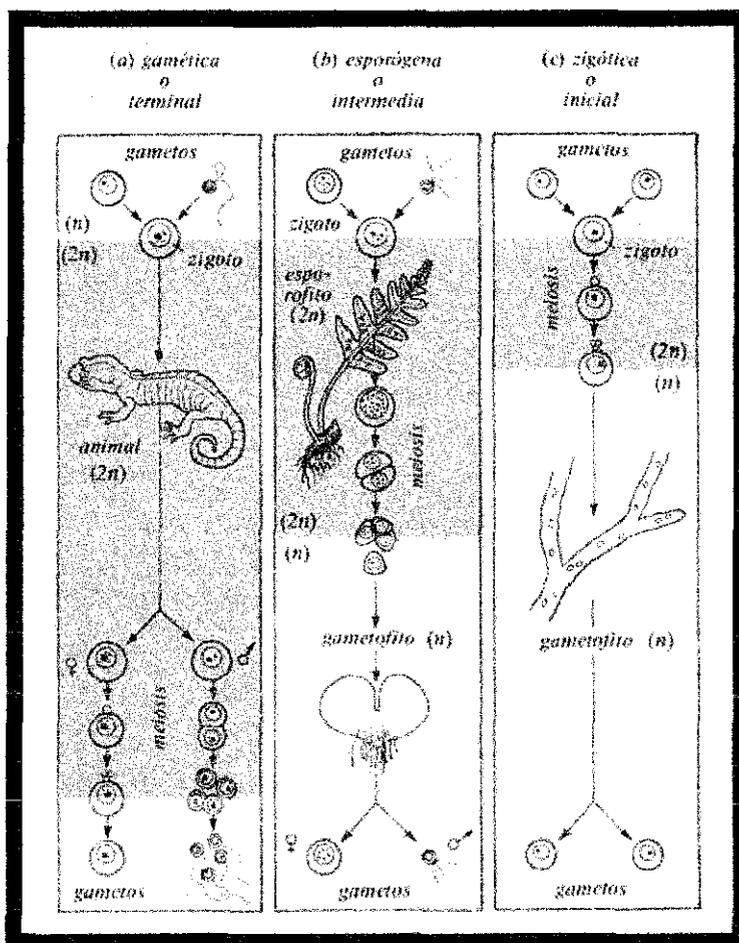
A diferencia de la mitosis, en la cual los cromosomas se duplican y luego se dividen entre dos núcleos de las células hijas en una sola división, en la meiosis la duplicación de los cromosomas va seguida por dos divisiones sucesivas conocidas como división meiótica I y división meiótica II que distribuyen los cromosomas entre cuatro núcleos de las células hijas resultantes (gametos) (Moens, 1994; Kleckner, 1997).

En la meiosis dos eventos se destacan, haciendo de ellos características únicas de este proceso que se da en la reproducción sexual:

- 1.- El alto grado de recombinación genética.
- 2.- La división reduccional que tiene lugar.

Como consecuencia de la meiosis, los hijos son genéticamente distintos a sus progenitores. Incluso los gametos procedentes de una misma meiosis difieren genéticamente entre sí debido al intercambio de material genético que tiene lugar por la recombinación genética que se produce durante la división meiótica I (Prescott, 1976). La duración de la meiosis es superior con respecto a la mitosis dentro de una misma especie (Solarí, 1999).

Wilson en 1925 clasificó a los organismos que se reproducen sexualmente en tres tipos, según el lugar que ocupa la meiosis en el ciclo de vida de los organismos (Esquema 1). La primera denominada meiosis terminal o gamética, la segunda meiosis intermedia o esporógena y la tercera inicial o cigótica (Wolfe, 1972; Kleckner, 1997; Zickler y Kleckner, 1998).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Esquema 1

Los tres tipos de meiosis, según Wilson. La zona sombreada corresponde a la fase diploide del ciclo de vida (Tomado de Wolfe, 1972)

La meiosis es un proceso complejo, cuyos aspectos moleculares recientemente se han comenzado a comprender. Los estudios que se han realizado han abordado a la meiosis desde diferentes puntos de vista, lo cual ha permitido relacionarla con otros procesos básicos en el organismo. A pesar del conocimiento que se ha generado en los últimos años acerca del proceso meiótico, aun existen aspectos que no han sido resueltos, además de que ha sido difícil conciliar la información citológica, genética, bioquímica y molecular relacionadas con la meiosis (Moens, 1994).

## II. 2. Etapas de la Profase Meiótica

Hemos ya mencionado que la meiosis consiste en dos divisiones denominadas división meiótica I y división meiótica II. Desde un punto de vista formal, cada una de las divisiones meióticas se dividen en estadios denominados: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. De todos

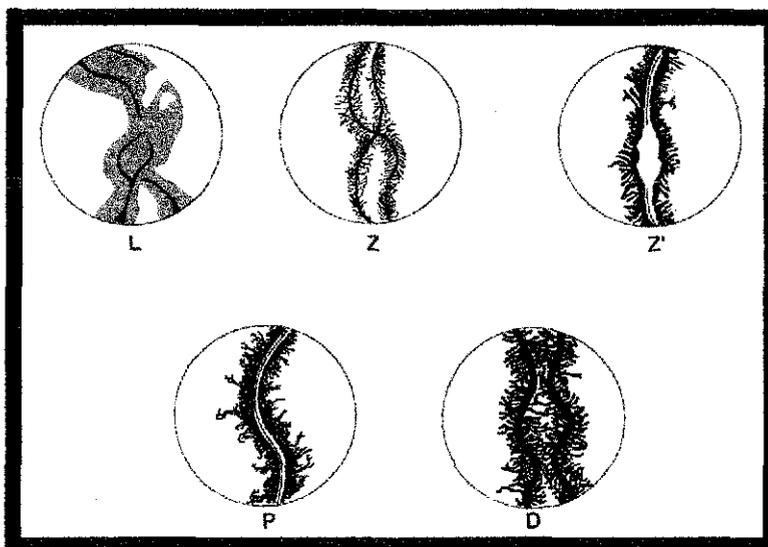
## TESIS CON FALLA DE ORIGEN

los estadios, el más largo y complejo es la profase I (Solari, 1999). La importancia de la profase meiótica I radica en que se lleva a cabo el reconocimiento, apareamiento, sinapsis y recombinación genética de los cromosomas homólogos. Estos eventos son comunes de la profase I en la mayoría de los eucariontes que se reproducen sexualmente (Darlington 1931; Rhoades 1961; John, 1990). La profase meiótica I se divide en cinco etapas: leptoteno, cigoteno, paquíteno, diploteno y diacinesis (Esquema 2). El paso de una etapa a otra es un proceso continuo (Paniagua *et al.*, 1993; Solari, 1999), aunque es importante señalar que se han descrito etapas previas al leptoteno, denominadas como preprofase y preleptoteno.

### **Preprofase.**

Se ha visto que el ciclo meiótico se inicia en los espermatocitos que se encuentran en una condición premeiótica, que juzgan como una etapa G1/G0 del ciclo celular, que se caracteriza por una marcada expansión del núcleo. La fase S meiótica o fase S premeiótica morfológicamente se ha caracterizado por presentar cromatina laxa y algunos cuantos grumos de cromatina compacta. Los eventos moleculares de la fase S meiótica son análogos a la fase S mitótica, aunque con una diferencia muy notable en cuanto a su duración. Son pocos los organismos en los que se ha medido la fase S premeiótica, sin embargo las observaciones realizadas indican que esta fase S es mucho más larga que en las células somáticas (Callan, 1972). Esta diferencia en el tiempo empleado en la síntesis de ADN durante la meiosis, se debe a que se utilizan menos replicones que en la mitosis, además de que se da una replicación incompleta del ADN, pues aproximadamente 0.3% del ADN queda sin replicarse y sólo se replica una vez iniciada la meiosis. Por ejemplo en *T. vulgaris* la fase S en las células de la blástula se realiza en una hora, mientras que en la fase S premeiótica es de 200 horas. (Callan, 1972).

En algunos organismos se ha descrito el apareamiento de los cromosomas homólogos durante este periodo, el cual se pierde durante la fase S para posteriormente reestablecerse (Zickler y Kleckner, 1998).



Esquema 2.

Desarrollo de los ejes axiales y complejos sinaptonémicos durante el estadio de la profase I. Etapas de la profase I: L leptoteno; Z, cigoteno; P paquíteno; D diploteno. (Tomado de Solari, 1999).

### **Preleptoteno.**

Durante el preleptoteno, que para algunos autores corresponde al periodo G2 del ciclo celular, se observan las características de un núcleo en interfase. En general, durante esta etapa los cromosomas son todavía muy delgados y difíciles de observar (Paniagua *et al.*, 1993; Solari 1999). Otro planteamiento que se ha hecho respecto a la cromatina en etapas premeióticas es el concerniente con el modelo de orientación Rabl, el cual establece que el núcleo en interfase presenta dominios, los cuales se mantienen en las etapas previas a la meiosis, esto se ha descrito para algunos organismos (Fusell, 1987), aunque en el caso de las células de mamíferos esta orientación no existe (Scherthan *et al.*, 1996, 1998).

Curiosamente en algunas levaduras durante el preleptoteno los cromosomas homólogos ya se encuentran apareados, esto se ha visto en células en dispersión, a diferencia de los mamíferos en donde no existe dicho apareamiento (Anderson *et al.*, 1999).

### **Leptoteno.**

Durante el leptoteno los cromosomas son más delgados y largos que en la mitosis. En ellos se observan engrosamientos de distribución en forma de rosario y densa, denominados cromómeros. Corresponden a regiones de condensación del ADN e histonas. Los cromómeros van a permanecer hasta la constitución del cromosoma, pero entonces ya no se distinguirán bien, pues los diversos plegamientos de la cadena de nucleosomas van a hacer que queden cada vez más densas y destaquen menos. En los cromosomas totalmente configurados, algunos cromómeros parecen corresponder a las zonas teñidas con las técnicas de bandeado. Los cromosomas leptoténicos tienen una distribución bien definida. Frecuentemente, forman asas cuyos extremos se unen a la envoltura nuclear en un punto cercano al centrosoma. La cromatina aparece todavía laxa (Paniagua *et al.*, 1993; Solari, 1999).

Las cromátidas hermanas están estrechamente empaquetadas, extendiéndose a lo largo de los elementos axiales en una serie de bucles. Las asas de cromatina tienden a unirse en ciertas regiones de los elementos axiales que tienen un centro electrodenso. Los extremos de los elementos axiales relacionados con los telómeros se unen a la envoltura nuclear, constituyendo una estructura denominada placa de adhesión, que está acompañada por la redistribución de los poros nucleares, que pierden su distribución homogénea, tendiendo a acumularse en los sitios de fijación de los telómeros (Schuis-Schaefer, 1980; Swanson *et al.*, 1981). En muchos organismos, en este estadio puede verse una disposición peculiar denominada bouquet, en la que los extremos de los cromosomas están unidos a la envoltura nuclear en puntos cercanos a los centriolos. El resto del cromosoma se extiende como un lazo en el núcleo (Zickler y Kleckner, 1998). Se ha sugerido que una vez que se han organizado los dominios cromosómicos, los telómeros se adhieren y se agrupan a la envoltura nuclear para aumentar la probabilidad de encontrar a su homólogo, siendo por lo tanto un sitio importante para el apareamiento de los cromosomas meióticos (Scherthan *et al.*, 1994; Heyting, 1996). En el hombre los centrómeros son las primeras estructuras que se adosan a la envoltura nuclear siguiendo los telómeros (Heyting, 1996). Los centrómeros y telómeros contienen secuencias especiales de ADN que son esenciales para el

mantenimiento y la segregación de los cromosomas; por lo que se piensa que esto puede contribuir a la organización espacial de los cromosomas en el núcleo (Scherthan, *et al.*, 1994). En esta etapa del leptoteno se ha demostrado la presencia de la recombinasa Rad51 unida a filamentos de ADN por inmunomarcaje (Plug *et al.*, 1996).

### **Cigoteno.**

El inicio del cigoteno se distingue por la aparición de segmentos apareados de ejes simples, que constituyen el inicio de un complejo sinaptonémico (CS). El grado de condensación de los cromosomas aumenta en relación al estadio anterior, por lo que los cromosomas se observan más cortos en longitud y de mayor diámetro. Los dos homólogos no se unen durante el apareamiento, pues permanecen separados por un espacio de 100 nm aproximadamente. El apareamiento puede comenzar en cualquier sitio del cromosoma, pudiendo unirse por sus telómeros y continuar apareándose hacia el otro extremo, o iniciar en las regiones internas y avanzar hacia los extremos, o incluso llevarse a cabo de manera simultánea en varios puntos a lo largo de los cromosomas. En los organismos en que los cromosomas forman el bouquet, regularmente el apareamiento se inicia en estas regiones terminales (Paniagua *et al.*, 1993; Solari, 1999). Es muy probable, que en estas etapas de la profase meiótica, los cromosomas homólogos se identifiquen unos con otros y se recombinen ya que los cromosomas aún están relativamente extendidos (Kleckner, 1996). Se ha propuesto también que la iniciación de la sinapsis que se observa en esta etapa, esté mediada por la presencia de la recombinasa Rad51 (Plug *et al.*, 1996). El cigoteno dura hasta que se completa la sinapsis de los elementos axiales, con lo cual se inicia el paquiteno.

### **Paquiteno.**

Este es un estadio largo e importante, que está caracterizado por la permanencia del complejo sinaptonémico (CS) durante todo el periodo, en el cual se lleva a cabo el entrecruzamiento. Durante el paquiteno los cromosomas homólogos permanecen unidos, haciéndose progresivamente más cortos y gruesos mientras continúa la condensación. En el paquiteno medio la configuración de bouquet y el conglomerado de los poros nucleares se pierde. Hacia el final del paquiteno, esta espiralización y condensación progresivas pueden dar como resultado un acortamiento de los cromosomas a un cuarto o un sexto de la longitud que tenían en el leptoteno. (Paniagua *et al.*, 1993; Solari, 1999)

### **Diploteno.**

En el diploteno los CS se disocian; el espacio central se agranda y sus componentes desaparecen; por lo que la tendencia de los homólogos es alejarse lo más que se pueda excepto en la posición del quiasma; este punto representa el resultado final de los intercambios (recombinación) entre los cromosomas homólogos. El número y posición de los quiasmas varía en los organismos, sin embargo, existe por lo menos un quiasma por tétrada. En los meiocitos este estadio está caracterizado por una progresiva descompactación de la cromatina y la desaparición del CS. Los límites de los

## TESIS CON FALLA DE ORIGEN

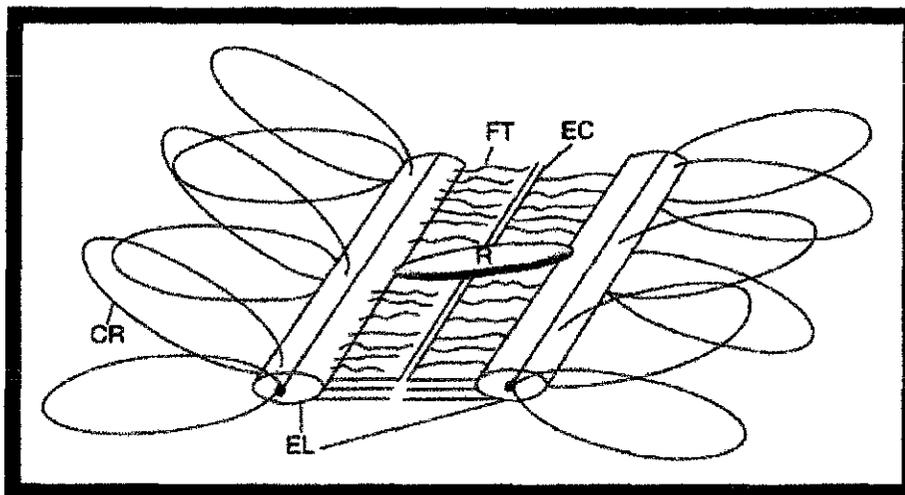
cromosomas son menos definidos y la cromatina en la región de los brazos laterales aparece como fibras esparcidas. Al mismo tiempo, se observa un incremento de estructuras que contienen ribonucleoproteínas (RNP), aparecen fibras pericromatinianas en el área de la cromatina extendida, y los gránulos pericromatinianos son escasos (Vázquez-Nin y Echeverría, 1976).

### **Diacinesis.**

En la diacinesis los cromosomas homólogos, nuevamente se vuelven a enrollar (Moens, 1994; Kleckner, 1996). En muchas especies en este estadio desaparece el nucleolo y las tétradas se distribuyen más o menos por igual dentro del núcleo. En algunos organismos los cambios que sufre el núcleo dan la apariencia de un núcleo interfásico.

### **II. 3. Ultraestructura del Complejo Sinaptonémico.**

El Complejo Sinaptonémico (CS) tiene una estructura general muy conservada a lo largo de la evolución, con pocas variantes. El CS fue descrito en 1956 con trabajos independientes de Moses (1956) y Fawcett (1956). El CS alcanza su máxima estructuración durante el paquitenio y desde el punto de vista morfológico es una estructura tripartita, constituida por elementos laterales, los elementos transversos y el elemento central. La morfología básica del complejo en sección longitudinal es la misma para todas las plantas y animales y está formada por tres elementos paralelos (Schmekel y Daneholt, 1995) (Esquema 3).



Esquema 3.

Estructura del complejo sinaptonémico. CR: cromatina; EL: elementos laterales; EC: elemento central; FT: filamentos transversales; R: nódulo de recombinación. (Tomado de Solar, 1999)

El CS se desarrolla por el alineamiento paralelo o sinapsis de los elementos axiales de los cromosomas homólogos. La primera manifestación de sinapsis entre los cromosomas homólogos es la conformación de un espacio de exclusión, posteriormente este espacio es ocupado por filamentos transversales entre los ejes que aun se encuentran a una distancia de 300 nm, tres

veces más que la distancia final. Esto sucede en uno o más lugares a los largo del eje y en cercanías a la envoltura nuclear (Moens *et al.*, 1998).

El CS mide aproximadamente 210 nm de ancho, los elementos laterales tienen un grosor de 60 nm aproximadamente y el espacio central tiene alrededor de 100 nm. Los elementos laterales están constituidos por un material amorfo y muy afín a las tinciones de plata y ácido fosfotúngstico, características que dependen de su contenido de proteínas básicas (Solari, 1999). Cada elemento lateral se observa como un filamento sencillo formado por la reunión de dos cromátidas hermanas; su ancho varía de acuerdo al organismo de que se trate, por lo que el rango está entre los 20 y 60 nm (Jones, 1973). En el espacio de apareamiento central se encuentran los filamentos transversales de 5 nm de diámetro aproximadamente, los cuales dan la apariencia de salir de los elementos laterales. El elemento central es paralelo a los elementos laterales, contiene muy poco o carece de ácidos nucleicos por lo que es resistente al tratamiento con ADNasa, sensible a proteasa e insoluble en altas concentraciones de NaCl (Solari, 1972). Su grosor es de 30 nm se localiza en la parte central del espacio de apareamiento, tiene menor densidad que los elementos laterales y mayor que los transversos (Moses, 1968; 1969; Esponda, 1981; Vázquez Nin *et al.*, 1993). Se ha observado que el CS está asociado con la envoltura nuclear. Los elementos laterales al unirse con la membrana interna se ensanchan adquiriendo forma de embudo, fácilmente visible en los cortes al microscopio electrónico. En espermatoцитos de ratón durante el paquiteno por medio de hibridaciones *in situ* se ha demostrado la presencia de secuencias de repetición telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub> en estas estructuras en forma de embudo, denominadas placas de adhesión asociadas a la envoltura nuclear (Zickler y Kleckner, 1998). En la zona donde se establece la unión con la envoltura nuclear se produce una protuberancia hacia el citoplasma. El espacio entre ambas membranas está atravesado por filamentos muy finos (4-6 nm) que van desde los elementos laterales hasta el citoplasma adyacente a la asociación (Moses, 1969; Esponda y Jimenez-Martín, 1973). También en diferentes especies se han descrito asociaciones del CS con el nucleolo (Esponda y Jiménez-Martín, 1975; Pathak y Hsu, 1979).

Carpenter en 1975 en ovocitos de *Drosophila melanogaster* describió los nódulos de recombinación, a que los que relacionó con el entrecruzamiento (Zickler y Kleckner, 1999). Estas estructuras se ubican sobre el elemento central del CS durante el paquiteno (y algunas veces durante el diploteno) mostrando diferente morfología según la especie, siendo en los insectos esféricas y prominentes, mientras que en el ratón se caracterizan por ser pequeñas y poco evidentes (Solari, 1999). Se han identificado dos clases de nódulos de recombinación de acuerdo al momento de su aparición en la profase meiótica como tempranos o tardíos, los primeros son abundantes, de tamaño variable y aparecen en cigoteno asociados a los elementos axiales que aún no se aparean. Los nódulos de recombinación tardíos aparecen asociados al complejo sinaptonémico durante el paquiteno cuando los homólogos están completamente en sinapsis. Los nódulos de recombinación tardíos nunca se han observado en ausencia de CS, además de encontrarse a lo largo de la eucromatina (Zickler y Kleckner, 1999). De manera general se ha propuesto que los nódulos de recombinación están relacionados con la sinapsis, la recombinación y la formación del quiasma (Solari, 1999; Zickler y Kleckner, 1999). También se ha sugerido que la frecuencia y distribución

de los nódulos de recombinación está en relación con el número de quiasmas y eventos de intercambio recíproco. Se han localizado recombinasas semejantes a la Rec A de *E. coli* en los nódulos de recombinación, por lo que se piensa están involucrados en procesos de reparación y recombinación (von Wettstein *et al.*, 1984; Glamann, 1986; Sherman *et al.*, 1992; Carpenter, 1994; Ashley *et al.*, 1995; Roeder, 1995). En espermatoцитos de rata y de ratón se ha demostrado la presencia de ADN en la zona donde se encuentran situados los nódulos de recombinación (Vázquez Nin *et al.*, 1993) lo que indica que probablemente participen en la recombinación.

#### **II 4. Citoquímica del Complejo Sinaptonémico**

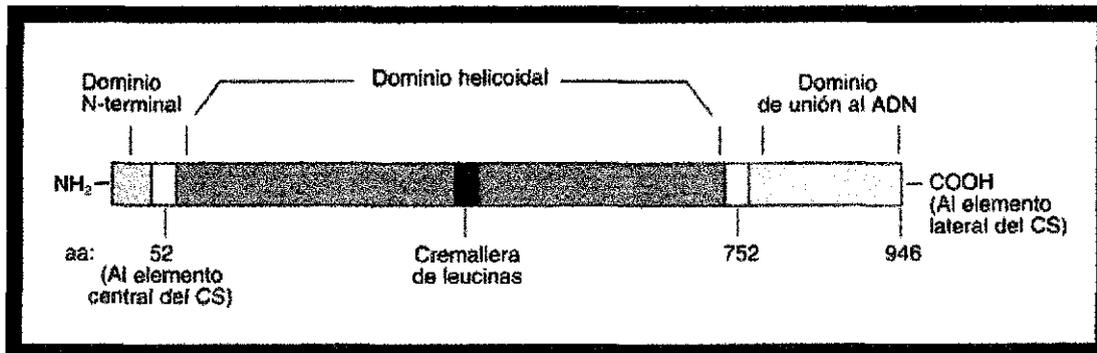
##### **II 4a) Proteínas**

La dificultad de separar CS de la matriz nuclear y de la cromatina, impidió por mucho tiempo reconocer los componentes de esta estructura. Por varios años hubo esfuerzos para identificar las proteínas del CS y aunque se obtuvieron resultados, muchos de ellos eran contradictorios (Zickler y Kleckner, 1999). La primera identificación de las proteínas a partir de CS purificados e intactos morfológicamente fue obtenida por Heyting y col. (1985).

En trabajos de investigación posteriores utilizando procedimientos de inmunolocalización se detectaron las proteínas propias del CS en animales y plantas (Moens *et al.*, 1987; Heyting *et al.*, 1988; Offenber *et al.*, 1991; Smith y Benavente, 1992; Anderson *et al.*, 1994). Investigaciones realizadas utilizando técnicas de inmunomarcado a nivel de microscopía electrónica han demostrado que la proteína del complejo sinaptonémico 1 (SCP1) está localizada en la región central del CS de mamíferos (Schmekel y Daneholt, 1995).

Las moléculas de SCP1 que se encuentran en los espermatoцитos de mamífero, están simétricamente organizadas dentro del CS. La SCP1 presenta un peso molecular de 125 kD, tiene tres dominios: uno corto y rico en prolina en la porción amino terminal que es globular, una región de 700 residuos de aminoácidos que constituyen una  $\alpha$ -hélice y un dominio carboxilo terminal de 240 aminoácidos, que contiene regiones serina/treonina seguido de un residuo de prolina, los que son comunes en una variedad de proteínas que se unen a ADN. La porción carboxilo terminal de la SCP1 descansa en la cara interna del elemento lateral, las moléculas salen desde el elemento lateral hasta la región central del CS terminando con su región amino terminal entre el centro del elemento central y el elemento lateral opuesto, por lo que los dominios amino terminal de la SCP1 se traslapan (Schmekel *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 1996; Moens *et al.*, 1998). La SCP1 puede tener interacciones no específicas con el surco menor del ADN (Schmekel y Daneholt, 1995). La proteína Syn1 se ha descrito en el hámster y es equivalente a la SCP1, presenta su dominio amino terminal en el centro del CS y el dominio carboxilo terminal hacia el elemento lateral (Esquema 4). Syn1 se liga fuertemente a varias secuencias de ADN y no se une a otras proteínas (Tarsounas *et al.*, 1997).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Esquema 4

Proteína Syn1 del hamster (SCP1 en rata)  
(tomada de Solari, 1999).

La proteína del complejo sinaptonémico 2 (SCP2) y la proteína del complejo sinaptonémico 3 (SCP3) son las principales integrantes de los elementos laterales del CS. Se ha visto que estas dos proteínas están presentes a partir del leptoteno y desaparecen en las células meióticas tardías (Pelttari *et al.*, 2001). La SCP2 tiene un peso molecular de 173 kD y se ha confirmado por métodos de inmunomarcación que su patrón de distribución es asimétrico (Schalk *et al.*, 1998; Moens *et al.*, 1998; Zickler y Kleckner, 1999). Estudios bioquímicos han mostrado que presenta sitios blanco a proteína-cinasa, lo que probablemente indica que esta proteína está involucrada en el ensamble y desensamble del CS. En condiciones *in vitro* se une al ADN en regiones ricas en adenina y timina. La SCP2 tiene similitudes con la Red1, que es una proteína específica de la meiosis en las levaduras (Zickler y Kleckner, 1999).

Aunque la SCP2 y la SCP1, son los principales constituyentes de los filamentos transversales, aun no se ha evidenciado que interactúen directamente, por lo que se ha sugerido la existencia de una proteína adicional que medie el enlace (Yuan *et al.*, 1998).

La proteína SCP3 parece ser el principal componente del elemento lateral en roedores y es esencial para la sinapsis de los cromosomas homólogos. La SCP3 se ensambla en delgadas fibras que se piensa son el fundamento estructural del elemento lateral del CS y que podría funcionar como una red en la que otras proteínas se fijan (Yuan *et al.*, 1998; Zickler y Kleckner, 1999). La SCP3 tiene varias formas, las dos principales muestran un peso molecular de 30 y 33 kDa, dentro de cada clase se ha visto que el grado de fosforilación varía a lo largo de la profase meiótica I. La proteína tiene características básicas, su terminación carboxilo terminal tiene regiones *coiled-coil* (arrollada en espiral) y un dominio amino terminal no-helicoidal (Zickler y Kleckner, 1999). Con ayuda de anticuerpos desarrollados contra las regiones amino y carboxilo terminal de la SCP3, se ha determinado su localización en el elemento lateral. La región amino terminal se ubica en el lado interno del elemento lateral del ratón, mientras que la porción carboxilo terminal en la región externa del elemento lateral (Zickler y Kleckner, 1999). Las fibras de SCP3 están estructuralmente relacionadas con filamentos intermedios, pues se ha reconocido que su dominio carboxilo terminal promueve la interacción proteína-proteína *in vitro*, regulando la unión al ADN

de los ejes de las cromátidas, cohesión de las cromátidas hermanas, sinapsis y recombinación (Yuan *et al.*, 1998; Tarsounas *et al.*, 1999; Zickler y Kleckner, 1999). Estudios recientes han puesto de manifiesto la presencia de la SCP3 en células germinales primordiales masculinas y femeninas, lo cual se ha interpretado como una preparación de las células primordiales para entrar en meiosis (Di Carlo *et al.*, 2000).

En espermatoцитos del hámster se ha descrito a la Cor1 (equivalente a la SCP3) situada en los elementos axiales desde el leptoteno hasta el diploteno y que permanece en el cinetocoro hasta la metafase II (Zickler y Kleckner, 1999). La Cor1 está constituida por 234 aminoácidos y muestra un peso molecular de 30 kDa, es rica en glutamina (12%) especialmente en el extremo carboxilo, con 34% de aminoácidos hidrofóbicos y un predominio básico, tiene parecido con las proteínas de filamentos intermedios (Solari, 1999). Cor1 no tiene regiones de unión a ADN, por lo que su unión tal vez esté mediada por otra proteína del eje. Existen evidencias que señalan que la proteína Cor1 tiene interacciones homotípicas *in vivo* (Tarsounas *et al.*, 1997). Se piensa que la Cor1 puede estar involucrada no sólo en el ensamble del CS sino también en la unión de las cromátidas hermanas (Tarsounas *et al.*, 1997).

Además de las proteínas del CS descritas en células de mamífero, se han definido proteínas equivalentes en otros organismos como las levaduras se han descrito proteínas que se localizan en el CS, algunas de las cuales tienen funciones equivalentes a las descritas en mamíferos. A continuación mencionamos algunas de ellas.

Zip1 fue la primera proteína descrita en el CS de *S. cerevisiae*, y se le considera equivalente a la SCP1 de mamíferos. Se ha visto que es una proteína filamentososa que contiene un dominio largo enrollado en forma de barra con regiones de dimerización y una estructura globular en las regiones carboxilo y amino terminal. La Zip1 se ensambla en una estructura altamente ordenada y las evidencias experimentales sugieren que es una molécula que actúa como "cierre" uniendo los cromosomas homólogos colocándolos en aposición (Haber, 1998; Sym *et al.*, 1993). El exceso de producción de esta proteína causa la aparición de estructuras similares a los policomplejos que se observan en los espermatoцитos de los insectos (Sym y Roeder, 1995). En mutantes de zip1 la frecuencia del entrecruzamiento se ve reducida a la mitad sin una reducción en el número total de conversiones génicas (Haber, 1998).

Se ha descrito que Zip 1 está en los CS y no en los elementos axiales. Los mutantes de Zip1 no forman CS (Sym *et al.*, 1993; Sym y Roeder, 1995). Zip1 es necesaria para que tenga lugar la sinapsis, la recombinación y la interferencia regional de entrecruzamiento (*crossing-over*) (Storlazzi *et al.*, 1996; Sym y Roeder, 1994).

Otro componente que se ha delineado en el CS de levaduras es la proteína Zip2, que se ha evidenciado se requiere para la iniciación de la sinapsis, por lo que se ha vinculado con el inicio de la recombinación y la sinapsis de los cromosomas homólogos (Zickler y Kleckner, 1999). La Zip2 tiene una estructura semejante a la de Zip1, pues forma a hélices anfipáticas, lo que sugiere la constitución de dímeros enrollados de la misma manera que los filamentos de miosina y los filamentos intermedios (Storlazzi *et al.*, 1996).

En levaduras se han referido proteínas que cumplen funciones equivalentes a la SCP3 y SCP2 de

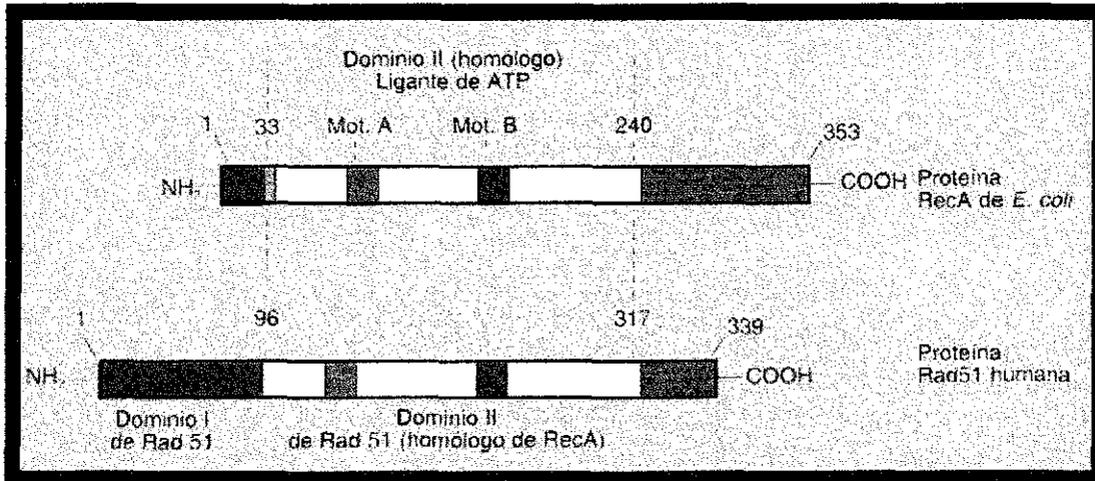
mamíferos y que también se encuentran en los elementos axiales y laterales del CS. La Hop2 y Red1 descritas en *S. cerevisiae*, son proteínas necesarias para el ensamble y función del CS. Hop1 es específica de la meiosis, tiene un peso molecular de 70 kD. Se ha demostrado que contiene regiones de dedos de zinc que se sabe promueven la unión al ADN dúplex, en secuencias ricas en GC más que a secuencias ricas en AT (Zickler y Kleckner, 1999). La proteína Red1 es también exclusiva de la meiosis y presenta un peso molecular de 95 kD. Las evidencias experimentales que la Red1 es indispensable para que se conformen los ejes axiales y los elementos laterales, así como para que los niveles de recombinación sean óptimos (Storlazzi *et al.*, 1996; Zickler y Kleckner, 1999). La Mek1 es otra proteína descrita en levaduras, tiene un peso molecular de 56.8 kDa y se ha mostrado que co-inmunoprecipita con la Red1 y Hop1. La Mek1 se localiza en sitios a lo largo de los cromosomas desde el leptoteno hasta la metafase I observándose que tiene homología con las proteína-cinasas de serina-treonina (de los Santos y Hollingsworth, 1999; Zickler y Kleckner, 1999). Las mutaciones en los genes de la Hop1, Red1 y Mek1 reducen la recombinación genética de manera notable en las levaduras.

Además de las proteínas detalladas en los ejes y elementos laterales del CS, se han determinado otro tipo de proteínas que se han descrito en levaduras (Pelttari *et al.*, 2001) y mamíferos (Ejipe *et al.*, 2000) conocidas como complejos de cohesinas, los cuales se requieren para el apareamiento de los cromosomas, la segregación y la recombinación en células meióticas (Pelttari *et al.*, 2001). El complejo de cohesinas en las levaduras está constituido por un conjunto de múltiples subunidades (Smc1p, Smc3p, Scc1p y Scc3p) que se requieren para mantener unidas a las cromátidas hermanas durante la mitosis. Se ha demostrado que la Smc3p y la versión en la meiosis de la Scc1p denominada Rec8p tienen la función de mantener unidas a las cromátidas a lo largo de la profase meiótica I, además de participar en el establecimiento del elemento axial y la recombinación recíproca. Smc3p y Rec8p colocalizan en el eje cromosómico independientemente de si hay sinapsis o no. Durante el paquiteno van desapareciendo lentamente hasta quedar únicamente en la región del centrómero en donde permanecen hasta la anafase II (Klein *et al.*, 1999).

En las células meióticas de mamífero con deficiencia en SCP3, las cohesinas son capaces de promover la sinapsis entre cromosomas homólogos a pesar de que no exista la formación del elemento axial, por lo que se sugiere que el complejo de cohesinas podría participar en el apareamiento y sinapsis de los homólogos (Ejipe *et al.*, 2000; Pelttari *et al.*, 2001). Además de las proteínas que se han enumerado con una participación estructural en el CS, se han localizado proteínas que participan de manera directa en el proceso de recombinación meiótica. En diversos eucariontes se han detallado proteínas homólogas a la recombinasa RecA de *Escherichia coli*, como la Rad51 (Esquema 5), Dmc1 y Lim15 en mamíferos (Bishop *et al.*, 1992; Shinohara *et al.*, 1993; Rockmill *et al.*, 1995; Terasawa *et al.*, 1995; Passy *et al.*, 1999). Estas proteínas similares a RecA (Loseva *et al.*, 1996) y más específicamente la Rad51 (Ashley *et al.*, 1995; Ikeya *et al.*, 1996), están presentes en asas de cromatina durante el leptoteno y se incorporan a los elementos laterales de CS en cigoteno y se asocian a los nódulos de recombinación meióticos. En diploteno Rad51 se encuentra en los quiasmas y Lim15 se asocia a las regiones

## TESIS CON FALLA DE ORIGEN

teloméricas en la profase tardía (Ikeya *et al.*, 1996).



Esquema 5.

Estructura de las proteínas RecA de *E. coli* y Rad51 humana. Ambas proteínas comparten el dominio II, con las regiones A y B, de unión a ATP. El dominio I y el carboxilo terminal son diferentes (Tomado de Solari, 1999).

Rad51 y Dmc1 se han encontrado en cromosomas de la meiosis de mamíferos (Plug *et al.*, 1996; Barlow *et al.*, 1997; Tarsounas *et al.*, 1999) y se ha visto tienen el mismo patrón de distribución en extractos de espermatoцитos de ratón en estados sucesivos de la profase 1 (Tarsounas *et al.*, 1997).

En el lirio estas proteínas se ubican como sitios discretos a los nódulos de recombinación tempranos en los cromosomas durante el leptoteno y cigoteno (Terasawa *et al.* 1995; Anderson *et al.*, 1997). Existen evidencias indirectas que sugieren que la presencia de proteínas de recombinación y reparación en los nódulos tempranos pueda estar relacionada con la conversión génica más que con el *crossing-over* (Carpenter, 1994; Kleckner, 1996). Sin embargo, hasta el momento no es clara la relación entre las evidencias experimentales y el fenómeno de reconocimiento de las secuencias homólogas localizadas a larga distancia.

### II 4b) Ácidos nucleicos

En estudios citoquímicos a nivel ultraestructural, se ha demostrado la presencia de ARN, de ADN o de ambos en el CS (Esponda y Stockert, 1971; Welsch, 1973; Vázquez Nin y Echeverría, 1976; Latos-Bielenska *et al.*, 1990; Vázquez Nin *et al.*, 1993). El ADN es un componente importante de los elementos laterales, pero es escaso o está ausente en el espacio central. Sin embargo se le ha hallado en los nódulos de recombinación (Vázquez Nin *et al.*, 1993). Estas observaciones sugieren que la parte central del CS es el lugar donde se produce el intercambio de cromátidas. Investigaciones en las que se analizó el ADN aislado del CS (Pearlman *et al.*, 1992; Karpova *et*

al., 1995) se demostró que existe una alta frecuencia de secuencias *LINE/SINE* y repeticiones en tándem de CA. Estas secuencias son parecidas a las que posiblemente se encuentran cerca de los puntos de ruptura que dan lugar a la recombinación (Satyanarayana y Strominger, 1992). En cuanto a la existencia de ARN Vázquez Nin y Echeverría (1976) por medio de métodos de tinción preferencial evidenciaron que los ejes axiales y elementos laterales contienen gran cantidad de RNP durante las primeras etapas de la profase meiótica, sin embargo esta positividad disminuye notablemente durante el paquiteno avanzado hasta estar ausente en el diploteno. A pesar del avance que existe en el estudio de la profase meiótica, aún existen interrogantes en cuanto a la ubicación y participación del ADN y ARN durante el alineamiento, apareamiento y sinapsis de los cromosomas homólogos.

### **II.5 Síntesis de Ácidos Nucleicos durante la profase meiótica I**

Monesi y col. (1978) realizaron los primeros trabajos sobre la síntesis de ARN durante la espermatogénesis. Esta investigación sobre la síntesis del ARN en espermatoцитos y espermátidas evidenciaron una actividad inusual de los transcritos que se presume participan en las etapas posteriores de la meiosis en la síntesis de las proteínas. Ellos observaron que una fracción importante de transcritos del paquiteno no eran liberados del núcleo hasta el diploteno. Utilizando métodos de autorradiografía se ha detectado síntesis de ARN durante la profase meiótica I en diversos organismos (Eddy y O'Brien, 1998). Cuando las células alcanzan la metafase, esta incorporación cae a un nivel no detectable (Taylor, 1959; Monesi, 1964)

Algunos estudios que han abordado la síntesis de ARN han demostrado que esta es baja durante el estado de preleptoteno y casi imperceptible durante el leptoteno, cigoteno y el paquiteno temprano. A diferencia de lo que sucede en el paquiteno medio y tardío, en donde existe un incremento notorio en la incorporación de uridina tritiada; esto ha permitido detectar niveles altos de síntesis de ARN en los espermatoцитos del ratón en paquiteno (Eddy y O'Brien, 1998). Estudios de autorradiografía ultraestructural en diversos organismos han confirmado la elevada síntesis de ARN en espermatoцитos en paquiteno, así como la incorporación de uridina tritiada en las etapas tempranas de la profase meiótica (Kierzenbaum y Tres, 1974b), además de evidenciar que muchos de los ARN sintetizados durante el paquiteno son acumulados en el núcleo y posteriormente son liberados en el citoplasma durante la primera división meiótica (Monesi, 1954, 1965). La síntesis de ARN que se ha determinado por medio de autorradiografía ultraestructural en los espermatoцитos del humano y del ratón durante el paquiteno, se ha localizado en autosomas. Esta localización sugiere que la síntesis del ARN es predominantemente de ARN heterogéneo nuclear (ARNhn), precursor del ARNm (Eddy y O'Brien, 1998).

Asimismo en los espermatoцитos de humano y de ratón se ha registrado la síntesis de ARN nucleolar que alcanza un pico durante el cigoteno, lo que evidencia la síntesis de ARN ribosómica durante la meiosis (Kierzenbaum y Tres, 1974a).

Evidencias experimentales señalan que existe la síntesis de una variedad de moléculas de ARN de bajo peso molecular, de alrededor de 125 nucleótidos, se sintetiza durante la profase meiótica. Estas moléculas parecen inducir cambios en la conformación de la cromatina permitiendo el

acceso de las nucleasas (Hotta y Stern, 1981).

La inhibición de la síntesis del ARN, en leptoteno o cigoteno, produce una permanencia de los espermatoцитos en cigoteno. Si la inhibición se realiza en paquiteno, las células no pueden seguir más allá de la profase I, por lo que se sugiere que el ARN es esencial para el desarrollo meiótico (Sakaguchi *et al.*, 1983).

En la meiosis la replicación del ADN sucede durante la interfase en el periodo S (fase S premeiótica), como en cualquier interfase previa a la mitosis. Sin embargo, la síntesis premeiótica del ADN tiene ciertas peculiaridades, es muy larga y además no es completa, dado que una cantidad aproximada al 0.3% del ADN total queda sin replicarse y sólo lo hace ya iniciada la meiosis. La síntesis del ADN durante la meiosis se lleva a cabo durante la etapa del cigoteno y en la etapa del paquiteno. En el lirio se demostró que la replicación durante la fase S es sólo del 99.8 al 99.9% (Stern, 1993). La síntesis de ADN restante ocurre durante el cigoteno y el paquiteno. Esta síntesis de ADN durante el cigoteno (ADNc) es del 0.1 a 0.3 %, y se ha relacionado con el apareamiento cromosómico. Estudios en células en cigoteno que incorporaron timidina tritiada, muestran el ADN marcado en los elementos laterales, lo que apunta a que el ADN recién sintetizado funciona como sitios de unión para la formación del CS (Kurata e Ito, 1978). En el paquiteno la síntesis del ADN, denominado ADN paquiténico (ADNp) se da en un porcentaje del 0.2% y a diferencia del ADNc no es consecuencia de un retraso en la replicación, más bien se le ha relacionado con fenómenos de replicación-reparación involucrados con el proceso de recombinación. Cuando se inhibe parcialmente la síntesis del ADN, se observa la fragmentación de los cromosomas en cigoteno y paquiteno, lo que sugiere que la integridad del cromosoma depende exclusivamente del ADN (Stern, 1993).

El ADN que se sintetiza en paquiteno está formado por secuencias moderadamente repetidas y altamente conservadas en diferentes plantas (Friedman *et al.*, 1982). El ADN sintetizado en cigoteno es mucho menos conocido. Sin embargo, las evidencias autorradiográficas de alta resolución indican que el ADN sintetizado en esta etapa se incorpora a los ejes axiales y enseguida pasa a los elementos laterales del CS (Kurata e Ito, 1978).

## **II.6 Alineamiento y Apareamiento de los cromosomas meióticos**

El cómo los homólogos encuentran su pareja es un misterio hasta el momento y se han propuesto varios modelos que tratan de explicar como se reconocen los cromosomas homólogos. La meiosis involucra al menos cuatro diferentes clases de apareamiento (Kleckner, 1996). 1.- Durante la fase S meiótica, la duplicación de la doble hélice de ADN genera dos copias que permanecen unidas hasta la división meiótica II. Este apareamiento se explica por las proteínas de cohesión (cohesinas) que mantiene a las cromátidas hermanas unidas durante este período (Miyazaki y Orr-Weaver, 1994; Sekelsky y Hawley, 1995). 2.- Durante el leptoteno, cada par duplicado busca su homólogo, para que así al inicio del cigoteno la mayoría de los cromosomas estén organizados en paralelo con su pareja a una distancia entre 300 a 1000 nm; por lo que el término alineamiento puede ser utilizado para describir el mecanismo que crea esta asociación a distancia. 3.- Durante el cigoteno se comienza a ensamblar el CS con la cercanía de los homólogos, hasta que en paquiteno

los homólogos se encuentran a una distancia de 100 nm (Loidl, 1994; Hasenkampf, 1996). Por lo que el término sinapsis puede ser empleado para esta estrecha asociación de los cromosomas homólogos. 4.- La recombinación tiene lugar entre los dos dúplex de ADN que descansan a unos nanómetros uno de otro; el apareamiento preciso depende de la complementaridad que exista entre la bases en las hebras individuales de ADN (Kowalczykowski y Eggleston, 1994). Actualmente es aceptado que el alineamiento y apareamiento o sinapsis son procesos diferentes (Moses, 1968; Loidl, 1990; Hawley y Arbel, 1993; Kleckner, 1996; Scherthan *et al.*, 1996). La mayoría de los modelos para explicar el alineamiento meiótico plantean la existencia de movimientos que generan contactos accidentales entre los homólogos (Loidl, 1990; Kleckner, 1996). En términos generales, el reconocimiento debe involucrar interacciones de largo alcance, donde los homólogos "toquen o sientan" otros cromosomas. Muchos modelos involucran el apareamiento temprano con proteínas filamentosas (Comings y Riggs, 1971; Holliday, 1977; Chandley, 1986).

Existen otras propuestas en las que se ha sugerido que el alineamiento meiótico puede ser la continuación de organizaciones somáticas previas de la cromatina en interfase. En algunos eucariontes como las levaduras y dípteros, los cromosomas homólogos son adyacentes en el núcleo en interfase de células somáticas (Wandall y Svendsen, 1985; Scherthan *et al.*, 1994; Weiner y Kleckner, 1994). Sin embargo, algunas investigaciones han demostrado que no hay proximidad de los cromosomas homólogos en las espermatogonias de hombre y de ratón (Scherthan *et al.*, 1996). Aunque existiera algún tipo de ordenamiento premeiótico en la organización de los cromosomas homólogos, parece ser que en la mayoría de los eucariontes la disminución de la distancia entre los cromosomas homólogos y su alineamiento tiene lugar poco antes del apareamiento final también llamado sinapsis (Zickler y Kleckner, 1999).

Se ha propuesto que la búsqueda de homología involucra la participación de macromoléculas, probablemente proteínas, ADN y/o ARN a largas distancias. Dawe (1998) y Cook (1997) han propuesto a las proteínas como un sistema que tiene la función de llevar a cabo la atracción inicial. Sin embargo, la atracción debe llevarse a cabo después de que el reconocimiento de homología se ha dado entre las secuencias o regiones de los cromosomas. Se ha sugerido que proteínas semejantes a los priones puedan formar fibrillas semiestables que unan segmentos de cromosomas homólogos (Sybenga, 1999). La mayoría de los autores consideran que el ADN está involucrado en la búsqueda inicial, reconocimiento y apareamiento de los cromosomas homólogos (Loidl, 1990; Moens, 1994; Kleckner, 1996; Sybenga, 1999). Se ha demostrado la presencia de hebras sencillas de ADN como resultado de las rupturas de doble cadena justo antes de la recombinación y la reparación del ADN, siendo esto un componente de la maquinaria de intercambio genético (Drapkin *et al.*, 1994), sin embargo, el estudio de genotipos mutantes en levaduras indica que las rupturas de doble cadena no son requeridas para la formación de conexiones de apareamiento (Weiner y Kleckner, 1994).

Utilizando histoquímica y microscopía electrónica se ha probado la presencia de ARN en el elemento lateral del CS (Wolstenholme y Meyer, 1966). El uso de procedimientos de tinción preferencial para ribonucleoproteínas (RNPs) en microscopía electrónica ha evidenciado la presencia de ARN

en el elemento lateral del CS y en los elementos axiales del leptoteno y cigoteno (Esponda y Stockert, 1971; Vázquez-Nin y Echeverría, 1976), es más las RNPs han sido también localizadas en las fibrillas uniendo los elementos axiales en cigoteno (Vázquez-Nin y Echeverría, 1976). A pesar de que se ha puesto de manifiesto la presencia de ARN desde la etapa del leptoteno no se ha establecido de manera concreta su participación en la profase meiótica.

## **II. 7 Significado citofisiológico del Complejo Sinaptonémico**

Se ha observado que existe correspondencia entre la posición del CS y el apareamiento de los homólogos en el paquiteno. Además, cuando se comparan las imágenes de la microscopía óptica y electrónica de la misma célula, se ve cómo el CS se sitúa precisamente entre los homólogos apareados en la región en que el apareamiento es más estrecho y donde se supone que tiene lugar la recombinación. En el cigoteno aparece por primera vez el CS, el cual se encuentra durante todo el paquiteno y desaparece al iniciarse el diploteno, cuando finaliza el estrecho apareamiento. Por ello, tanto la localización del CS como la sincronización en su aparición y desaparición con el inicio y finalización del apareamiento estrecho, indican una íntima relación con el apareamiento y recombinación (Moses, 1968; Gillies, 1975; Moens y Pearlman, 1988; Kabak *et al.*, 1992). Una serie de investigaciones ha establecido que el CS se encuentra en todas las células que se dividen por meiosis (Sotelo, 1969; von Wettstein *et al.*, 1984) y existen evidencias de estudios ultraestructurales clásicos que demuestran la existencia universal del CS en la profase meiótica. Debido a este hecho, a su propia morfología y a sus cambios entre leptoteno y paquiteno, se le ha relacionado con el apareamiento, la recombinación y la segregación entre los homólogos (Sotelo, 1969).

El CS se ha considerado como representación de la consumación del apareamiento además de estar relacionado con algunos aspectos importantes del proceso meiótico como: mantener unidas a las cromátidas hermanas, estabilizar el quiasma hasta la anafase 1, ubicar a los nódulos de recombinación entre las cromátidas homólogas adecuadamente alineadas, y producir localmente interferencia en el entrecruzamiento (Moens, 1994; Maguire, 1995; Kleckner, 1996). Sin embargo, poco se conoce acerca del proceso de reconocimiento temprano que involucra la búsqueda y hallazgo de las secuencias homólogas, la estabilización de las conexiones interhomólogas y la formación del CS.

*En todas las células eucarióticas con meiosis normal y recombinación, el estrecho apareamiento de los cromosomas durante la profase (cigoteno-paquiteno) se ha correlacionado con la aparición del CS.*

El papel del CS ha provocado controversia, pues existen evidencias que muestran que el apareamiento mediado por el CS no asegura la recombinación (Stack, 1973; Rasmussen, 1977), esto se ha interpretado en el sentido de que el CS pudiera ser necesario pero no suficiente para la recombinación. Hay datos experimentales que han puesto en duda que el CS sea necesario para el apareamiento y recombinación de la meiosis. Por ejemplo en levaduras la recombinación se puede llevar cabo sin la formación de CS (Bähler *et al.*, 1993), así como la formación del CS puede mediar la asociación de cromosomas heterólogos (Jenkins y Okumus, 1992).

A pesar de estas demostraciones, existen también evidencias experimentales que sugieren la *relación del CS con el proceso de apareamiento, recombinación y eventualmente la segregación*. Por ejemplo se ha demostrado la asociación de cromosomas homólogos con la exclusión de los no homólogos durante el cigoteno en más del 99% de los eucariontes con reproducción sexual (von Wettstein *et al.*, 1984). También se ha comprobado que estas asociaciones son tan específicas, que cuando existe una inversión grande, esto provoca la formación de un asa (Batanian y Hulten, 1987). La presencia de los nódulos de recombinación tardíos en la región central del CS (Carpenter, 1975; Carpenter, 1979a, b) que son probablemente la expresión morfológica de complejos enzimáticos en la región donde ocurre la recombinación génica, pues se ha visto que el número de nódulos de recombinación tardía en los CS es muy semejante al de quiasmas, expresiones citológicas de la recombinación recíproca (Solari, 1999).

### III. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Los procesos que dan origen al CS involucran la búsqueda de homología de secuencias o regiones de cromosomas. Este proceso es muy específico y puede estar antecedido o seguido por la aproximación inespecífica de los cromosomas mediada por los telómeros y/o los centrómeros. La etapa final de este proceso es la formación de la estructura proteica del CS entre regiones homólogas o no (heterólogos), que estén cercanas. Esto es un mecanismo inespecífico que explica muchas de las aparentes excepciones al papel funcional del CS en la mayoría de los eucariontes. Como aún se desconocen los mecanismos específicos que producen el alineamiento, al apareamiento y la sinapsis de los cromosomas homólogos en el presente proyecto se propuso estudiar a través de la microscopía electrónica las estructuras que podrían estar relacionadas con estos procesos durante la profase meiótica I.

#### **Hipótesis**

Consideramos que los ácidos nucleicos median el reconocimiento locus-específico de los cromosomas homólogos y que las proteínas intervienen en la generación de los movimientos de apareamiento, para permanecer como andamiaje una vez que se ha constituido el CS. Si esta hipótesis es cierta, podemos hacer una serie de afirmaciones corroborables experimentalmente: Se encontrará ARN y/o ADN (o ambos) en la región donde se produce el reconocimiento de homología locus-específico antes que los ejes axiales se sitúen en paralelo para conformar los brazos laterales del CS durante las fases anteriores al paquiteno. La formación de hebras monocatenarias de ácido nucleico es indispensable en el reconocimiento de complementariedad de bases. Acabado el reconocimiento y formado el CS durante el paquiteno, los ácidos nucleicos podrán desaparecer en esas estructuras.

## IV. OBJETIVOS

### **Objetivo general**

Localizar los ácidos nucleicos ARN y ADN, en los núcleos de las células germinales premeióticas (espermatogonias tipo B), y durante la profase meiótica I (espermatoцитos I).

### **Objetivos específicos**

1. Localizar el ARN y el ADN en espermatogonias tipo B y en los espermatoцитos primarios de testículo de cobayo y rata mediante citoquímica ultraestructural e hibridación *in situ*, en las etapas de la profase meiótica clásicamente descritas, así como también en las transiciones entre etapas de la profase I.
2. Realizar reconstrucciones tridimensionales de las regiones de reconocimiento de homología y de la zona de apareamiento final y formación del CS.
3. Determinar por autorradiografía óptica si la síntesis de ARN y su salida al citoplasma está relacionado con el establecimiento del CS y el apareamiento.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron testículos de adultos jóvenes de cobayo y de rata en todos los experimentos.

### V.1 Procesamiento del material biológico para microscopía electrónica

Las muestras de testículo de cobayo y de rata se trataron con diferentes procedimientos de fijación, deshidratación e inclusión dependiendo de la metodología empleada para su análisis al microscopio electrónico. Estos distintos procesamientos se describen a continuación.

#### V.1.1 Procesamiento estándar

Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos pH 7.3 0.2 M por una hora a temperatura ambiente, se enjuagaron en el mismo amortiguador, se deshidrataron con alcoholes etílicos graduales y se incluyeron en resina epóxica (Glycyde ether 100, Merck, Darmstadt, Germany).

#### V.1.2 Fijación hipotónica y tratamiento con ARNasa

Las muestras se fijaron en condiciones hipotónicas de acuerdo al método desarrollado por Puvion-Dutilleul y Puvion (1980) modificado por Vázquez-Nin y col (1989). Las muestras de túbulos seminíferos de testículos de rata se fijaron en paraformaldehído al 1% con photo-flo 200 (Kodak, Rochester, NY, USA) disuelto en una solución de sacarosa al 0.1M a pH 9 ajustado con una solución de borato de sodio al 0.1M. La fijación se llevó a cabo durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente el material se dividió en dos partes. A la primera parte se le dio una postfijación en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos pH 7.3 0.2 M por una hora a temperatura ambiente, se enjuagó en el mismo amortiguador y se deshidrató a 4°C para su inclusión en LR White (Electron Microscopy Science).

Las muestras restantes se trataron con ARNasa al 2% (Sigma, St. Louis Missouri; USA) disuelta en amortiguador de Tris-HCl pH 6.5 a diferentes tiempos que fueron desde los 15 minutos a las cuatro horas de incubación todas ellas a 37°C. Posteriormente se enjuagaron con amortiguador de fosfatos, se deshidrataron en alcoholes graduales y se incluyeron en LR White (Electron Microscopy Science). Se utilizaron muestras de túbulo seminífero de rata como testigos negativos sin el tratamiento de ARNasa al 2%, incubándolas con agua destilada de acuerdo a los tiempos y la temperatura establecidos anteriormente. Subsecuentemente este material se deshidrató en alcoholes graduales y se incluyó en LR White (Electron Microscopy Science).

#### V.1.3 Procesamiento para inmunolocalización

Las muestras de túbulos seminíferos de cobayo se fijaron en paraformaldehído al 2% en amortiguador

de fosfatos 0.15 M pH 7.3 a 4°C por una hora. Las muestras se enjuagaron en el amortiguador de fosfatos y se deshidrataron en metanol gradual (50%, 60%, 70%, 80%, 90%) y se incluyeron en Lowicryl K4M (Polysciences Inc). La polimerización se llevó a cabo utilizando luz ultravioleta a -20°C.

#### **V.1.4 Procesamiento para hibridación *in situ***

Muestras de túbulo seminífero de cobayo y de rata se fijaron en paraformaldehído al 2% en PBS, así como con paraformaldehído al 4% + glutaraldehído al 0.2% en PBS a 4°C por una hora. Posteriormente el material se enjuagó en el mismo amortiguador, se deshidrató en metanol gradual (50%, 60%, 70%, 80%, 90%) y se incluyó en Lowicryl K4M (Polyscience Inc). La polimerización se llevó a cabo utilizando luz ultravioleta a -20°C.

#### **V.1.5 Corte**

De todo el material obtenido de acuerdo a los diferentes procedimientos citados anteriormente, se procedió a realizar los cortes semifinos, obteniéndose de un micrómetro de espesor, los que se tiñieron con azul de toluidina-bórax. Se estudiaron en el microscopio de luz las asociaciones celulares presentes en los túbulos seminíferos y se compararon con las descripciones clásicas del ciclo espermatogénico del cobayo (Clermont, 1960) y de la rata (Leblond y Clermont, 1952). Una vez obtenida la etapa del ciclo espermatogénico de interés se hicieron cortes ultrafinos de aproximadamente 60 nm de grosor en un ultramicrotomo Reichert Ultracut R y se montaron en rejillas de cobre, oro o níquel cubiertas con formvar. Los cortes seriados se recogieron en anillos de Sjöstrand, de acuerdo al método descrito por Wettstein y Graver (1973). Otros cortes fueron levantados en rejillas de oro sin membrana.

#### **V.1.6 Métodos de contraste**

Se emplearon diferentes métodos de contraste para el material de los túbulos seminíferos de cobayo y rata. Para determinar la ultraestructura de manera general se aplicó el método de contraste general de acetato de uranilo y citrato de plomo. Para teñir el ADN se recurrió al método de tinción preferencial para ADN del PTA o ácido fosfotungstico (Vázquez-Nin *et al.*, 1973; Esquivel *et al.*, 1987). Para contrastar las RNP se utilizaron el método de tinción preferencial de Bernhard (1969) para RNP, así como el método de terbio (Biggiogera y Fakan, 1998).

Los cortes ultrafinos que se recogieron en rejillas de oro sin membrana se usaron para el método de tinción específica para ADN de amina de osmio (Cogliati y Gautier, 1973) modificado por Vázquez-Nin y col. (1995).

#### **V.2 Reconstrucción tridimensional**

Las series se tiñeron con la tinción de contraste general de acetato de uranilo y citrato de plomo, con el método de tinción preferencial para RNP (Bernhard, 1969), y con el método de tinción preferencial para ADN del PTA o ácido fosfotungstico (Vázquez Nin *et al.*, 1973; Esquivel *et al.*, 1987).

Las muestras se observaron en un microscopio electrónico Carl Zeiss EM10 operando a 80 kV. Las espermatogonias tipo B y los espermatoцитos en las diferentes fases de la profase meiótica I, fueron fotografiados desde el inicio de la serie hasta el final.

La reconstrucción tridimensional se llevó a cabo en dibujos realizados en papel celofán en los que se fueron trazando las estructuras de cada una de las células que se siguieron en las series obtenidas. Al tener toda la secuencia de las fotografías de las estructuras en el papel celofán se hicieron coincidir los dibujos para determinar el arreglo y disposición de los elementos copiados.

### **V.3 Inmunolocalización**

La inmunolocalización se llevó a cabo en condiciones de "post-inclusión" de acuerdo al protocolo descrito por Biggiogera y col (1989) Vázquez-Nin y col (1995) con los siguientes anticuerpos:

- 1.- Anti-ARN polimerasa II, es un anticuerpo policlonal de conejo (Kimm y Dahmus, 1986)
- 2.- Anti-ADN, es un anticuerpo monoclonal de Progen (Heidelberg, Germany)
- 3.- Anti-RNPhn (C8V) Jones et al., 1980.
- 4.- Anti-SM anticuerpo monoclonal que reconoce un epitope común a los snRNPs (U1, U2, U5 y U6) que participan en el splicing (Y12, Lerner et al., 1981; Gerke y Steitz 1986)
- 5.- Anti-trimetil-guanosin-cap (R1131) Oncogene, New York, USA.

(ver diagrama de flujo 1).

### **V.4 Hibridación *in situ***

Para llevar a cabo la hibridación *in situ* se utilizó como sonda el ADN genómico de células de hígado y bazo de cobayo y de rata de acuerdo al protocolo de López Velázquez y col (1998). Mediante el uso de ADN genómico como sonda marcado con biotina o digoxigenina se pueden localizar los ARN en hibridaciones *in situ* a nivel ultraestructural.

A continuación se describe la extracción del ADN genómico, la marcación del ADN genómico y la hibridación *in situ* ultraestructural.

#### **V.4.1 Extracción del ADN genómico**

La extracción del ADN genómico se realizó de acuerdo al protocolo de López Velázquez y col (1998). Se obtuvieron el hígado y el bazo de cobayo y de rata, los cuales inmediatamente fueron cortados por congelación en un criostato American Optical a  $-17^{\circ}\text{C}$  para obtener cortes de 20 micrómetros de grosor. Se utilizaron aproximadamente 30 cortes por cada extracción. La extracción del ADN genómico se llevo a cabo incubando los cortes durante toda la noche en amortiguador SDS-proteinasa K a  $42^{\circ}\text{C}$  en agitación constante. Posteriormente se empleó fenol-cloroformo. El ADN se precipitó con NaCl 1N y etanol 100% a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El ADN fue resuspendido en amortiguador TE. La concentración obtenida del ADN fue de 5 mg/ml.

La integridad del ADN fue analizada con geles de agarosa al 1% (Figura 1).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

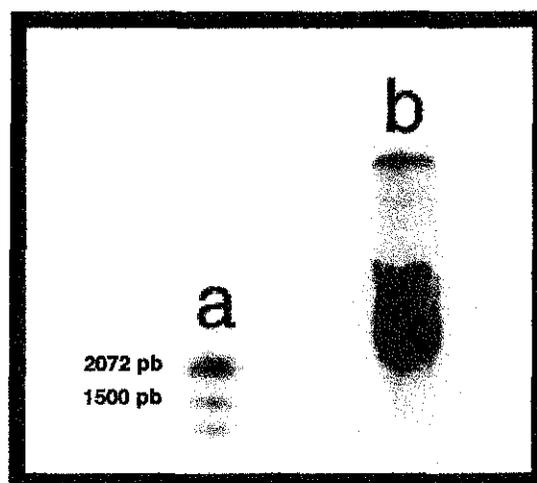


Figura 1.

Muestra gel de agarosa al 1%. Carril (a) marcador de peso molecular, (b) ADN genómico de hígado de cobayo

La concentración del ADN genómico fue medida por absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. Se consideró como pureza óptima cuando la relación  $OD_{260}/OD_{280}$  dio como resultado 1.8.

#### V.4.2 Marcaje del ADN genómico de cobayo y de rata

El ADN genómico de hígado y bazo de cobayo y de rata se marcó con biotina y digoxigenina. El marcado inicialmente se realizó con biotina para las hibridaciones *in situ*, sin embargo posteriormente se recurrió al marcado con digoxigenina, debido a que se obtuvieron mejores resultados en las hibridaciones *in situ* y un menor ruido de fondo.

Para marcar con biotina se empleó el método de *nick translation* utilizando el sistema de marcaje de BioNick (Gibco BRL) para incorporar nucleótidos biotinilados (Langer *et al.*, 1981). En la reacción se adicionaron dNTP's 0.2mM, 0.1mM de bio 14-dATP, 0.5 unidades/ml de ADN polimerasa I de *Escherichia coli* y 0.0075 unidades/ml de ADNasa I de páncreas bovino. Se marcó aproximadamente 1mg de sonda por cada reacción, dejando incubar a 16°C durante 2 1/2 horas. El tamaño de la sonda se controló con el tiempo de digestión en la reacción de marcado por el *nick translation*, además de verificar el tamaño de la sonda mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El tamaño de la sonda de ADN genómico después de este tiempo de incubación fue de 100 a 500 pb.

El ADN genómico marcado con digoxigenina se realizó por el método de *nick translation* manejando el sistema de marcaje de DIG-Nick Translation Mix (Boehringer Mannheim, Germany). En la reacción se adicionaron ADN polimerasa I, ADNasa I; 0.25 mM dATP, 0.25 mM dCTP, 0.25 mM dGTP, 0.17 mM dTTP y 0.08 mM de DIG-11-dUTP.

Se marcó aproximadamente 1mg de sonda por cada reacción, dejando incubar a 16°C durante 2 1/2 horas. El tamaño de la sonda se controló con el tiempo de digestión en la reacción de marcado por el *nick translation*, además de verificar el tamaño de la sonda mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El tamaño de la sonda de ADN genómico después de este tiempo de incubación estuvo entre los 100 y 500 pb.

#### V.4.3 Hibridación *in situ* ultraestructural con ADN genómico de cobayo y rata

Es muy importante señalar que la hibridación *in situ* con el ADN marcado con biotina o digoxigenina se efectuó sin desnaturalizar el ADN de la muestra (cortes en las rejillas de oro) con el propósito de localizar al ARN de las células en los elementos fibrilares o granulares. Cuando se empleó el ADN biotinilado se utilizó el siguiente protocolo: a 2 ml de ADN genómico marcado con biotina por el método de *nick translation* se le agregaron 2 ml de ARNt de *E. coli* (1mg/ml) y 10 ml de formamida al 100% (mezcla de reacción 1). La sonda se desnaturalizó durante 4 minutos a 90°C e inmediatamente se colocó en hielo para evitar la re-naturalización de los fragmentos de ADN. A la mezcla de reacción 1 se le agregó la mezcla de reacción 2 que contenía: 4 ml de albúmina de suero bovino (BSA) al 5%, 4 ml de sulfato de dextrán al 50% y 2 ml de 20XSSC. La reacción de hibridación se realizó en cortes ultrafinos montados en rejillas de oro cubiertas con formvar que se flotaron sobre la mezcla de hibridación (mezcla 1 + mezcla 2). La reacción de hibridación se incubó a 42°C toda la noche en una cámara húmeda y se reveló con una solución de estreptavidina acoplada a partículas de oro coloidal de 15 nm de diámetro (ver diagrama de flujo 2).

Cuando se hizo uso del ADN con digoxigenina se utilizaron 2 ml de ADN genómico marcado por el método de *nick translation* y se les agregó 2 ml de ARNt de *E. coli* (1mg/ml) y 10 ml de formamida al 100% (mezcla de reacción 1). La sonda se desnaturalizó durante 4 minutos a 90°C e inmediatamente se colocó en hielo para evitar la re-naturalización de los fragmentos de ADN. A la mezcla de reacción 1 se le adicionó la mezcla de reacción 2 que contenía: 4 ml de albúmina de suero bovino (BSA) al 5%, 4 ml de sulfato de dextrán al 50% y 2 ml de 20XSSC. La reacción de hibridación se realizó en cortes ultrafinos montados en rejillas de oro cubiertas con formvar que se flotaron sobre la mezcla de hibridación (mezcla 1 + mezcla 2). La reacción de hibridación se incubó a 42°C toda la noche en una cámara húmeda. El revelado de la marca se efectuó empleando una cadena de anticuerpos secundarios. El primer anticuerpo secundario utilizado fue un anticuerpo contra digoxigenina desarrollado en conejo. Posteriormente se usó un anticuerpo IgG desarrollado en cabra contra conejo. Esta IgG fue reconocida por medio de una proteína A acoplada a partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro. Para amplificar el marcado se aplicaron dos anticuerpos más, un GAR IgG acoplado a partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro y un RAG IgG acoplado a partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro (ver diagrama de flujo 3).

Para confirmar la naturaleza de la señal de ARN, algunos cortes se trataron con ribonucleasa 2mg/ml (tipo IA, Sigma) en 1 mM de amortiguador trietanolamina-ácido acético, pH 7.3 por 8 horas a 37 °C.

Una vez realizada la hibridación *in situ* las preparaciones se contrastaron con acetato de uranilo al 2.5% por 5 minutos y citrato de plomo al 0.4% por 1 minuto. Finalmente se observaron en un microscopio electrónico Carl Zeiss EM10.

**Autorradiografía óptica.**

Pequeños fragmentos de testículo de rata se incubaron a 37°C en medio mínimo esencial de Eagles suplementado con 100mCi/ml de 5,6 uridina tritiada (Amersham, Piscataway, NJ,USA; 48 Ci/mmol) por 30 ó 120 min. Se dieron pulsos cortos para determinar el rango de transcripción, y los pulsos largos se emplearon para estimar el rango de marcado del núcleo y del citoplasma. Todas las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2% en amortiguador de fosfatos por 1 hora a 4°C, posteriormente se enjuagaron con el mismo amortiguador, se deshidrataron en acetona y se incluyeron en resina epóxica.

Se realizaron cortes semifinos de un micrómetro de grosor los cuales se cubrieron con emulsión Ilford K2 . Las preparaciones se expusieron por 20 días a 4°C. El revelado se realizó con revelador D19 (Kodak) a 20°C por 3 minutos. Las preparaciones se enjuagaron en agua y se fijaron con fijador Kodak por 10 minutos; se tiñieron con azul de toluidina-bórax por 1 minuto a 60°C y se observaron en un microscopio Zeiss equipado con una cámara de TV. Las imágenes se analizaron con el programa Imagenia 5000, el cual nos permitió contar la cantidad de marca en el núcleo y el citoplasma considerando el área de cada uno de estos compartimentos. El cociente obtenido de la cantidad de marca por unidad de área nos dio la densidad numérica en cada uno de los compartimentos considerados.

**Diagrama de flujo 1**

En cámara húmeda flotar la rejilla en NGS diluido en PBS (1:100) por 3 minutos



Incubar en el anticuerpo primario diluido en PBS-Tween-BSA (PBS-Albumina de suero bovino (BSA) 1mg/ml. Tween 20 al 0.05%) por 18 horas a 4°C



Enjuague con PBS-BSA-Tween por goteo



Lavados con PBS por goteo



Flotar en PBS por 15 minutos



Incubar en NGS diluido en PBS (1:100) por 3 minutos



Incubar 30-60 minutos en el anticuerpo secundario acoplado con oro de 10 nm diluido en PBS (1:10 a 1:20) a temperatura ambiente



Lavar en PBS por goteo



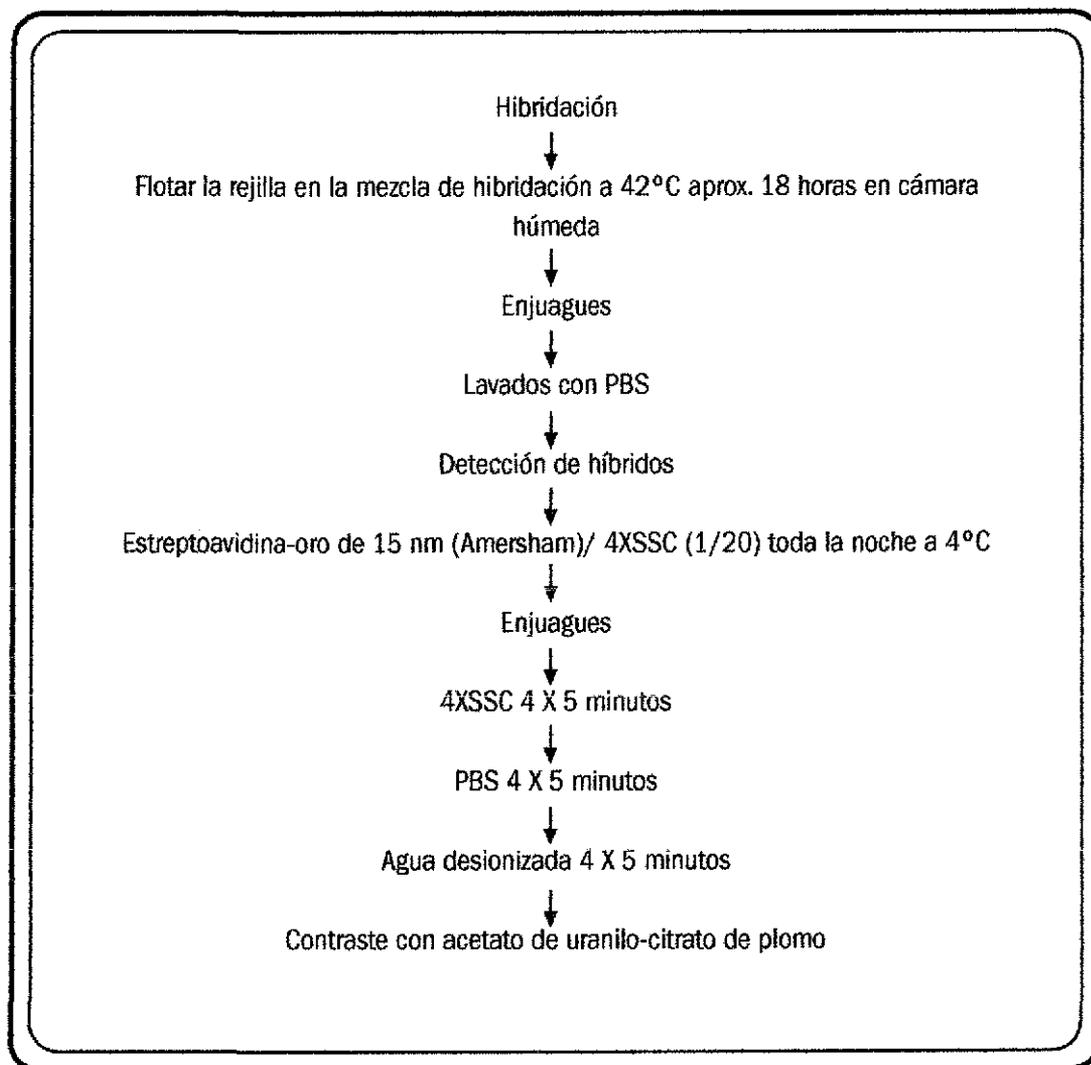
Flotar en PBS por 15 minutos

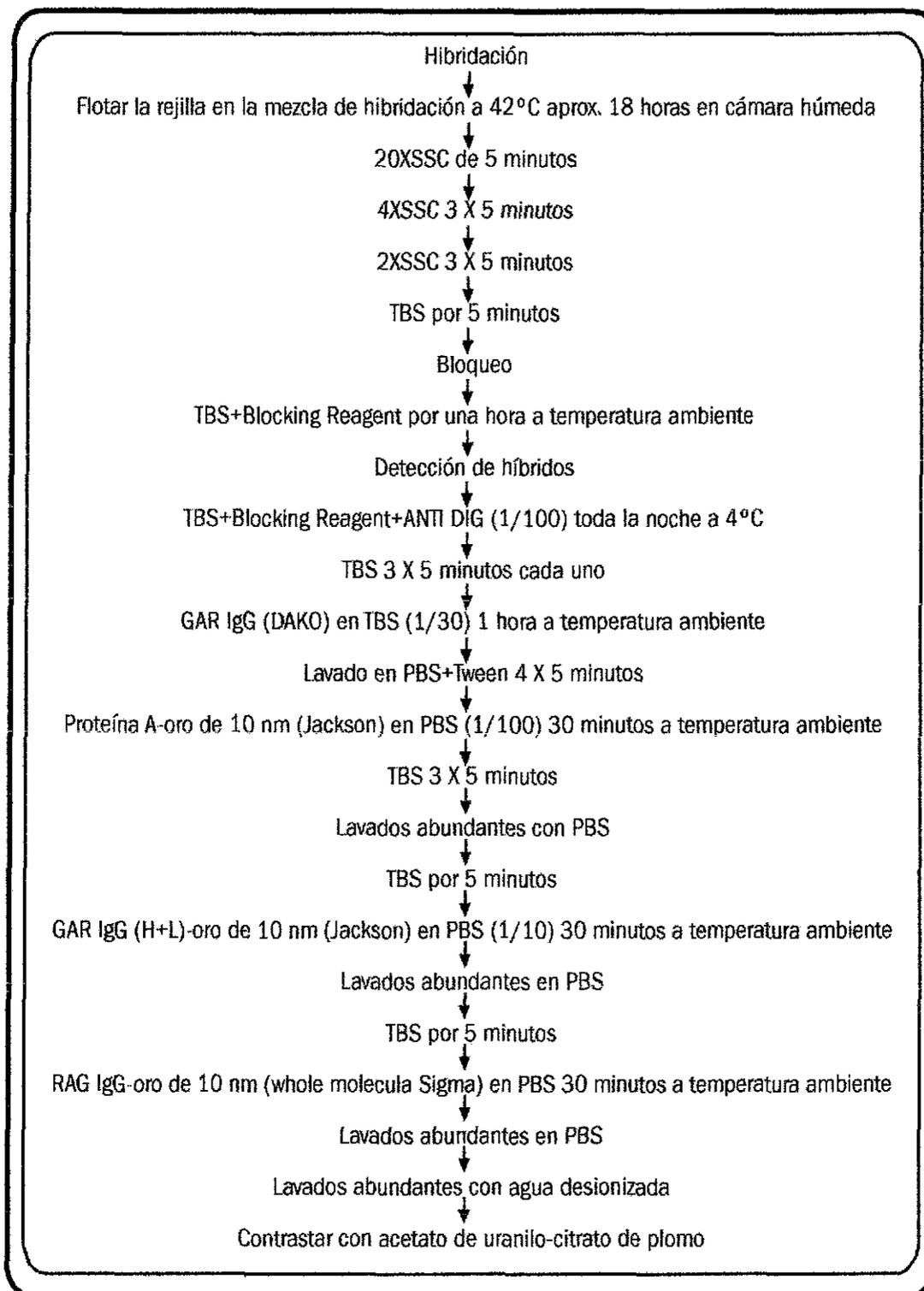


Enjuagar en agua desionizada por 15 minutos



Contraste con acetato de uranilo-citrato de plomo

**Diagrama de flujo 2**

**Diagrama de flujo 3**

## VI. RESULTADOS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### VI.1 Ultraestructura de las etapas de la profase meiótica I.

#### Espermatogonias tipo B

Los cortes seriados de espermatogonias tipo B contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, muestran todos los componentes estructurales de los núcleos en interfase (Figura 2).

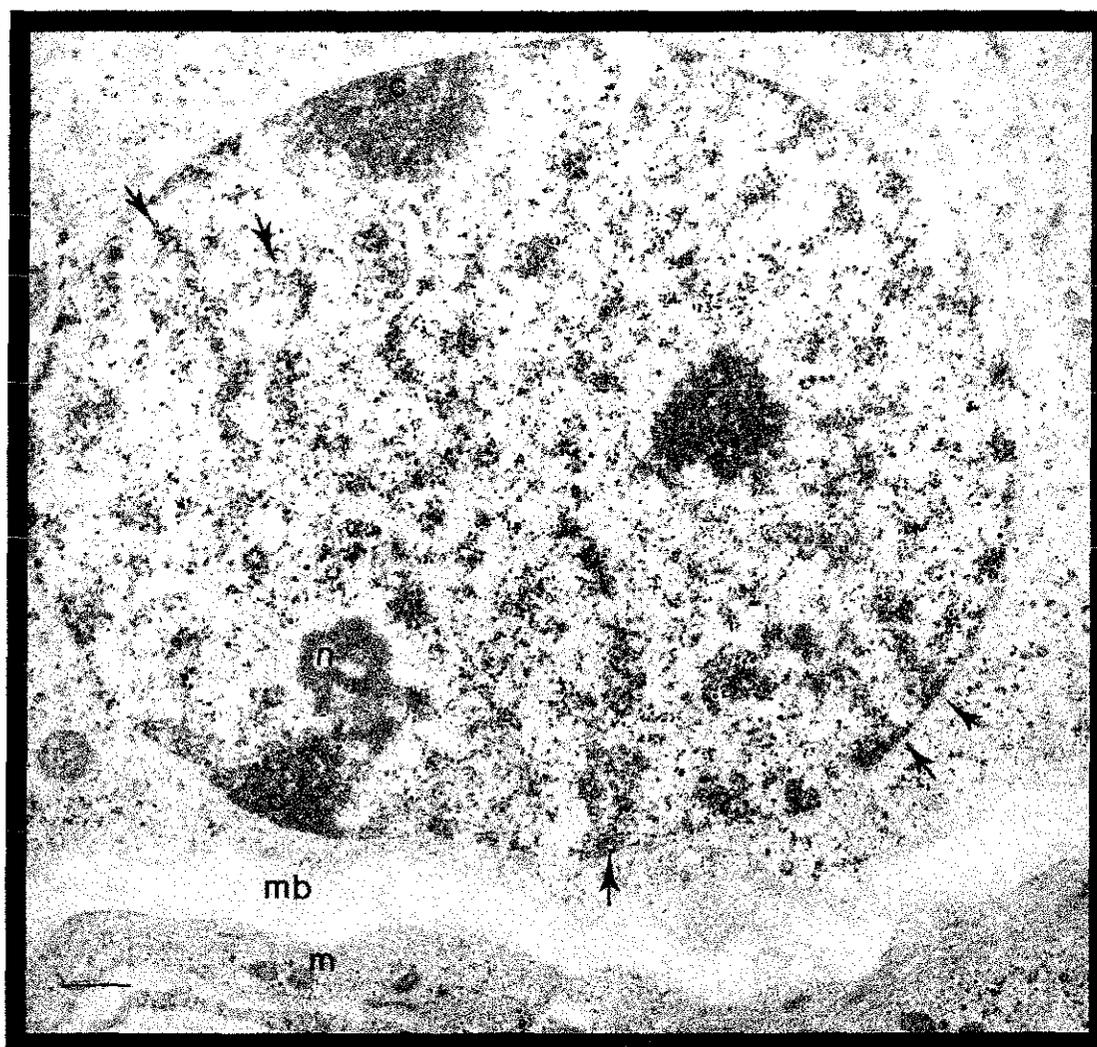


Figura 2

Espermatogonia B que muestra sucesiones de cromatina semicompacta y laxa (flecha) que recorren largas extensiones del volumen nuclear. Se observan cúmulos de cromatina compacta (c) adosados a la envoltura nuclear, así como el nucleolo. En el citoplasma de la espermatogonia tipo B existen escasos ribosomas y poco retículo endoplásmico. La espermatogonia está descansando sobre la lamina basal (mb). Se advierte una célula miode (m) del túbulo seminífero del testículo de cobayo. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 500 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Nuestras observaciones demuestran que existen dos arreglos muy particulares de la cromatina. Uno de ellos está formado por sucesiones de grumos de cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear, mientras hacia el interior del núcleo, los cúmulos de cromatina son semicompactos teniendo siempre continuidad con cromatina laxa, por lo que es notoria la alternancia de cromatina semicompacta y cromatina laxa. Esta alternancia en la disposición de la cromatina se proyecta hacia el interior del núcleo recorriendo largas distancias, ocupando hasta la mitad del diámetro nuclear (Figura 3).

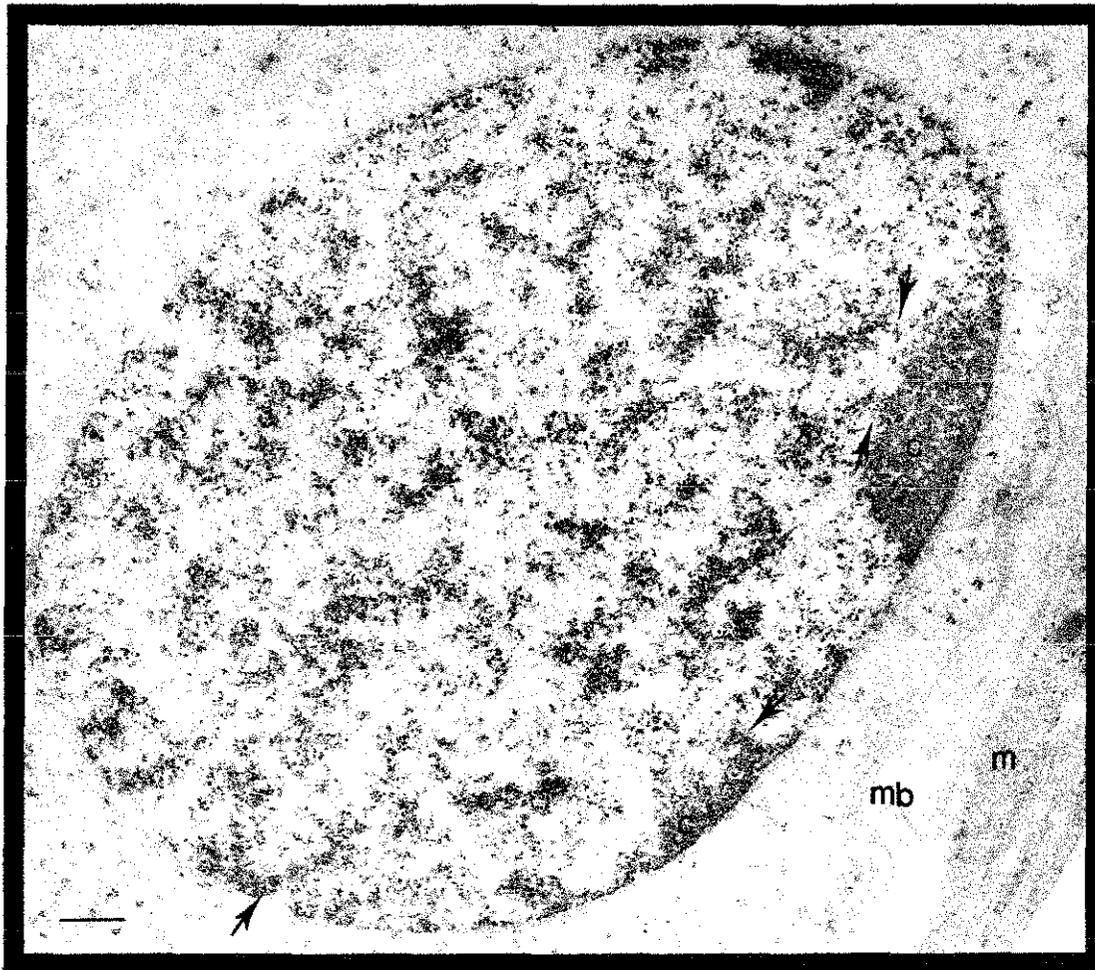


Figura 3.

Espermatogonia tipo B. Se observan las alternancias de cromatina compacta y laxa (flecha) que parten de cúmulos de cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear (c), no se nota la presencia de gránulos pericromatinianos. Se nota en el citoplasma de la espermatogonia tipo B escaso retículo endoplásmico y pocas ribosomas. La espermatogonia está descansando sobre la lamina basal (mb). Se advierte una célula hijode (m) del túbulo seminífero del testículo de cobayo. Contraste general de acetato de uranio-citrato de plomo. Barra 500 nm

Otro de los arreglos evidenciados en las espermatogonias tipo B, que constituye una característica particular, es la presencia de estructuras de cromatina laxa alineadas en paralelo. El eje principal y las ramas laterales de los ordenamientos en paralelo de cromatina laxa están

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

compuestos por estructuras tipo lampbrush o plumuladas, de las cuales parten asas de diferentes tamaños. Estas asas dependiendo de su longitud es posible observarlas en un corte, ya que su longitud no rebasa los 60 nm que es el grosor del corte. Sin embargo algunas de estas asas son de mayor longitud, por lo que se mostraron como filamentos o ramificaciones largas que parten del eje principal de la estructura plumulada. Los cortes seriados evidenciaron que los ordenamientos pueden ocupar dominios del espacio nuclear o pueden estar presentes en un sólo corte (Figura 4).

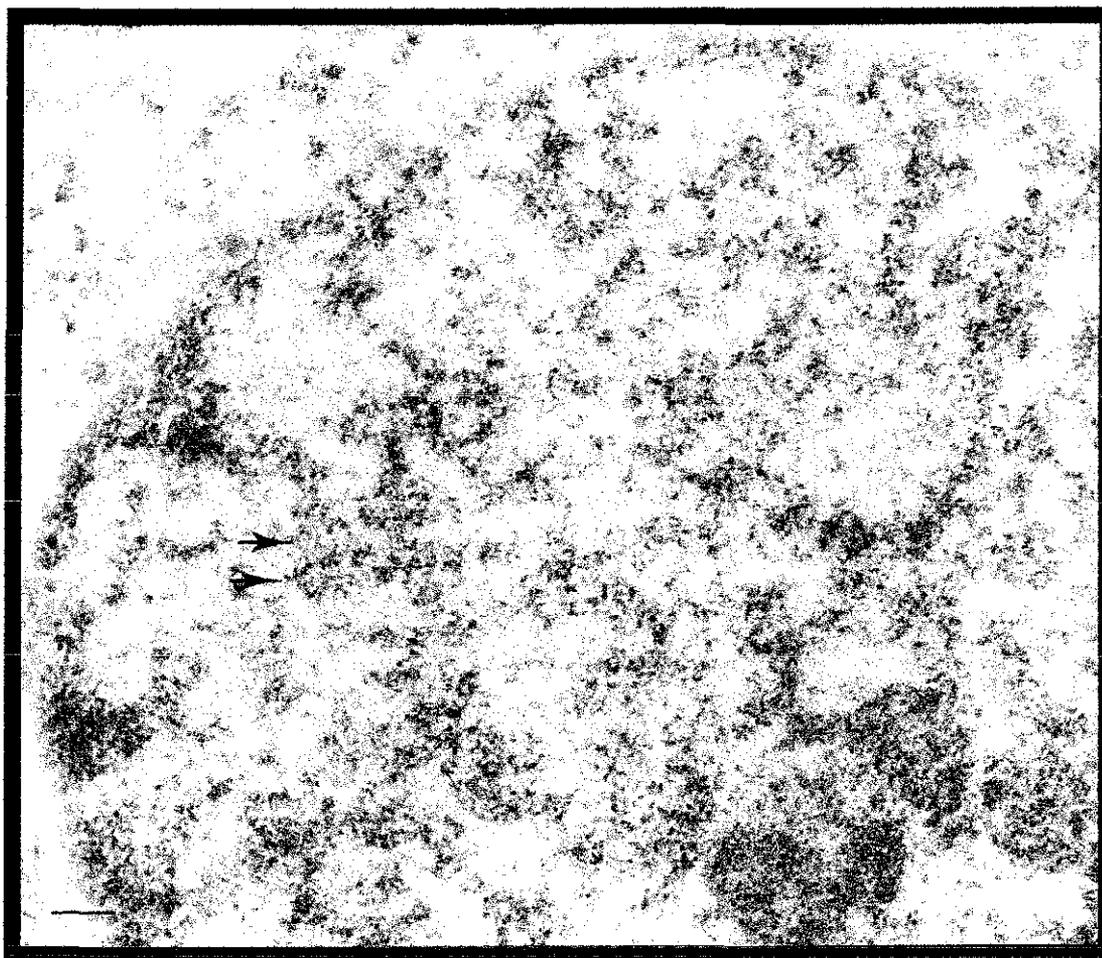


Figura 4.

Espermatogonia tipo B que muestra estructuras plumuladas (flecha) organizadas en paralelo de las que parten asas de diferentes tamaños. Estos ordenamientos pueden ocupar un tercio o más del volumen nuclear o estar presentes en un solo corte. Note que no se observan gránulos pericromatinianos en el nucleoplasma. Contraste general acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 250 nm.

Otra característica de las espermatogonias tipo B es la presencia de más de una ramificación de cromatina laxa saliendo de los grumos de cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear, dichas ramificaciones se dirigen hacia el centro del núcleo. En algunas regiones la cromatina semicompacta que se alterna con la cromatina laxa se puede encontrar agrupada

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

de manera paralela (Figuras 3 y 4).

Con la técnica de tinción específica de amina-osmio para ADN y la inmunolocalización para ADN, se pudo demostrar que estos arreglos característicos de las espermatogonias de tipo B se encuentran constituidos por ADN con diferentes grados de compactación, así como que los plumulados están formados por filamentos de cromatina (Figura 5).

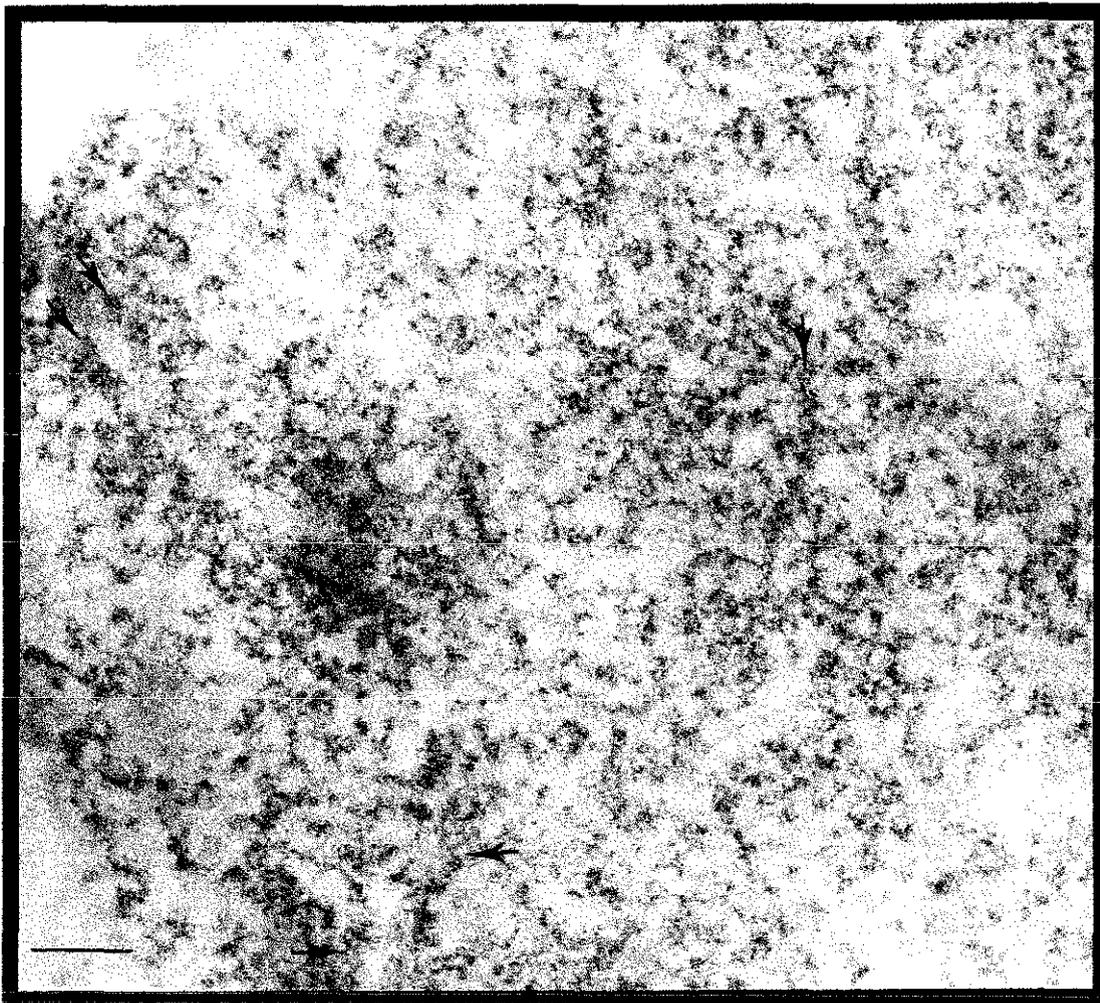


Figura 5.

Espermatogonia tipo B contrastada con el método de tinción de amina de osmio específico para ADN. Las estructuras plumuladas (flecha) están conformadas por ADN. Algunas de ellas se observan alineadas en paralelo o de manera aislada en el núcleo. Barra 250 nm

Las estructuras plumuladas están asociadas con fibrillas y gránulos de RNP que se tiñen con el método preferencial de acetato de uranilo-EDTA-citrato de plomo. Las estructuras tipo lampbrush o plumuladas se presentan como estructuras EDTA positivas que tienen ramificaciones muy finas que parecen tocarse cuando dos de ellas se encuentran alineadas en paralelo (Figura 6).

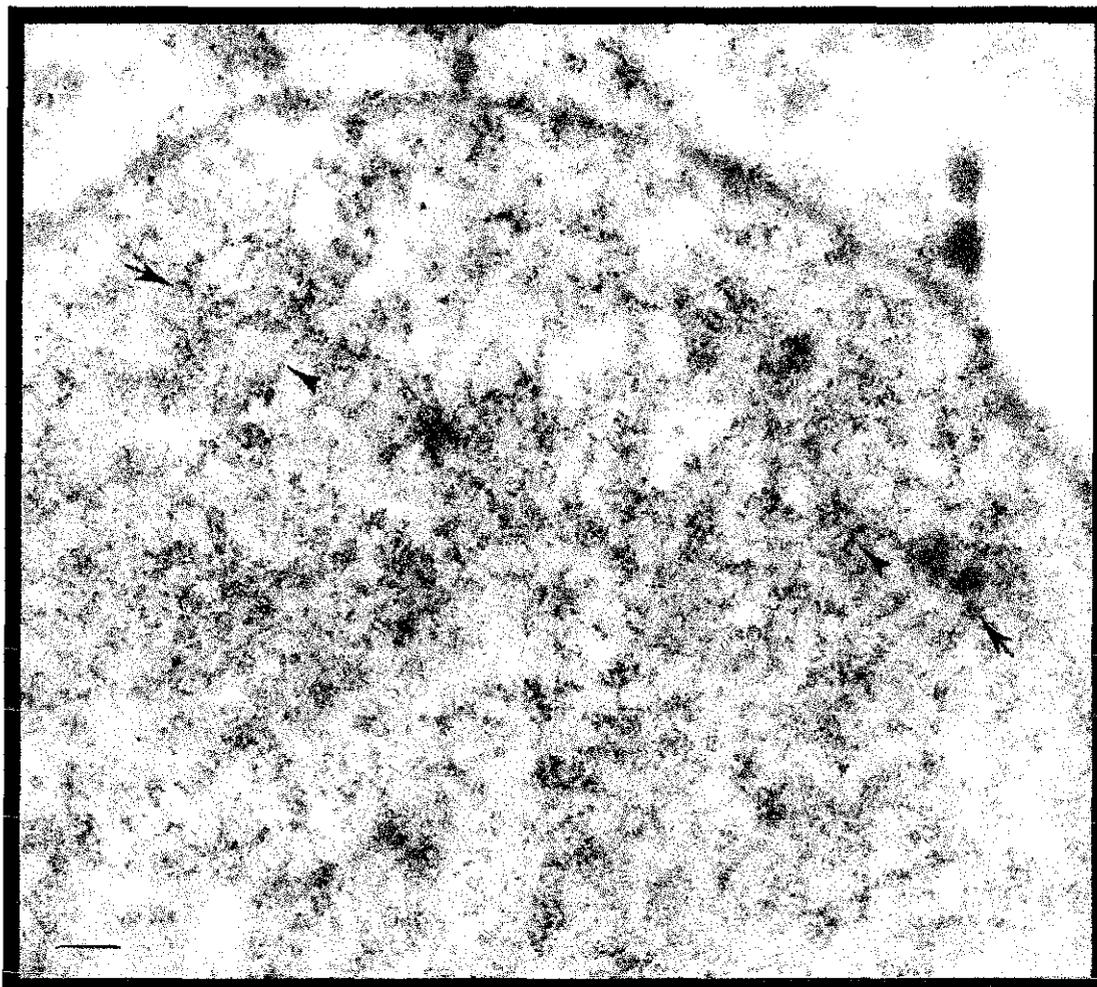
**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Figura 6.

Espermatogonia tipo B contrastada con el método preferencial para RNP. Se muestra la distribución del ARN en las estructuras plumuladas (flecha). Existen gránulos y fibras de RNP asociadas a las estructuras plumuladas. No se aprecia la presencia de gránulos pericromatinianos (cabeza de flecha). Barra 25 nm.

Otro dato muy interesante, es la escasa presencia de gránulos pericromatinianos en el interior del núcleo en esta etapa (Figuras 2 y 3).

**Preleptoteno**

Durante la interfase meiótica o preleptoteno, los racimos de cromatina compacta en contacto con la envoltura nuclear son progresivamente más pequeños y el nucleolo migra a la periferia del núcleo. La descompactación de la cromatina da lugar a estructuras plumuladas largas de cromatina laxa asociada con fibrillas de RNP y gránulos (Figura 7).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

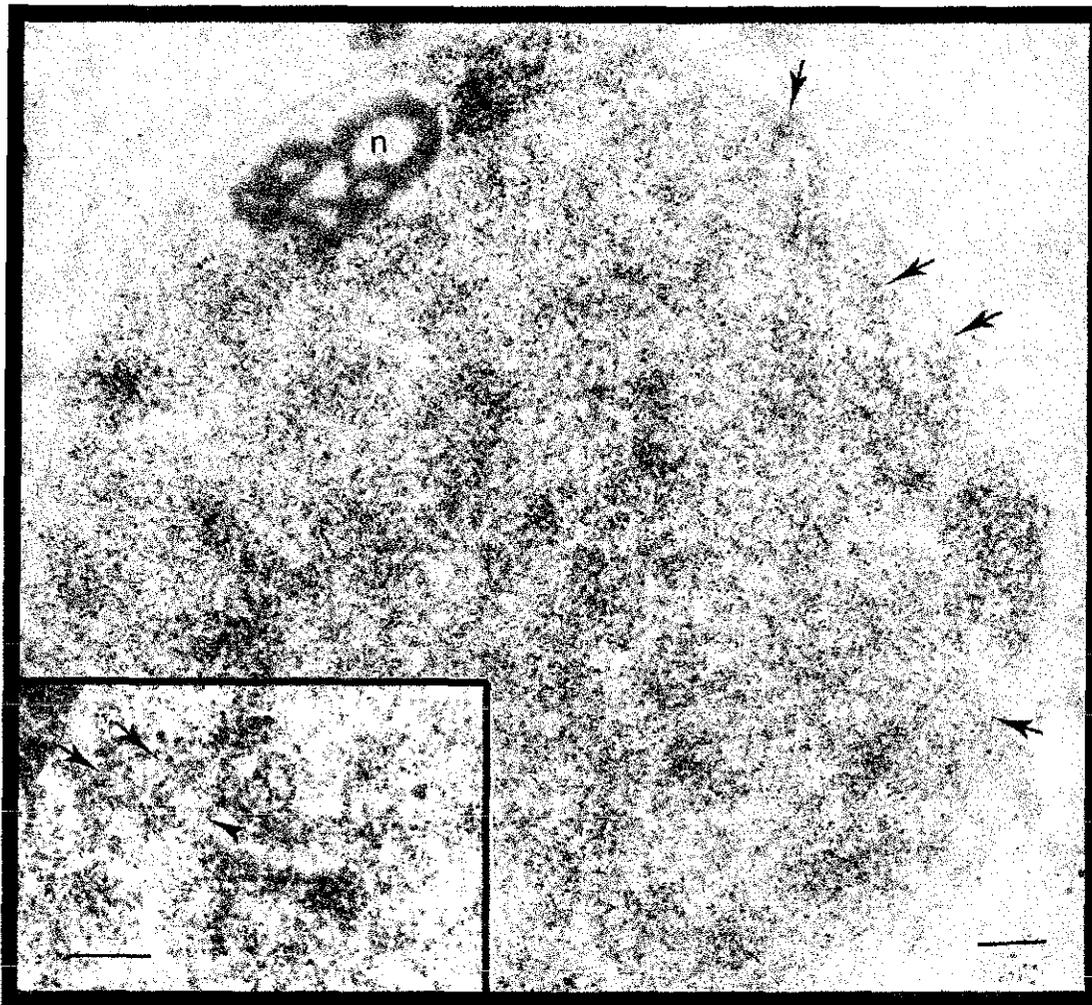


Figura 7

Célula premeiótica o en preleptoteno con escasa cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear y largas estructuras plumuladas alineadas en paralelo (flecha). El nucleolo se encuentra desplazado hacia la periferia. Barra 500 nm inserto. Se muestran dos elementos plumulados alineados en paralelo unidos por filamentos transversales (cabeza de flecha) formando una escalerilla de doble cuerda (flecha). Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo Barra 200 nm

Los cortes seriados demuestran que las células en preleptoteno contienen estructuras plumuladas cuyos ejes están formados generalmente por dos filamentos finos que contienen ADN situados a una distancia entre 10 a 20 nm. Frecuentemente los pares de las estructuras plumuladas se encuentran alineadas en paralelo y relacionadas por filamentos constituidos por ADN. Tanto los ejes como los filamentos transversales que los unen se asocian con fibrillas que contienen RNP. El conjunto de estos elementos forma una estructura semejante a una escalerilla de doble cuerda (Figura 7). La distancia entre el eje de los plumulados puede variar, pues en algunos casos se observan muy cercanas, entre 40 y 100 nm y en otros casos la distancia es mayor y va de 150 a 300 nm. La descondensación del material nuclear durante la interfase meiótica permite una clara visualización de fibras alineadas en paralelo de cromatina extendida e interrelacionadas por finos filamentos y estructuras semejantes a

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

cuentas de rosario que corresponden a fibrillas de RNP.

Las estructuras plumuladas se observan en el material que ha sido fijado con detergente en condiciones hipotónicas a pH de 9 y tratado con ARNasa al 2% con una disminución en las ramificaciones que parten del eje principal. Cuando estas estructuras plumuladas se encuentran alineadas en paralelo es evidente el vacío que existe entre los dos ejes de la *escalerrilla de doble cuerda*. Estos resultados nos indican que la mayor parte de dichos filamentos transversales están conformados por ARN, lo que nos sugiere que probablemente estas estructuras constituyan unidades transcripcionales (Figuras 8 y 9).

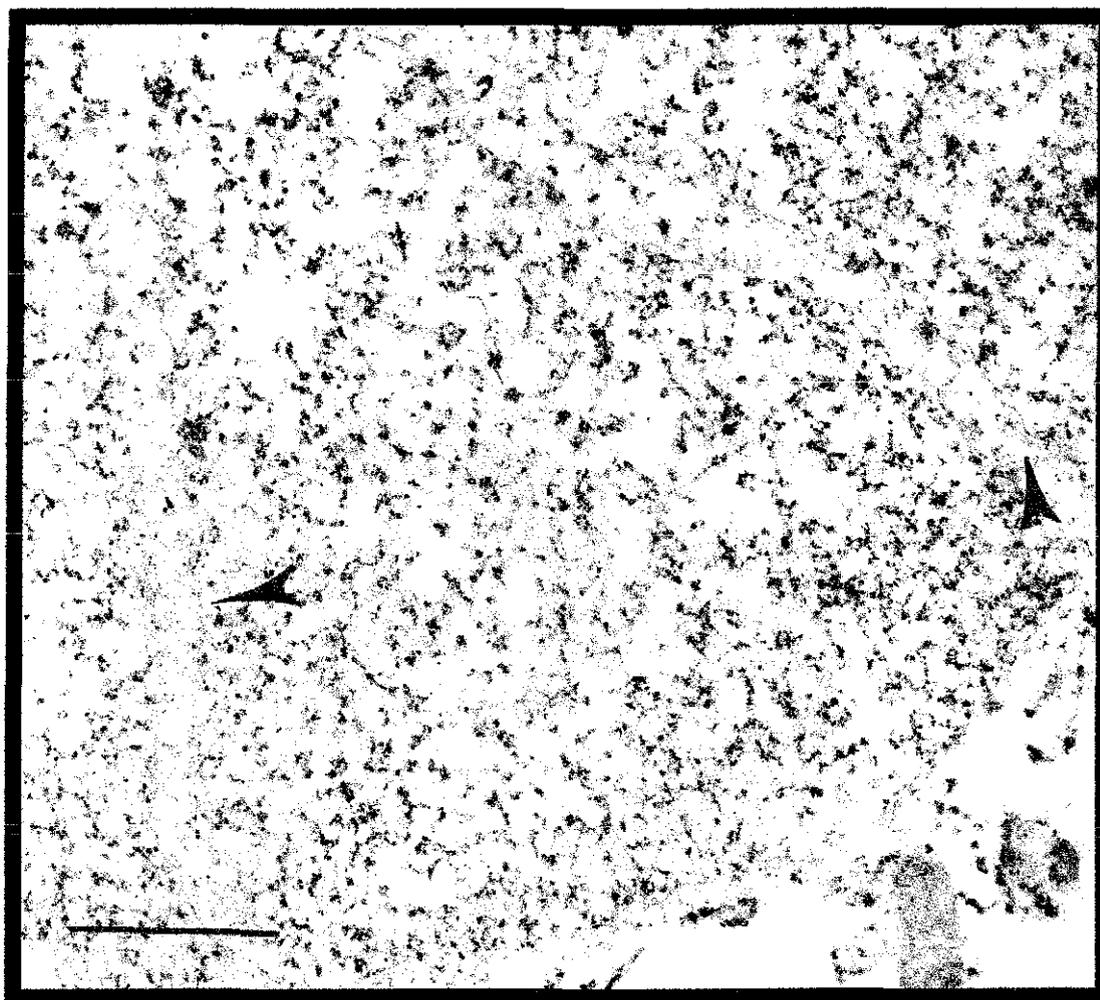


Figura 8

Célula premeiótica o en preleptoteno, fijada en condiciones hipotónicas en presencia de pequeñas concentraciones de detergente. La muestra se trató con ARNasa al 2%. Se observa que en la región en donde los plumulados se alinean en paralelo (cabeza de flecha), las regiones centrales de alineamiento de dos pares de estructuras plumuladas están menos contrastadas ya que la hidrólisis del ARN suprimió muchas de los filamentos RNP que abundan en la región de reconocimiento. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 600 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

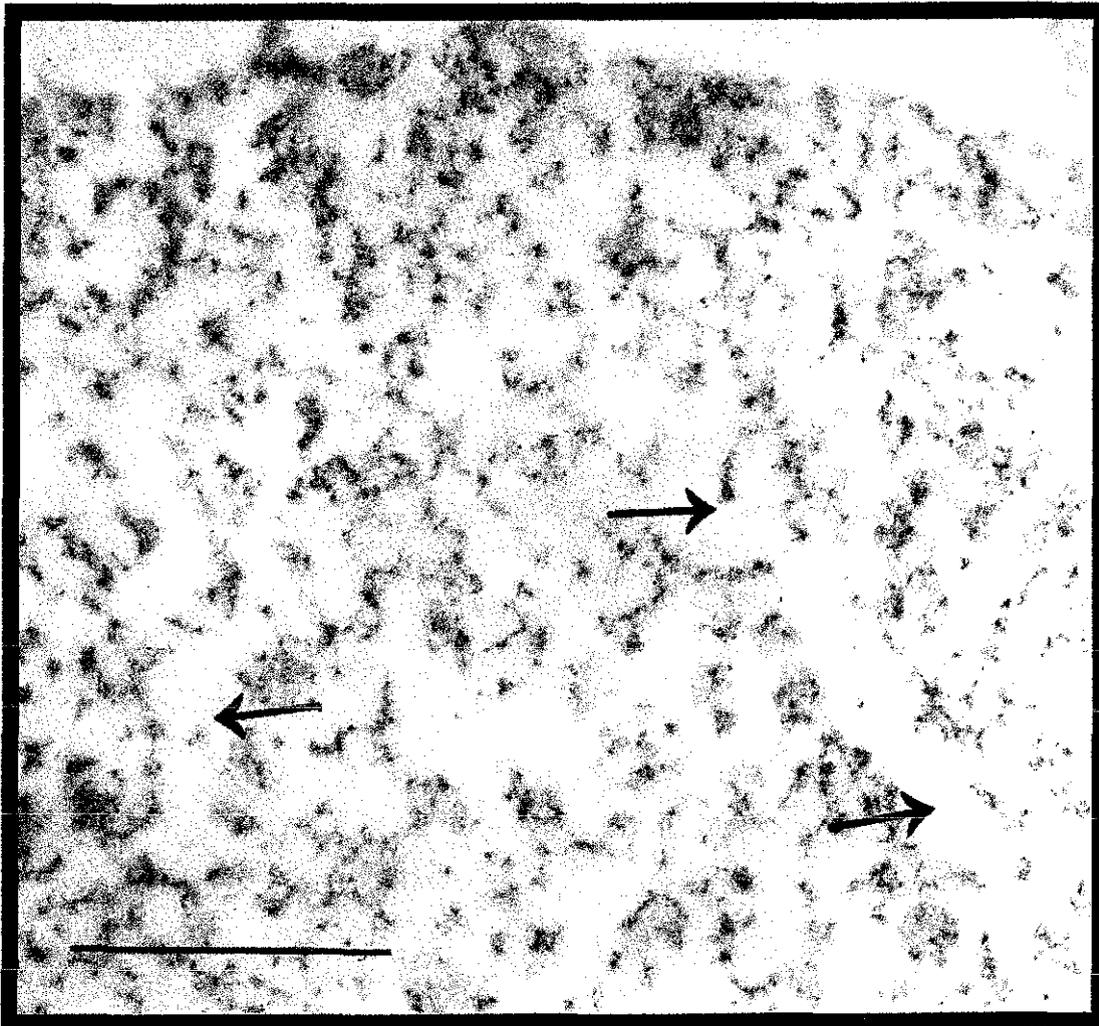


Figura 9.

Célula premeiótica o en preleptoteno, fijada en condiciones hipotónicas en presencia de pequeñas concentraciones de detergente. La muestra se trató con ARNasa al 2%. Los plumulados se encuentran contrastados por el método de tinción de amina de osmio específico para ADN. Se muestra la región central entre pares de estructuras plumuladas alineadas en paralelo en donde existen pocas fibrillas de cromatina (flecha). Barra 1000 nm

Al final del estado del preleptoteno la cromatina está completamente descompactada ocupando el espacio nuclear casi en su totalidad.

### Leptoteno

En los cortes seriados de espermatoцитos en leptoteno, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, se vio que existe una disminución muy notoria de los grumos de cromatina, observándose por lo tanto, cromatina laxa en todo el núcleo y unos cuantos grumos de cromatina semicompacta. Continúa la presencia de las estructuras plumuladas, así como, la organización de éstas en una disposición en paralelo o aisladas. Cada eje de las estructuras plumuladas está compuesto por dos filamentos axiales de cromatina que se encuentran

rodeados por asas radiales de manera muy cercana y en paralelo, semejando estructuras pequeñas microplumuladas (Figura 10).

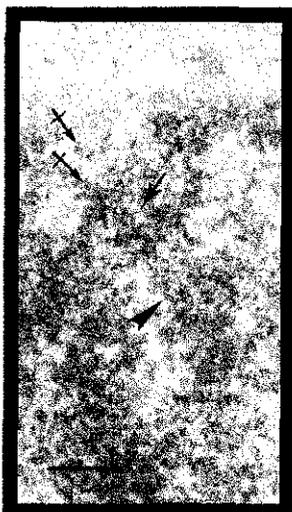


Figura 10

Espermatocito en leptoteno que muestra dos finos ejes paralelos (flecha atravesada) que se encuentran rodeados por numerosos filamentos laterales largos, los que probablemente corresponden a asas. Uno de los ejes parte de la envoltura nuclear, es posible observar algunas asas cortas (cabeza de flecha). Entre los dos ejes hay filamentos transversales que atraviesan de un lado a otro (flecha). Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 300 nm

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Estos filamentos axiales que constituyen la estructura plumulada, estan organizados en paralelo y se encuentran unidos por finas fibras que atraviezan de manera franca de un lado a otro (Figura 10). La asociación de estos filamentos axiales en paralelo constituyen una estructura plumulada común (Figura 11).

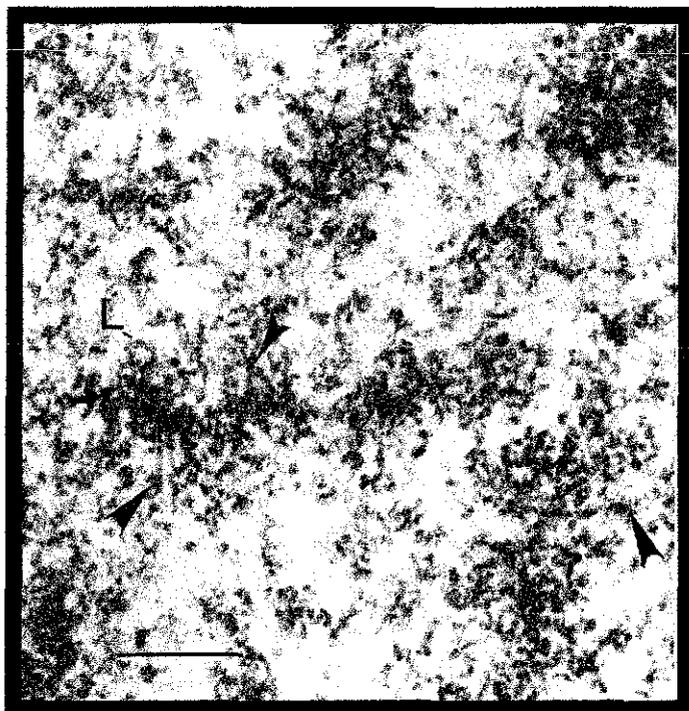


Figura 11.

Espermatocito en leptoteno que muestra un filamento axial constituido por dos estructuras microplumuladas (flecha). Se advierten numerosos filamentos laterales que se extienden por el nucleoplasma (cabeza de flecha). Note el asa de cromatina en forma de luz (L). Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 400 nm

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Nuestras observaciones muestran que la distancia entre estos filamentos axiales que forman la estructura plumulada es variable (20-80 nm). En este estadio los filamentos de cromatina que forman puentes entre las estructuras plumuladas paralelas son mucho más frecuentes que en los anteriores.

Cuando comienza a formarse el elemento axial se presenta el depósito de material que provoca la densificación de manera regional en los filamentos axiales de la estructura plumulada (Figura 12 y 13a).

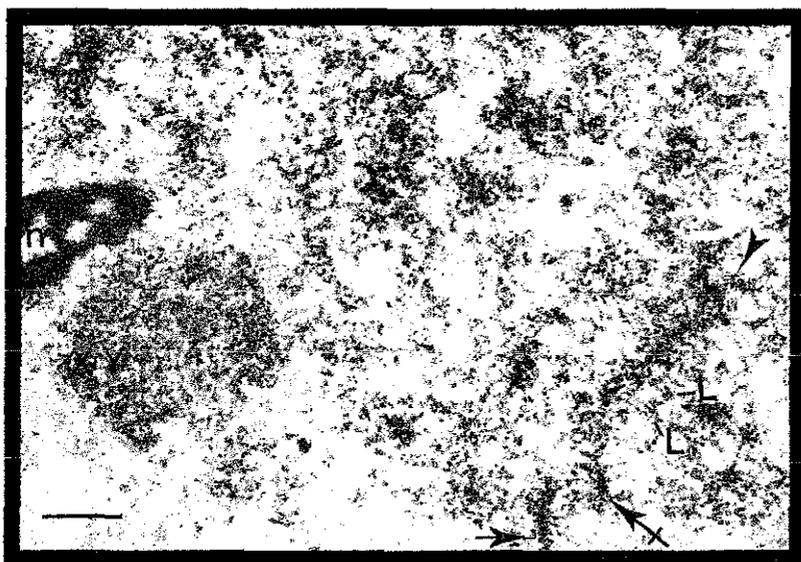


Figura 12.

Espermatocito en leptoteno. Se observan dos elementos axiales en formación que inician su desarrollo en la cercanía de la envoltura nuclear (flecha). La constitución del elemento axial se manifiesta por el depósito de material que provoca la densificación de los ejes cromosómicos leptoténicos. Estos ejes están conformados por dos finos filamentos que se encuentran muy cercanos y que se tiñen intensamente (flecha atravesada). Uno de los elementos axiales en formación muestra continuidad con estructuras plumuladas (cabeza de flecha). Algunas de las asas laterales de los ejes tienen en grosor del corta (L) esto lo sabemos por las reconstrucciones tridimensionales. Se observa el nucleolo (n) y el cuerpo XY cercanos a la envoltura nuclear. Contraste general de acetato de uranio-citrato de plomo. Barra 500 nm.

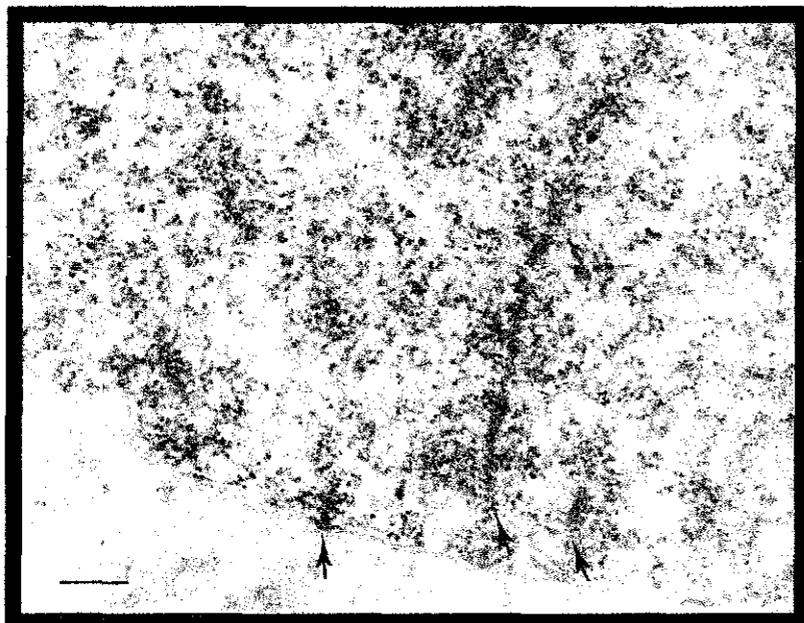


Figura 13a

Espermatocito primario en leptoteno. Elementos axiales partiendo de la envoltura nuclear arreglados en paralelo (flecha) que muestran continuidad con estructuras plumuladas. Contraste general de acetato de uranio-citrato de plomo. Barra 250 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Ambos filamentos axiales constituyen el eje cromosómico leptoténico. Los ejes cromosómicos leptoténicos muestran una clara continuidad con las estructuras plumuladas cuando ambos están contenidos en el grosor del corte. Los ejes cromosómicos leptoténicos son estructuras cilíndricas de 35 a 55 nm de diámetro las cuales contienen dos filamentos finos (Figura 13a). Los elementos axiales que se encuentran en paralelo en la proximidad de la envoltura nuclear se acercan uno al otro a distancias que varían (180-350 nm) y conforme se alejan hacia el interior del núcleo la distancia entre estos se incrementa (400-800 nm). Los filamentos radiales de estos elementos corresponden a asas largas que generalmente no es posible delinear en un corte, aunque algunas ocasiones están contenidas en el grosor del corte mostrándose como asas cortas (40-200 nm). La frecuencia con la que se presentan estas asas cortas se incrementa cuando los ejes cromosómicos leptoténicos comienzan a constituirse en elementos axiales. Estas asas están desnamente distribuidas y en forma casi periódica a lo largo del filamento (Figura 12).

Los elementos axiales en formación muestran una reacción fuertemente positiva con las técnicas citoquímicas para ARN (Figura 13b).

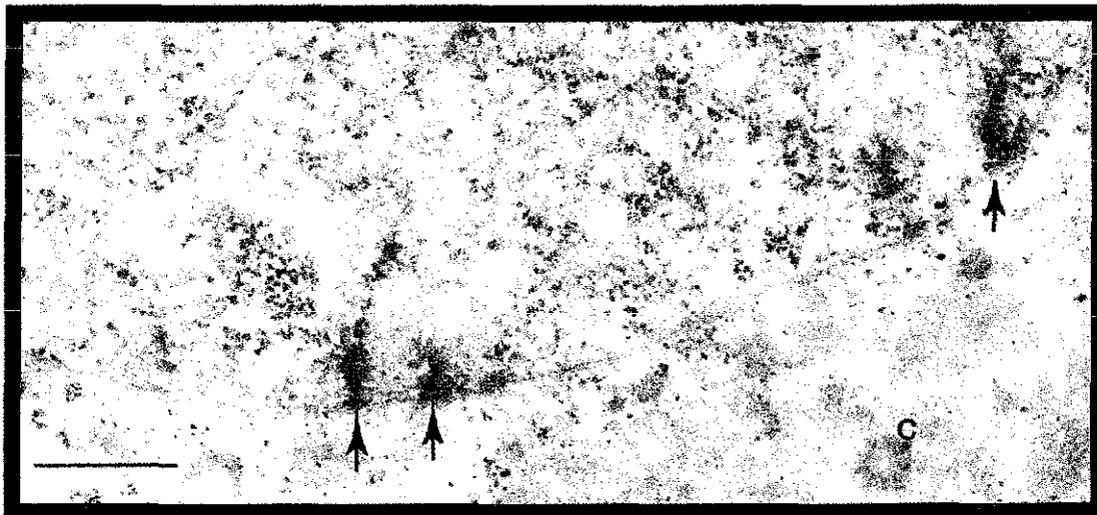
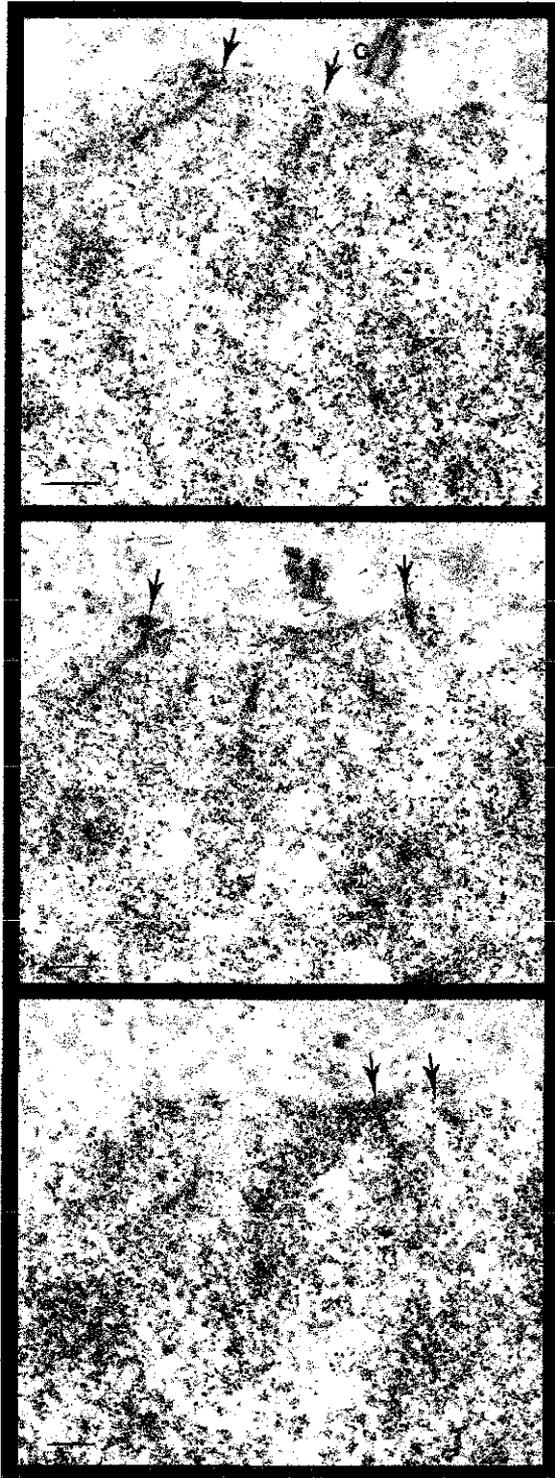


Figura 13b

Espermatozoide en leptoteno contrastado con el método de tinción preferencial de Bernhard (1969) para RNP. Se observan elementos axiales cortos cercanos a la envoltura nuclear que están intensamente teñidos (flecha). Dos de ellos se encuentran alineados en paralelo. Se muestran numerosas fibras y gránulos de RNP distribuidos por todo el nucleoplasma. Se evidencia en el citoplasma el centriolo (c). Barra 650 nm.

Cuando el elemento axial se está formando las regiones de densificación son generalmente cortas, discontinuas y la mayoría de ellas aparecen como pares en contacto con la envoltura nuclear, provocando que en ocasiones se observe una depresión en la envoltura nuclear. Los cortes seriados mostraron la presencia de centriolos durante el desarrollo de los elementos axiales alineados en paralelo adosados a la envoltura nuclear (Figura 14).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 14.

Espermatocito en la transición leptoteno-zigoteno. Tres cortes adyacentes de una serie que evidencia la formación de los elementos axiales (flecha) en contacto con la envoltura nuclear. Los elementos axiales en los diferentes cortes muestran continuidad con estructuras plumeadas. Se puede observar el centriolo (c) cercano al núcleo formando una concavidad. Estas características apuntan a que la célula está en la etapa del bouquet. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 400 nm.

La presencia de pares de elementos axiales no excluye que se observaran elementos axiales aislados.

En la etapa de leptoteno avanzado las regiones de cromatina comienzan a compactarse alrededor del eje o elemento axial y las asas radiales del eje se acortan. La reconstrucción tridimensional demuestra que el elemento axial guarda la disposición de las estructuras plumuladas alineadas las que recorren fracciones de micrómetros dentro del volumen nuclear. Frecuentemente observamos que los pares de elementos axiales se acercan uno del otro en la proximidad de la envoltura nuclear (Figuras 12 y 13). Estas características que hemos mencionado coinciden más con las descripciones morfológicas del cigoteno realizadas por los autores clásicos (Paniagua et al., 1993; Solari, 1999).

Es importante señalar que en el citoplasma de las células en leptoteno no se presentaron abundantes ribosomas o retículo endoplásmico rugoso como indicadores de síntesis proteica.

### Cigoteno

En las reconstrucciones tridimensionales durante la transición leptoteno-cigoteno se observan varios ejes incompletos en forma de bouquet. Así como la presencia de varios nucleolos hacia la periferia. En este estadio fue común observar a los nucleolos como estructuras conspicuas con centros fibrilares y su región fibrilar densa bien desarrollada. Al seguir las series se observó que la mayoría de los elementos axiales se localizan principalmente concentrados en un tercio del volumen nuclear que coincide con la presencia de los centriolos (Figura 14). La elongación de los elementos axiales alineados está frecuentemente acompañada por el inicio del apareamiento final, que es la formación del CS. La aparición de una región central con la exclusión de cromatina es una característica inicial de la sinapsis (Figura 15).

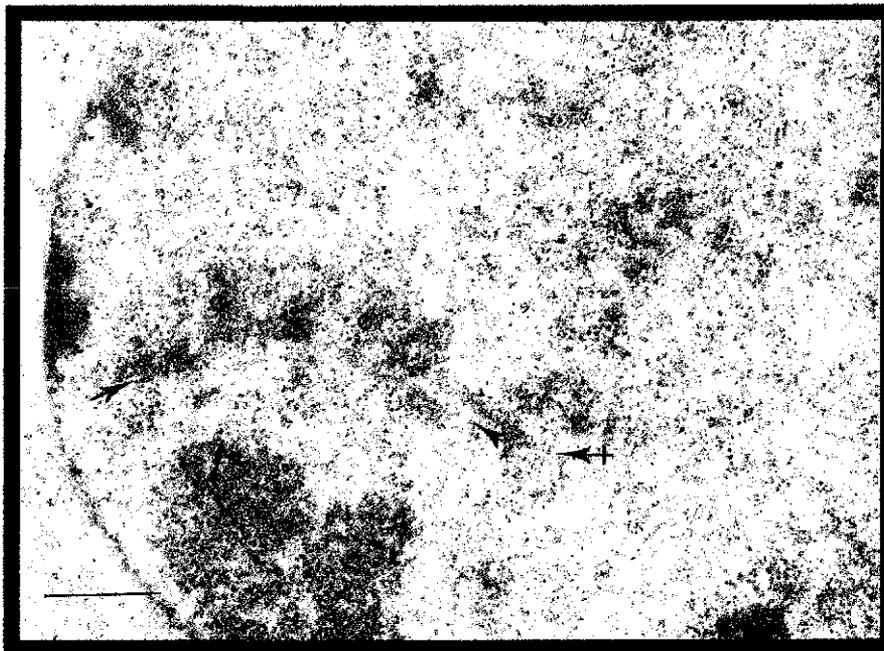


Figura 15

Espermatozoario en cigoteno. Se observa la formación de un CS. El elemento axial (flecha) tiene filamentos de cromatina hacia la parte externa (c). La zona central se muestra vacía lo que indica la formación de una zona de exclusión (cabeza de flecha). Se aprecia la continuidad entre el elemento axial y una estructura plumulada (flecha atravesada). Contraste acetato de uranio-citrato de plomo. Barra 750 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Con los métodos de tinción para ADN se observó que se llevan a cabo cambios importantes en la distribución de la cromatina cuando se da la formación del CS. El espacio central está desprovisto de las fibrillas que contienen ADN, excepto por algunas pocas fibrillas transversas de cromatina y cortas asas que salen del elemento lateral. En los espermatoцитos en cigoteno las estructuras plumuladas, mantienen las mismas características observadas en las etapas previas.

Durante el inicio del cigoteno se evidenció la aparición de extensiones cortas de CS con tres modalidades principalmente: en contacto con la envoltura nuclear; cercanos a la envoltura nuclear o en la región interna del núcleo (Figura 16).

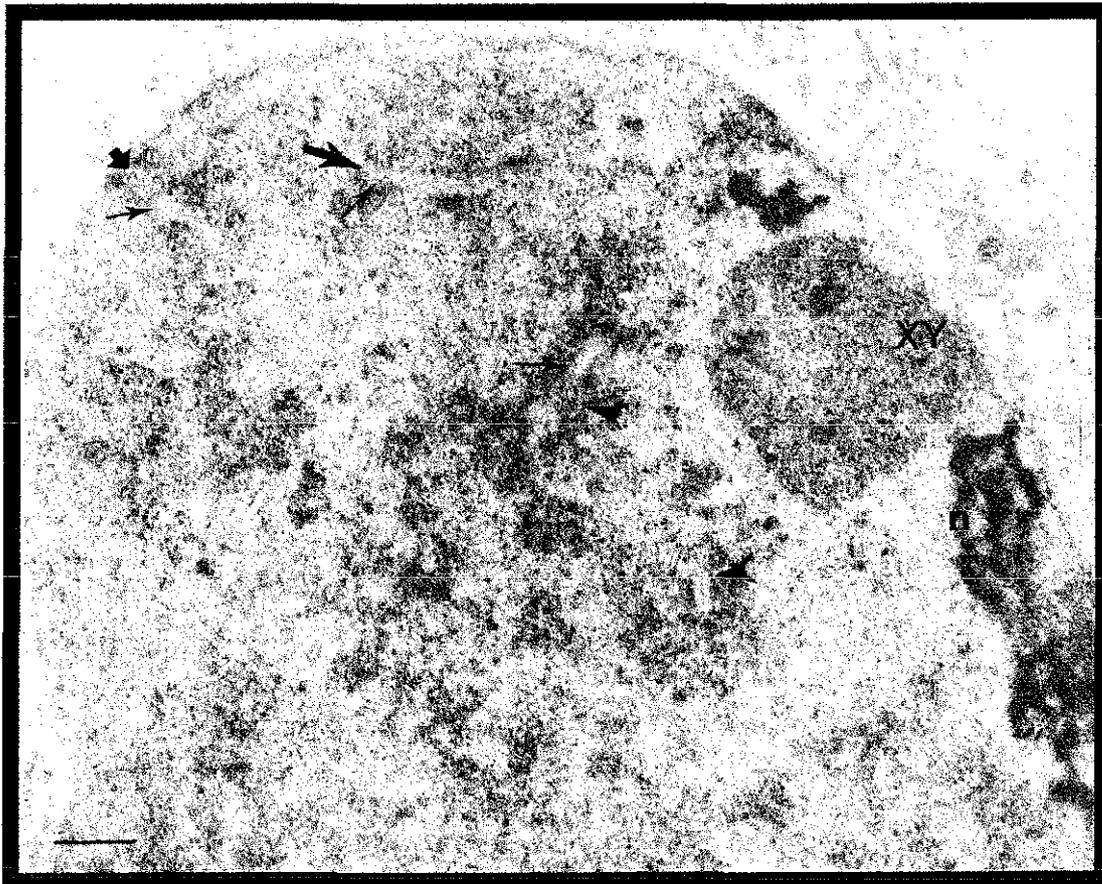
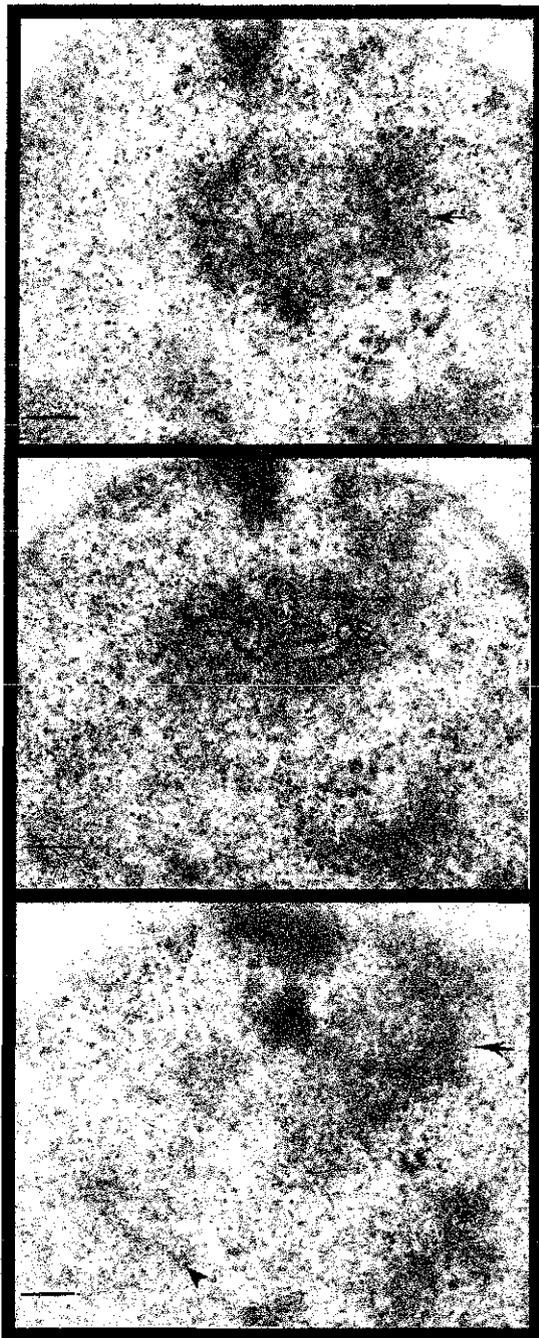


Figura 16

La formación de CS se puede dar partiendo de la envoltura nuclear (flecha gruesa) cercano a la envoltura nuclear (flecha) y en la región intersticial (cabeza de flecha). Durante la formación de los CS se observa en la región central una zona de exclusión (flecha doblada). Se observa en la periferia del núcleo el cuerpo XY y el nucleolo. Aun no son evidentes los gránulos pericromatinianos en el nucleoplasma. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 500 nm.

Los elementos axiales generalmente se encontraron ya alineados antes de la sinapsis. En los espacios entre ambos elementos axiales se observaron numerosos puentes de finos hilos compactos de cromatina asociados con fibrillas de RNP y gránulos. La distancia final entre los elementos axiales durante el apareamiento es ocasionalmente menor que la distancia de

100 nm entre los elementos laterales del CS. El elemento central y los filamentos transversos del CS aparecen de manera progresiva entre los elementos laterales, creando la zona de exclusión en la que no hay filamentos de cromatina ni estructuras RNP. Simultáneamente a este proceso, se da la compactación y reorganización espacial de la cromatina, manifestada por la disposición de las asas cortas y su incorporación en el interior de los elementos laterales del CS, así como de la aparición de una capa de cromatina compacta que rodea al CS en desarrollo. Comienzan a mostrarse en esta etapa pequeños cúmulos de cromatina compacta asociados a la envoltura nuclear (Figura 17).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 17

Espermatocito en cigoteno. Serie de tres cortes adyacentes en la que se observa un CS que no muestra continuidad en otros cortes. El sitio en el que se ubicaría el CS, hay fibras de cromatina en proceso de compactación en diferentes direcciones (flecha), así como estructuras plumuladas (cabeza de flecha). Se advierten además cúmulos de cromatina compacta adosada a la envoltura nuclear. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 400 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

No distinguimos con frecuencia imágenes claras de elementos axiales constituyendo estructuras semejantes a "Y griegas" que nos indicaran elementos axiales convergiendo para formar una sinapsis. Cuando los elementos axiales constituyen el CS se encuentran ya paralelos y cercanos. Durante el cigoteno se reconoció que los elementos axiales recorren distancias que varían entre fracciones de uno a dos micrómetros. La mayoría de los elementos axiales que seguimos en las series están estructurados de manera incompleta, por lo que la formación del CS a partir de elementos axiales largos rara vez fue observada. Los cortes seriados además evidenciaron que las extremidades del CS no siempre son continuas con elementos axiales. Los extremos de los CS en desarrollo en algunas ocasiones fueron continuos con las estructuras plumuladas o las escalerillas de doble cuerda (Figura 15). Frecuentemente advertimos que al final de la formación del CS se presentaba una maya de fibras de cromatina semicompacta que se elongaba en diferentes direcciones o cúmulos de cromatina semicompacta que aparecían varios nanómetros más adelante (Figura 17).

### Paquiteno

En los espermatocitos en paquiteno notamos en el núcleo las características ultraestructurales descritas por los clásicos, prácticamente es muy raro observar las estructuras plumuladas, así como las "escalerillas de doble cuerda". Otro contraste entre los espermatocitos en paquiteno y las células de las etapas previas, es la presencia de gránulos pericromatinianos en la periferia de la cromatina de los elementos laterales (Figura 18).

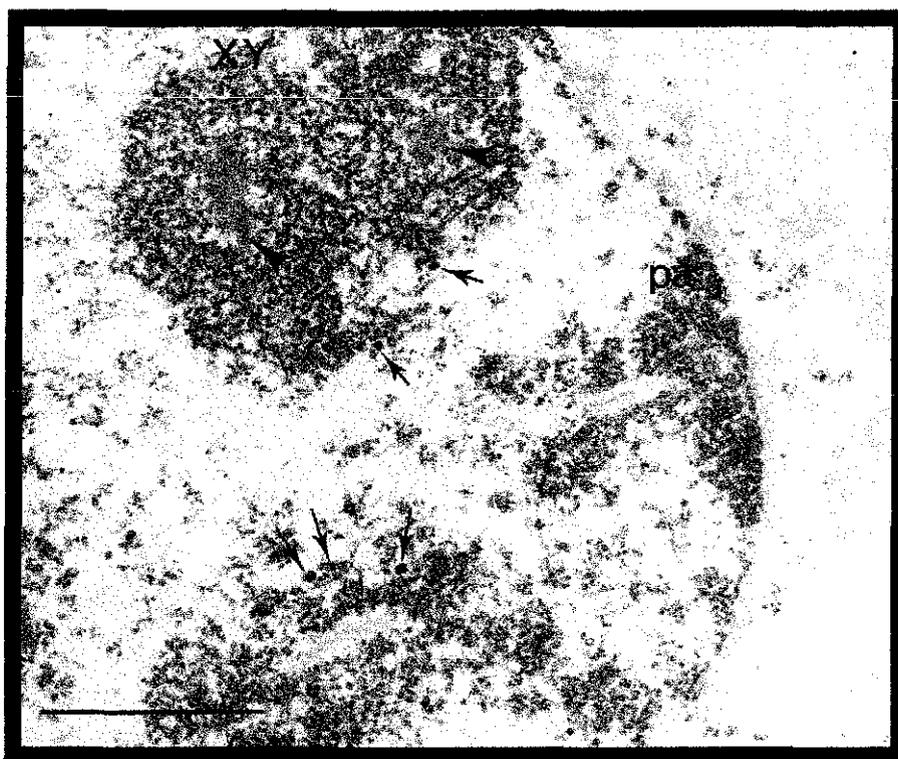


Figura 18.

Espermatocito en paquiteno que muestra un CS con su placa de adhesión (pa), y gran cantidad de gránulos pericromatinianos (flecha) en la cromatina de la periferia de los elementos laterales. En el cuerpo XY se observan fragmentos de los elementos laterales (cabeza de flecha), así como gránulos pericromatinianos en la periferia de la cromatina (flecha). Contraste general de acetato de uranio-citrato de plomo. Barra 300 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los complejos sinaptonémicos ya formados recorren largas extensiones en el núcleo. La vista de lado de los elementos laterales de los CS demuestran la existencia de estriaciones longitudinales de aproximadamente 0.2 micrómetros de ancho (Figura 19).

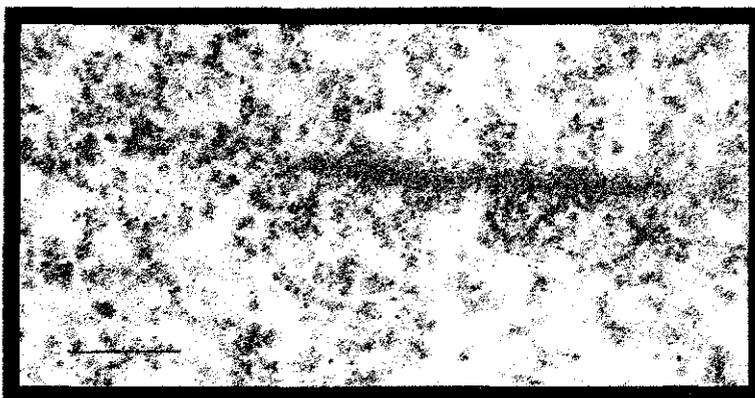


Figura 19

Elemento lateral de un CS de espermatocito en paquíteno. Se advierten estriaciones transversales que muestran una periodicidad. Contraste general de acetato de uranilo citrato de plomo. Barra 200 nm

En la cara interna (que da hacia la región central del CS) de los elementos laterales advertimos con los métodos de tinción general y específicos para ADN que corren uno o dos filamentos que tienen un grosor irregular. Estos filamentos frecuentemente los distinguimos como hilos de perlas que muestran un alineamiento (Figuras 20 y 21).

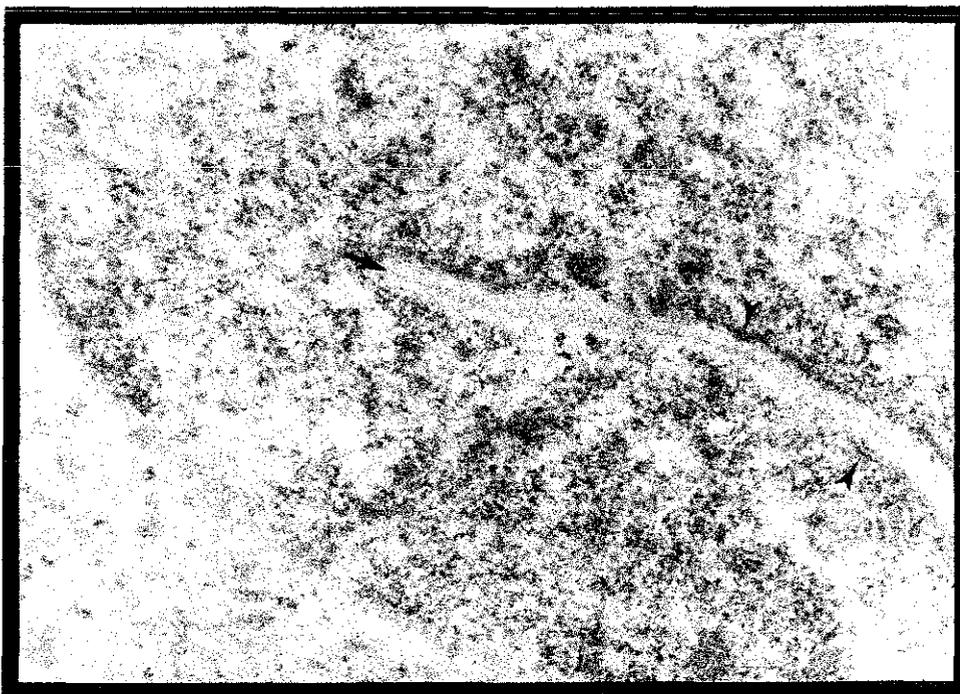


Figura 20

Espermatocito en paquíteno. Se nota un CS bien formado que muestra sus elementos laterales. En la cara interna de los elementos laterales se aprecian dos filamentos finos (cabeza de flecha). El CS muestra claramente su elemento medial (flecha) y los filamentos transversos que se encuentran atravesando el espacio central del CS. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 200 nm

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

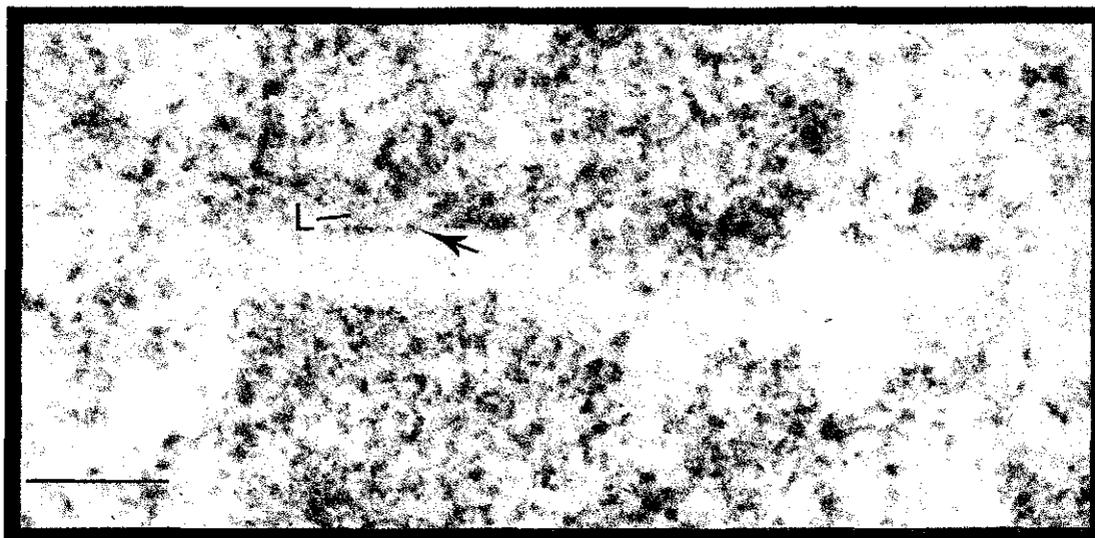


Figura 21.

Espermatocito en paquíteno contrastado con el método de tinción específico de amina de osmio para ADN. Se observa la presencia de un filamento irregular intensamente teñido localizado en la cara que da hacia el espacio central (flecha) del CS. Note que el espacio de apareamiento está desprovisto de cromatina. No es posible definir el límite externo del elemento lateral (L) porque sus fibras se continúan con la cromatina cercana. Barra 200 nm

Los métodos de tinción para ADN revelaron la distribución de la cromatina alrededor del CS, además de mostrar que el espacio central se encuentra desprovisto de ADN, excepto por algunas pocas fibrillas transversas de cromatina y asas que salen del elemento lateral (Figura 22).

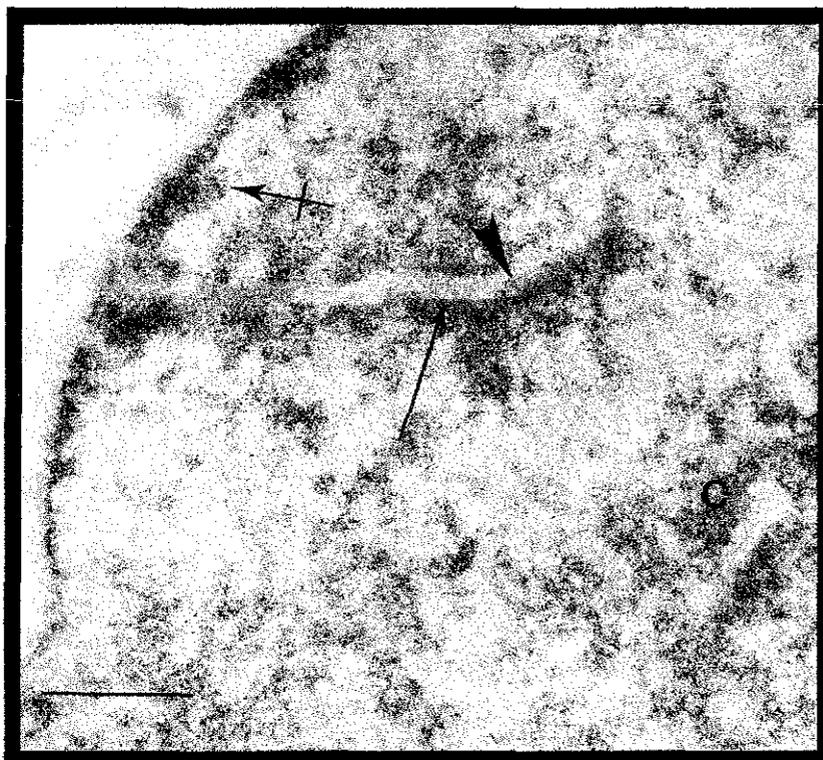


Figura 22.

Espermatocito en paquíteno contrastado con el método específico de amina de osmio para ADN. La cromatina está intensamente contrastada, los otros componentes están débilmente teñidos. Dos CS están rodeados por cromatina que se encuentra organizada de manera irregular (c). Escasas fibras de cromatina atraviesan el espacio central (flecha) del CS. Asas de cromatina cortas salen del elemento lateral hacia el espacio central (cabeza de flecha). Existen también cúmulos de cromatina compacta adosados a la envoltura nuclear (flecha atravesada). Los componentes del citoplasma no presentan contraste. Barra 500 nm

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Los cortes oblicuos de los CS indicaron la presencia de numerosas asas cortas que no rebasan el ancho del elemento lateral (Figura 23).

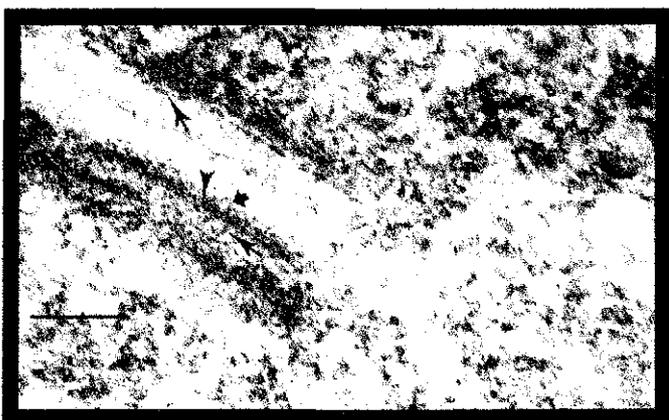


Figura 23. Espermatozoido en paquiteno contrastado con el método de tinción específico de amina de osmio para ADN. Se observan los dos elementos laterales cortados con diferente inclinación probablemente debido a la trayectoria del CS. Los filamentos que parecen cuentas sobre un hilo están claramente contrastados (flecha) en la cara interna del elemento lateral. Los filamentos de cromatina muestran continuidad con la cromatina que se encuentra en los elementos laterales. El elemento lateral inferior está cortado a todo lo ancho de su superficie pareciendo un listón. En él se evidencian asas cortas que se proyectan hacia el espacio de apareamiento (flecha gruesa), así como la presencia de numerosas fibras y asas cortas que se sitúan en todo el espesor del elemento lateral (flecha). Se advierten ejes de cromatina que se localizan en la cara interna del elemento lateral y que están constituidos por dos fibras muy delgadas de cromatina (cabeza de flecha). Los bordes externos del elemento lateral muestran un arreglo denso de los filamentos de cromatina. Barra 250 nm.

Algunas de las fibrillas de cromatina que atraviesan el elemento lateral se continúan con la cromatina que rodea el CS. A lo largo del paquiteno la cromatina que envuelve al CS progresivamente se hace más compacta. Las regiones cromosómicas en contacto con la envoltura nuclear están formadas por una densa masa de filamentos con una distribución aparentemente no al azar.

Con los métodos de tinción para RNP se pudo observar en el paquiteno temprano que los elementos laterales de CS tienen un contraste positivo lo que indica que se encuentran constituidos por ribonucleoproteínas.

En el paquiteno avanzado los elementos laterales pierden su positividad al método de tinción del EDTA para ribonucleoproteínas por lo que se mostraron tenuemente teñidos (Figura 24). Sin embargo en la vecindad del CS se presentaron numerosas fibrillas y gránulos EDTA positivos (Figura 24).

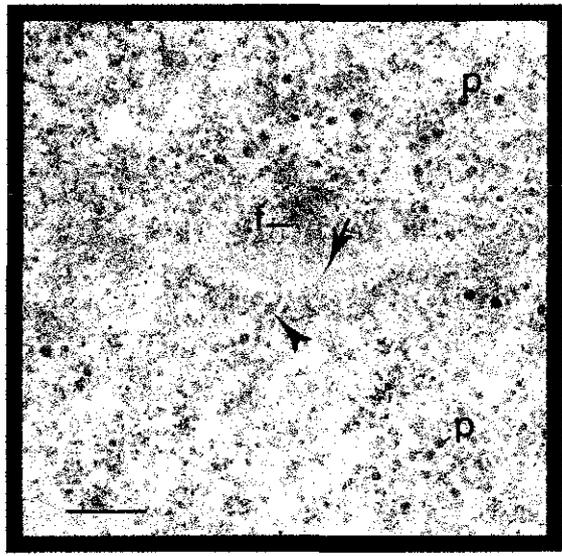


Figura 24. Espermatozoido en paquiteno. CS cortado lateralmente que muestra el elemento lateral contrastado débilmente (flecha). Se observan numerosas fibras pericromatinianas en las cercanías al elemento lateral (f). Los gránulos pericromatinianos que son abundantes están intensamente teñidos (p). Note el gránulo pericromatiniano que aún conserva un pedúnculo que indica su proceso de formación (cabeza de flecha). Contraste método de tinción preferencial del EDTA para RNP. Barra 250 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las estructuras que contienen RNP corresponden a fibrillas pericromatinianas y gránulos pericromatinianos caracterizados por Moneron y Bernhard (1969). Los gránulos pericromatinianos son claramente más numerosos en el paquiteno que en los estadios previos. El método de tinción de EDTA contrastó positivamente una hilera de pequeños gránulos correspondientes a los filamentos en forma de hilos de perlas, en la cara medial de los elementos laterales.

### Diploteno

El inicio del diploteno está caracterizado por un incremento en la densidad de la cromatina complementadas por zonas de cromatina extendida. Simultáneamente las características estructurales del CS cambian. Los filamentos transversos y el elemento central se pierden, la apariencia de los elementos laterales en forma de listón desaparece, y sus filamentos axiales abandonan el borde del espacio de apareamiento migrando hacia dentro de las masas de cromatina. En las áreas en las que se presentó la cromatina extendida, sólo se observaron los elementos laterales como dos filamentos paralelos rodeados por pequeñas masas de cromatina separadas por un espacio desprovisto de ADN y en el que quedan restos del CS (Figura 25).

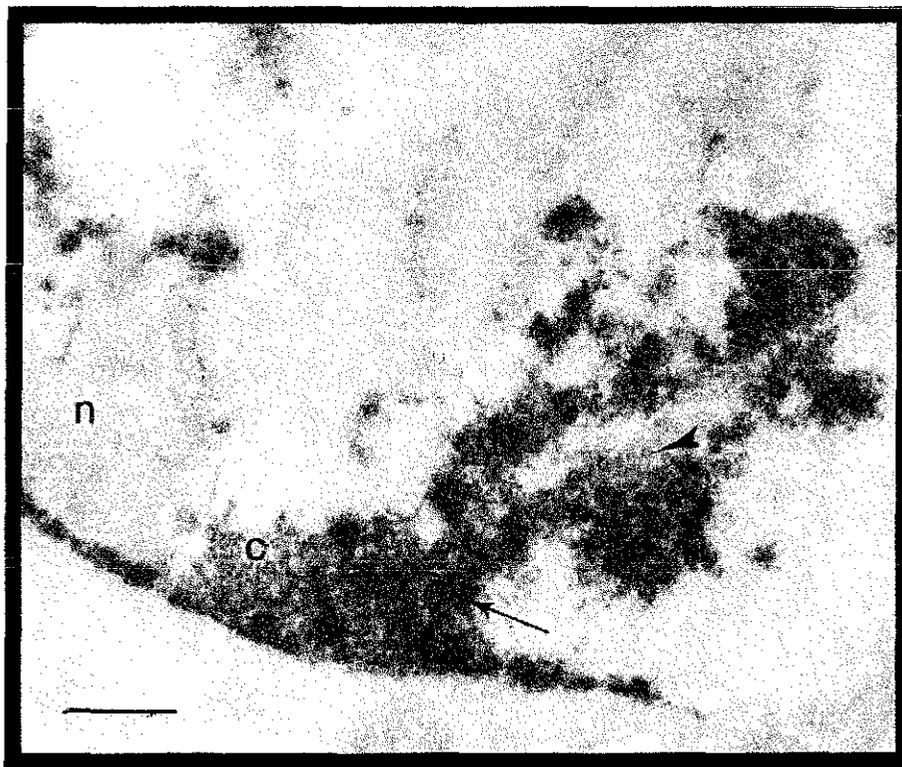


Figura 25.

Espermatocito en diploteno contrastado con el método de tinción específico de amina de osmio para ADN. Se observan cúmulos de cromatina compacta (c) asociados a la envoltura nuclear. De estos cúmulos de cromatina sale cromatina compacta alineada que muestra restos de lo que fuera el elemento central (cabeza de flecha) de un CS. En el interior de la cromatina compacta se advierten dos finos filamentos alineados en paralelo (flecha). Junto al cúmulo de cromatina adosada a la envoltura nuclear se encuentra el nucleolo (n) teñido muy levemente. Barra 700 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VI.2 Inmunolocalización

En las espermatogonias tipo B, se encontró que las estructuras plumuladas dan una reacción positiva con el anticuerpo monoclonal anti-ARN-polimerasa II localizándose la marca en fibrillas que contienen ARN asociado con las estructuras plumuladas y también sobre fibrillas dispersas en el nucleoplasma, lo que demuestra una intensa transcripción de ARN mensajero por parte de la ARN polimerasa II. Las fibrillas que se encuentran asociadas con los plumulados están también marcadas por el anticuerpo anti-hnRNP indicando que las estructuras contienen ARN heterogéneo, el cual podría ser ARN-premensajero o ARNm. La inmunolocalización con el anticuerpo anti-Sm que detecta proteínas asociadas a los snURNAs (U1, U2, U5 y U6) y el anticuerpo contra el trimetil-guanosin cap, indicaron que los componentes del splicing son menos abundantes que los hnRNP y la ARN polimerasa II, en las estructuras plumuladas y en el nucleoplasma en general (Figura 26).

La inmunolocalización señala que la ARN polimerasa II está ubicada en los elementos axiales nascentes, en las estructuras plumuladas y fibras de cromatina extendida. Al comparar la distribución obtenida para la anti-Sm y del anti-trimetil-guanosin-cap se evidencia que su

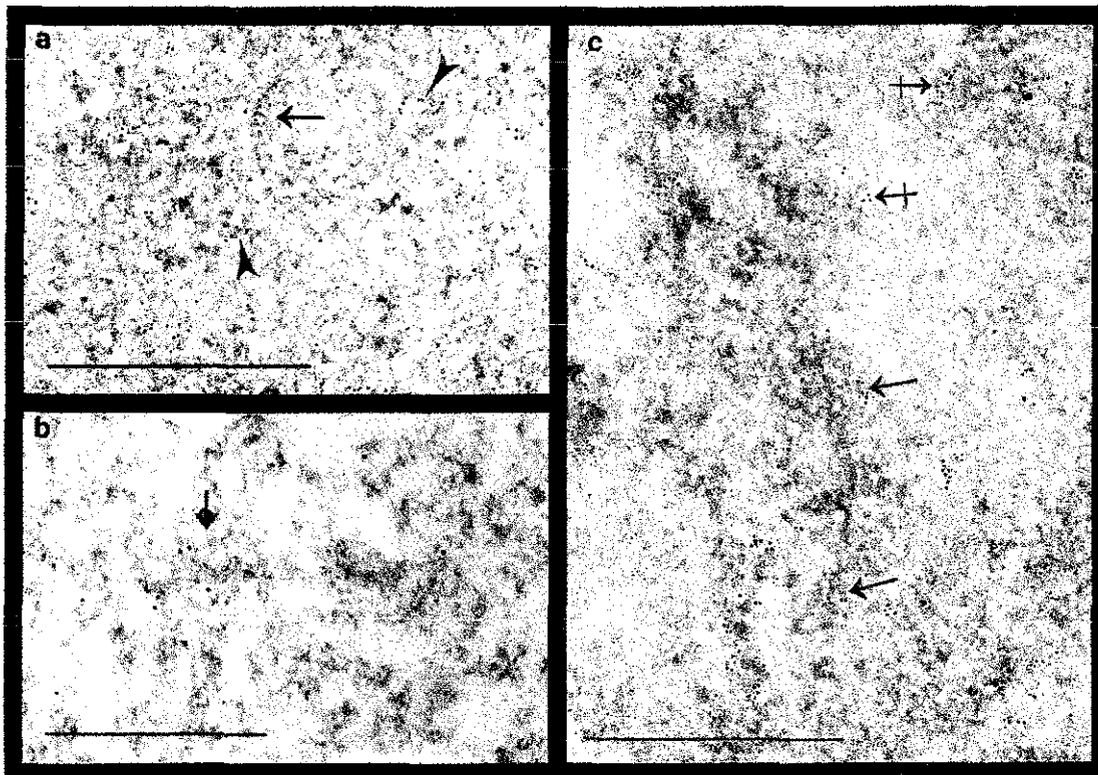


Figura 26.

- a) Espermatogonia tipo B marcada con anti-ADN. Se observa marca en los ejes centrales, así como las asas radiales de las estructuras plumuladas (flecha). Se aprecian numerosas fibras de cromatina laxa dispersas en el nucleoplasma también están marcadas (cabeza de flecha). Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 1mm.
- b) Se notan las fibras de RNP asociadas a una estructura plumulada (flecha) marcadas con el anti-ARN polimerasa II, así como múltiples fibras dispersas en el nucleoplasma. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 500 nm.
- c) Los filamentos radiales de las estructuras plumuladas (flecha), los gránulos pericromatinianos (cabeza de flecha), así como fibrillas dispersas en el nucleoplasma (flecha atravesada) están intensamente marcadas con el anticuerpo anti-hnRNP. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 500 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

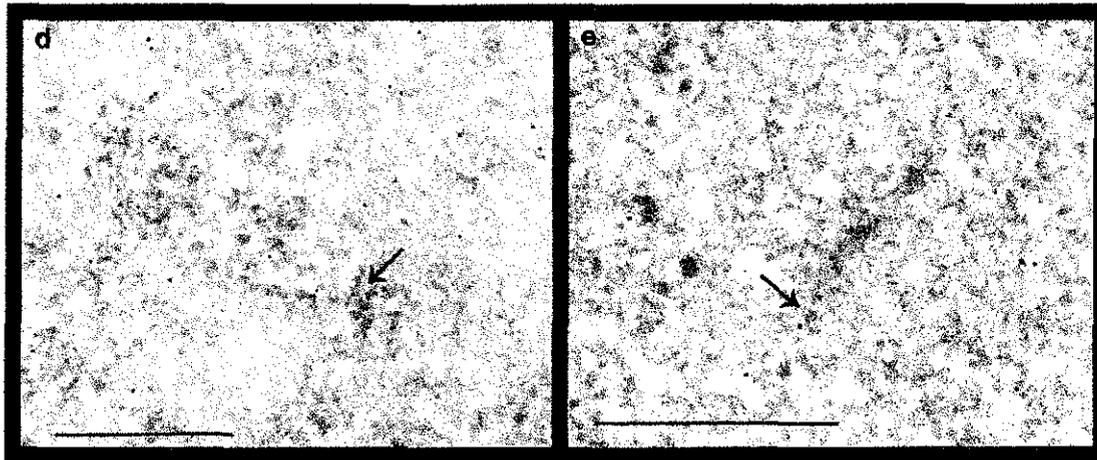


Figura 26

d) El anticuerpo anti-SM que localiza proteínas asociadas a los siRNAs, se une a las estructuras plumuladas (flecha), así como a fibrillas que se encuentran en el nucleoplasma. Es notoria la baja densidad de la marca. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 500 nm.  
e) Se observa que el inmunomarcado con el anticuerpo anti-trimetil guanostil cap que localiza a los siRNA es muy escaso. Algunos granos de oro se aprecian asociados a una estructura plumulada (flecha). Unas cuantas fibrillas en el nucleoplasma también muestran marca. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 500 nm.

localización es similar a la de la ARN polimerasa II, sin embargo es notable que la densidad de la marca es mucho menor (Figura 26).

La inmunolocalización para RNPhn mostró la presencia de marca en las finas ramificaciones que salen de las estructuras plumuladas (Figura 26).

Durante el leptoteno la inmunolocalización con un anticuerpo anti-ADN detectó la presencia de cromatina laxa a los lados de los elementos axiales en formación.

### VI. 3 Hibridación *in situ* ultraestructural

Los resultados obtenidos con la técnica de hibridación *in situ* para localizar ARN en los espermatoцитos I del cobayo y de rata, puso de manifiesto que existe marca en los diferentes estadios de la profase meiótica, así como en las espermatogonias tipo B (Figura 27). Los datos producidos en esta investigación confirma que el eje central así como las ramas laterales de los plumulados están marcados por la prueba de hibridación *in situ* para el ARN utilizando como sonda ADN genómico de cobayo y de rata en preparaciones no desnaturalizadas. Cuando pares de estructuras plumuladas se asocian originando estructuras semejantes a "escaleras de doble cuerda", el ARN se localizó en ambos ejes alineados y en los filamentos transversos que se encuentran uniendo a los ejes de las estructuras plumuladas. Se advirtió un marcado abundante en las asas radiales de los ejes cromosómicos leptoténicos en formación, lo que indica la presencia de transcripción en dichas asas. Los ejes cromosómicos están menos marcados que las asas radiales lo cual se puede deber a la gran cantidad de proteínas presentes en esta estructura (Figura 27). Durante la formación del CS durante el cigoteno mostró la presencia de ARN en los elementos laterales y el elemento central de los CS, a diferencia de lo observado durante el paquiteno donde el CS maduro está escasamente marcado o desprovisto de marca (Figura 27).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

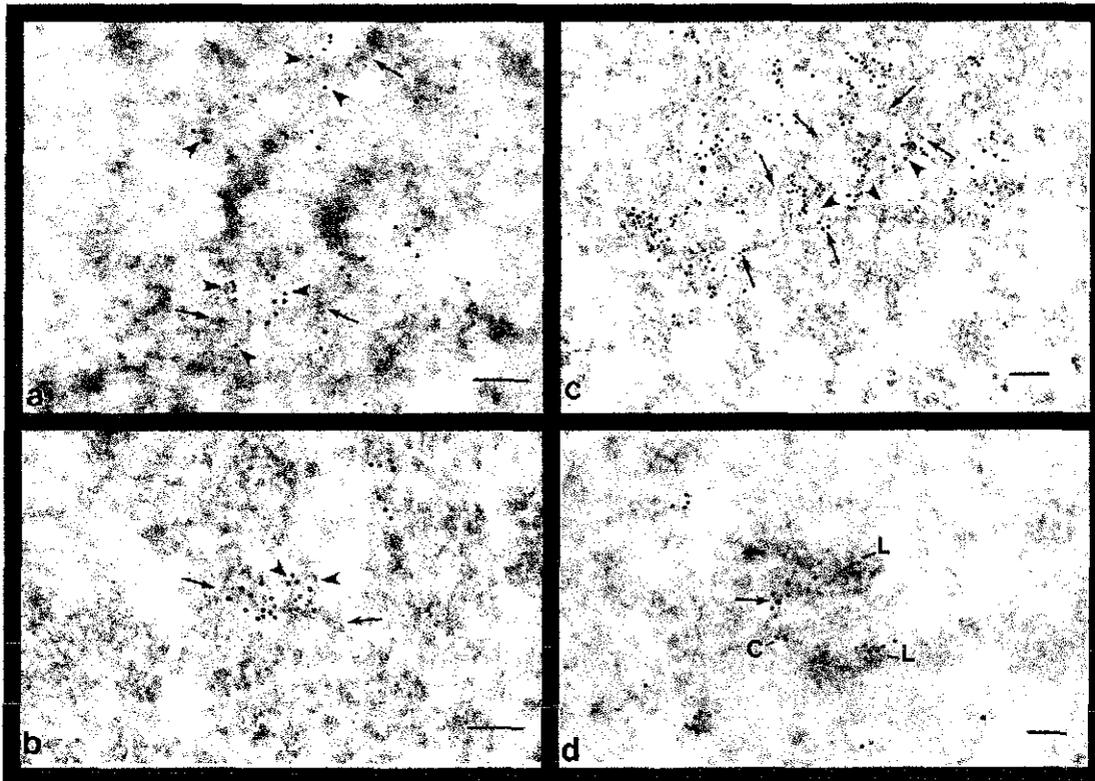


Figura 27

a, b, c y d) Hibridación in situ con sonda de ADN genómico de cobayo realizada sin desnaturalización del ADN de la muestra, lo que asegura que la sonda se unirá al ARN solamente.

a y b) Se aprecia la presencia de ARN en los ejes de los plumulados (flecha) y en los filamentos radiales (cabeza de flecha). Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 100 nm.

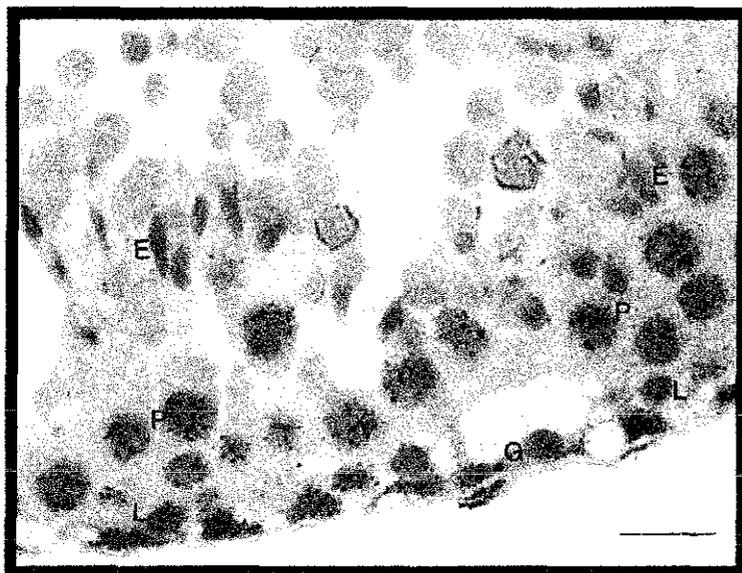
c) La región central de alineamiento de dos estructuras plumuladas está intensamente marcada indicando la presencia de ARN. Existe un intenso marcado en los filamentos que establecen uniones entre las dos estructuras plumuladas (cabeza de flecha). Las flechas señalan los ejes de los dos plumulados. Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 100 nm.

d) Se observan elementos laterales (L), así como en el elemento central (C) intensamente marcados durante la formación de un GS en un espermatozoido en cigoteno. La intensa marca indica la presencia de gran cantidad de ARN (flecha). Contraste general de acetato de uranilo-citrato de plomo. Barra 100 nm.

#### VI.4 Autorradlografía óptica

Los resultados obtenidos por este método permitieron cuantificar la cantidad de ARN en el núcleo y el citoplasma de las espermatogonias tipo B y espermatozoides en leptoteno y paquíteno. En las espermatogonias tipo B así como los espermatozoides se evidenció una intensa marca después de administrar la uridina tritiada durante 120 minutos (Figura 28). Es importante destacar que en este tiempo de incubación los espermatozoides en la etapa de paquíteno final mostraron una marca menor a las células de los estadios previos. Esto nos indica que las células durante las etapas iniciales de la profase meiótica junto con las espermatogonias tipo B tienen una alta actividad transcripcional a diferencia de los espermatozoides en paquíteno tardío que muestran una baja actividad transcripcional. Cuando se incrementó el periodo de incubación a 120 min en la uridina-3H se apreció que el citoplasma de estas células está escasamente marcado. Al cuantificar el ARN sintetizado en las espermatogonias tipo B y los espermatozoides leptoteno y paquíteno puso de manifiesto que el ARN permanece

en el núcleo, en una proporción 7/1 (ver material y métodos) con respecto al citoplasma. Estos resultados confirman que aunque existe una alta actividad transcripcional en estas células y que el ARN está siendo sintetizado, por alguna razón permanece en el interior del núcleo (Tabla 1).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 28 Autorradiografía óptica de túbulo seminífero de rata incubado 120 min en uridina tritiada, que muestra los núcleos de espermatocitos primarios intensamente marcados. Los citoplasmas están desprovistos de gránulos de plata. Espermatogonias (G), espermátocitos en leptoteno (L), espermátocitos en paquíteno (P), espermátidas (E). Contraste azul de toluidina-bórax Barra 700 nm

**Tabla 1**

Relación de la marca nuclear con la marca citoplásmica después de un puiso de 120 minutos de uridina tritiada en las espermatogonias tipo B, espermátocitos en leptoteno y paquíteno.

	*Núcleo	*Citoplasma	N/C
Espermatogonia	0.45	0.057	7.9
Leptoteno	0.77	0.09	8.6
Paquíteno Inicial	0.48	0.056	8.5
Paquíteno medio	0.33	0.045	7.3
Paquíteno Final	0.08	0.015	5.3

\*Densidad numérica de la marca

Los cocientes N/C en las espermatogonias finales y espermátocitos del leptoteno, a paquíteno medio fluctúan entre 8.6 y 7.3, mientras que en células somáticas normales son de entre 2 y 3.5.

## VII. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que: 1) El núcleo de la espermatogonia tipo B presenta dos distribuciones particulares que no se encuentran en los núcleos de otros tipos celulares. Estas estructuras especiales son los ordenamientos de cromatina condensada y extendida y las estructuras plumuladas de cromatina extendida en transcripción. 2) Las estructuras plumuladas se asocian por medio de filamentos radiales en la interfase meiótica y el preleptoteno, llevando a los ejes a un alineamiento paralelo que los relaciona por numerosos filamentos radiales de cromatina extendida que se encuentran transcribiendo y formando estructuras que semejan *escaleras de doble cuerda*. 3) El eje cromosómico aparece en el leptoteno por la incorporación de material que tñe de oscuro al filamento axial de las estructuras plumuladas. 4) Los elementos axiales conservan la apariencia de la estructura plumulada de la que derivan. 5) En algunas regiones los elementos axiales en formación están alineados en paralelo a algunos cientos de nm de distancia. 6) Los largos filamentos radiales de cromatina laxa se acortan durante el leptoteno sin alterar las relaciones de los elementos axiales. 7) El inicio del apareamiento final (sinapsis), que se manifiesta por la formación del CS puede anticiparse a la formación completa del elemento axial. 8) Las hibridaciones *in situ* ultraestructurales demostraron que las asas radiales, los filamentos axiales de la estructura plumulada, así como los filamentos transversales de las *escaleras de doble cuerda* y los elementos laterales del CS durante el proceso de formación contienen ARN. 9) La inmunolocalización de la ARN polimerasa II y de los hnRNP demostró que la cromatina laxa en las espermatogonias tipo B y espermatocitos en las etapas estudiadas están transcribiendo ARN-premensajero. 10) El mismo tipo de células presenta una débil marca inmunocitoquímica de las RNPs relacionadas con el *splicing* y de la *trimetil-guanosin cap* de los snURNs. 11) La autorradiografía óptica cuntitativa después de marcar con la uridina-3H demostró un alto rango de transcripción en las espermatogonias tipo B y espermatocitos en leptoteno, paquíteno temprano, pero una exportación extremadamente lenta del ARN al citoplasma.

Estudios recientes en la meiosis sobre aspectos genéticos, bioquímicos y citológicos, indican que el proceso de búsqueda de homología opera independientemente de la recombinación y la sinapsis (Hawley y Arbel, 1993; Roeder, 1995, 1997; Kleckner, 1996). En pocos organismos la búsqueda de homología y apareamiento se dan previamente a la meiosis. Por ejemplo, en dípteros se han descrito algunas asociaciones de cromosomas (Wandall y Svendsen, 1985) así como en ciertas levaduras (Scherthan *et al*, 1994; Weiner y Kleckner, 1994) en las que al parecer dichas asociaciones desaparecen durante la replicación del ADN en la fase S meiótica. De acuerdo con Sybenga (1999) las asociaciones entre cromosomas homólogos en etapas anteriores a la meiosis, pueden ser alteradas por los movimientos relacionados con la formación del bouquet. Existen numerosos estudios en hongos, plantas y animales que demuestran la presencia de

alineamientos de los cromosomas homólogos antes de que los telómeros se organicen formando el bouquet (Kleckner y Weiner, 1993; Scherthan *et al.*, 1996; Zickler y Kleckner, 1999). Se piensa que la búsqueda de homología y el alineamiento de los cromosomas homólogos tiene lugar durante el leptoteno y cigoteno (Cook, 1997; Scherthan *et al.*, 1996, 1998). Nuestras observaciones demuestran que el alineamiento realizado por la asociación de las asas radiales de las estructuras plumuladas, se inicia en la espermatogonia tipo B, y permanece hasta el estado del cigoteno avanzado.

Es muy importante resaltar que las espermatogonias tipo B del cobayo que son células premeióticas, muestran arreglos en paralelo de sucesiones de cromatina compacta y extendida. En esta organización de cromatina extendida que se encuentra en transcripción, se localizan las estructuras plumuladas. El número de filamentos que unen a las unidades plumuladas van aumentando progresivamente, y a la vez la distancia que existe entre ellas se va reduciendo durante la interfase meiótica y el preleptoteno. Investigaciones acerca de la distribución de los cromosomas homólogos en espermatogonias del ratón y en humanos por medio de FISH, indican que los cromosomas homólogos ocupan territorios separados en etapas previas a la meiosis (Scherthan *et al.*, 1996, 1998). Sin embargo, nuestros resultados demuestran el establecimiento de uniones entre estructuras plumuladas de cromatina laxa a través de las asas radiales en transcripción. Algunas de esas estructuras plumuladas recorren hasta la mitad del diámetro nuclear. Estos filamentos radiales delgados, son asas que no pueden seguirse en toda su longitud, porque rara vez se extienden en el plano del corte. Aun en el caso de que fueran mucho más delgadas que el grosor del corte, la superposición con otras estructuras impediría su completa visualización. Las asas radiales de los plumulados pueden corresponder a pruebas a larga distancia que se requieren para el reconocimiento de las secuencias homólogas y probablemente estén relacionadas con el alineamiento progresivo de cromosomas a distancia. Este alineamiento puede llevarse a cabo por la estabilización del reconocimiento de secuencias homólogas de manera exitosa. Por lo que las estructuras plumuladas homólogas van relacionándose de manera progresiva por numerosas uniones de los filamentos radiales formando así las *escaleras de doble cuerda* antes de iniciar la fase del leptoteno. Esta distribución de amplio reconocimiento excluye, o al menos disminuye, el entrelazamiento de cromosomas en estadios posteriores. Esta interpretación de nuestros resultados está de acuerdo con puntos de vista teóricos sobre el papel de interacciones inestables en el apareamiento (Kleckner y Weiner, 1993). La distribución tan amplia de las asociaciones de los filamentos radiales, probablemente corresponden a las uniones de múltiples loci intersticiales propuestas en estudios de la profase meiótica de levaduras (Weiner y Klecker, 1994), así como a la búsqueda de homología general, propuesta por Smithies y Powers (1986) y más desarrollada por Kleckner (1997). Aunque debemos indicar que las uniones de apareamiento aquí descritas inician su formación en la espermatogonia tipo B, que es un estadio mucho más temprano que los previamente descritos. La mayoría de los pares de las estructuras plumuladas que se encuentran ya alineadas están a una distancia menor a los 700 nm cuando se inician los movimientos del bouquet. Es por eso que debemos resaltar que nuestros resultados indican que en el cobayo la mayoría de los cromosomas homólogos se reconocen y alinean previo a la formación del bouquet.

En la etapa del leptoteno la mayoría de los elementos axiales comienzan a formarse en contacto con la envoltura nuclear como pares cortos ya alineados en paralelo a partir de los ejes cromosómicos leptoténicos intensamente teñidos. Sin embargo, esto no excluye que existan algunos elementos axiales sin aparearse y sin alinearse.

De acuerdo a nuestras observaciones, encontramos que los cambios en los espermatoцитos del cobayo no permiten hacer una división entre el leptoteno y cigoteno como lo describen los clásicos, sino más bien considerar un estadio leptoteno-cigoteno por la continuidad entre los elementos axiales y las estructuras plumuladas y/o las *escalerillas de doble cuerda*, que regularmente observamos alineadas en paralelo previo a la formación del bouquet, así como la presencia de complejos sinaptonémicos en formación, por lo que los espermatoцитos presentaron tanto características de células en leptoteno y cigoteno a la vez.

Estas observaciones no excluyen que se presentaran algunos elementos axiales aislados, lo que interpretamos como un reconocimiento de homología y alineamiento durante el pre-leptoteno no exitoso. Por lo que estos elementos axiales transitan por las etapas de leptoteno y cigoteno clásicamente descritas, caracterizadas por el desarrollo de elementos axiales largos que posteriormente se aparean cuando comienza la formación del bouquet.

La organización del bouquet es un proceso altamente conservado y único de la meiosis, el cual frecuentemente se ha propuesto que juega un papel en el apareamiento de los homólogos (Scherthan, 1995; Zickler y Kleckner, 1998). Los resultados del presente trabajo indican que la mayoría de los cromosomas homólogos se reconocen y alinean antes de la constitución del bouquet en el cobayo. Cuando se da el establecimiento del bouquet en los espermatoцитos del cobayo, ya existen uniones bien establecidas entre los cromosomas homólogos manifestadas por la presencia de fibrillas compuestas por cromatina y RNP en la zona de reconocimiento entre las regiones de los cromosomas homólogos, por lo que una posible función del bouquet podría ser el asegurar el reconocimiento de todos los cromosomas homólogos llevándolos a un punto en el cual puedan estar cercanos (Scherthan, 1995). De hecho es poco probable que cuando se desarrolla el bouquet se promueva el primer contacto entre los cromosomas homólogos. Más bien, actualmente se propone que el bouquet debe proveer un mecanismo de *backup* que congrega a los cromosomas, para que los que han fallado en encontrar su homólogo en los procesos previos, lo logren a través de la cercanía proporcionada por el bouquet (Zickler y Kleckner, 1998). Diversas evidencias experimentales sugieren que los homólogos han tenido ya un contacto inicial previo a la formación del bouquet (Zickler y Kleckner, 1998).

Con la posible excepción de la hembra de *Drosophila melanogaster* (McKee, 1996), el apareamiento efectivo está asociado con secuencias codificantes (McKee, 1998; Sybenga, 1999). Los métodos de citoquímica ultraestructural utilizados en este estudio demuestran que las uniones entre las estructuras plumuladas de cromatina extendida están constituidas por fibrillas que contienen ARN y ADN. Las inmunolocalizaciones evidencian la presencia de ADN y de la ARN polimerasa II y de proteínas RNPhn.

La digestión de las uniones entre las fibrillas de las estructuras plumuladas por la ARNasa indica la presencia de fibras de RNP nacientes, las cuales están frecuentemente localizadas en el espacio

de apareamiento y que podrían estar involucradas en el proceso de reconocimiento. Los resultados obtenidos con la hibridación *in situ* ultraestructural, confirma la presencia de ARN en las estructuras plumuladas alineadas. Todas estas evidencias experimentales, nos permiten sugerir que las estructuras plumuladas están involucradas en la búsqueda de homología, el reconocimiento de homología y el apareamiento de los homólogos.

Por medio de autorradiografía óptica se ha demostrado que existe transcripción nucleolar y extranucleolar durante la profase meiótica I en diversas plantas y animales (Taylor, 1959; Muckenthaler, 1964; Monesi, 1965; Kierszénbaum y Tres, 1974a, b; Tres, 1975; Hartung y Stahl, 1976; Söderström, 1976; Geremia *et al.*, 1977).

Es de llamar la atención que en ciertos estadios de la profase meiótica I de *Lilium* (Taylor, 1959) y de rata (Söderström, 1976), la marca en el núcleo sea mayor que la que se localiza en el citoplasma. Nuestros resultados de autorradiografía óptica demuestran que existe una intensa incorporación de uridina tritiada y una diferencia significativa entre la marca contenida en el núcleo con respecto a la del citoplasma, en el caso de las espermatogonias tipo B, y los espermatoцитos en leptoteno y en paquiteno temprano y medio. Esto coincide con observaciones cualitativas llevadas a cabo por otros grupos de investigación (Taylor, 1959; Muckenthaler, 1964; Monesi, 1965; Kierszenbaum y Tres, 1974a, b; Tres, 1975; Hartung y Stahl, 1976; Söderström, 1976; Geremia *et al.*, 1977).

La diferencia de marca entre núcleo/citoplasma se puede explicar por la salida muy lenta de ARN del núcleo. Es sorprendente que nuestros resultados son similares a los obtenidos cuando se someten células a una supresión hormonal que provoca una disminución en el transporte de ARN al citoplasma (Vázquez-Nin *et al.*, 1997).

La inmunolocalización del complejo Sm de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares y del *trimetil guanosa cap* demuestran que las pequeñas fibras radiales que unen a los plumulados no sufren *splicing* cotranscripcional. El que haya un bajo rango de *splicing* puede evitar o retrasar el transporte del ARNm al citoplasma. Es importante notar que en las espermatogonias tipo B y en los estadios tempranos de la profase meiótica las fibrillas de RNP y los gránulos intercromatinianos son abundantes, pero los gránulos pericromatinianos son escasos. Los gránulos pericromatinianos se sabe son el almacén de los ARNm o pre-ARNm de larga vida media nuclear (Vázquez-Nin y Echeverría, 1996). La transcripción tan intensa que acontece durante este periodo, la velocidad de exportación tan baja y la escasez de partículas de almacenamiento por largos periodos, apunta a que el ARN pre-mensajero es sintetizado para una función nuclear y que probablemente es hidrolizado sin salir del núcleo.

Todos estos resultados son muy atractivos, ya que muestran en las mismas células en las que el proceso de reconocimiento de homología, alineamiento y apareamiento tiene lugar. Por lo que sugerimos que tal vez el ARN pre-mensajero esté involucrado en el reconocimiento de secuencias, alineamiento y apareamiento de los cromosomas homólogos, pues como lo indican nuestros resultados se localiza en el lugar y tiempo correcto.

La mayoría de las hipótesis aceptadas para el reconocimiento de las secuencias homólogas señalan la formación de uniones inestables (paranémicas) entre dúplex de ADN intactos (Smithies

y Powers, 1986; Loidl, 1990; Kleckner et al., 1991; Kleckner y Weiner, 1993; Moens, 1994; Weiner y Kleckner; 1994; Kleckner, 1996; McKee, 1996). Tales asociaciones son reversibles y pueden proveer un mecanismo que permita el inicio del apareamiento en diversos sitios. Estas interacciones inestables pueden ser suficientes para alinear a los cromosomas (Roeder, 1997). La participación del ARN en la búsqueda de homología pocas veces se ha considerado (Cook, 1997). Sin embargo, existen algunas evidencias acerca de características enigmáticas de la transcripción durante la profase meiótica. Estudios sobre la transcripción en levaduras sugieren que durante la meiosis y esporulación hay una pérdida en la regulación de la expresión génica (Kaback y Feldberg, 1985). Este proceso puede darse también en meiocitos de otros organismos, aunque en menor grado que en los hongos (Magee, 1987; Cook, 1997). Recientemente Klenne (2001) demuestra la sobreexpresión de ARNm, así como la presencia de una transcripción alterada en células meióticas de mamífero. Esto coincide con nuestros resultados en los que aparentemente el ARNm no tiene una función específica en la meiosis. El que se presenten hebras sencillas de ARN puede permitir un reconocimiento de secuencias complementarias más eficientemente que una doble cadena de ADN, así como el establecimiento de uniones durante la búsqueda de homología. Pensamos que la participación del ARN en el proceso de búsqueda y homología de secuencias complementarias permite que el proceso sea menos complejo. Es interesante señalar que se detectó ARN por medio de hibridación in situ en el elemento lateral y en una proporción menor en el elemento central y las fibrillas transversales de los CS en formación durante el cigoteno. En el estadio de paquiteno el ARN no se evidenció en ninguno de los componentes del CS ya formado. Estos resultados son coherentes con las observaciones previas realizadas por Vázquez-Nin y Echeverría (1976) en las que utilizaron métodos de tinción preferencial para RNP e hidrólisis enzimáticas. Sin embargo se ignora la función que desempeña dicho ARN. Durante el desarrollo del CS los elementos laterales están en contacto con cromatina compacta y abundantes hebras de cromatina en proceso de compactación que parecen rodear el CS en formación y relacionarse con la terminación en crecimiento. La escasez de continuidad entre el eje cromosómico leptoténico y el elemento lateral del CS en proceso de integración sugiere que la transformación a elemento lateral del CS es simultánea con el crecimiento del mismo. Esta fase de crecimiento probablemente está centrada en estructuras de doble cuerda o plumuladas. Este evento está acompañado también por un importante rearreglo de la cromatina, la cual frecuentemente aparece como una maya de fibras condensadas alargadas en varias direcciones asociadas con el extremo del CS en crecimiento.

En cuanto a la constitución de los elementos laterales del CS, se han descrito como estructuras dobles en espermatozoides de rata (Sotelo y Trujillo-Cenoz, 1958), de paloma (Nebel y Coulon, 1962), así como en otros animales y plantas (Moses, 1968). Esta disposición doble se ha interpretado como la representación de las dos cromátidas de cada uno de los cromosomas (Nebel y Coulon, 1962; Baker y Franchi, 1967; Moses, 1968). Sin embargo, nuestros resultados indican que en la rata y en el cobayo los filamentos de ADN son muy delgados y no corresponden al espesor de los filamentos que se distinguen en la estructura proteica de los elementos laterales. Coleman y Moses (1964) estudiaron la distribución del ADN en el CS maduro en paquiteno por

medio de la tinción de tricloruro de indio complementado con hidrólisis con DNasa. Ellos concluyeron que no existe o que existe muy poco ADN en el elemento central, y que el espacio central esta atravesado por unas cuantas fibras que contienen ADN. Estos datos coinciden con estudios de inmunolocalización de ADN ultraestructural realizados por Vázquez-Nin y col (1993). Nuestros resultados muestran en cortes frontales de CS paquiténicos que los filamentos que contienen ADN se encuentran en la cara interna de los elementos laterales (Figuras 20 y 22), así como en los cortes oblicuos del CS frecuentemente observamos la presencia de dos filamentos paralelos que contienen ADN. Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos por Coleman y Moses (1964).

Algunas asas cortas que se originan en los filamentos de cromatina descansan en el lado interno de los elementos laterales localizándose en el espacio central, siendo probablemente estas asas alargamientos de las cromátidas homólogas que pueden interactuar con los nódulos de recombinación y eventualmente participar en la recombinación.

A partir de CS puros se ha aislado y secuenciado el ADN (Pearlman et al., 1992). Al estudiar las características de los fragmentos de ADN que se encuentran asociados al CS se ha demostrado que presentan microsátélites y repeticiones múltiples de GT/CA, así como fragmentos de secuencias LINE y SINE, las cuales se interpretan como secuencias de unión especializadas (Pearlman et al., 1992; Moens, 1994; Moens et al., 1998). Las asas de ADN que descansan dentro del elemento lateral probablemente corresponden a estas secuencias asociadas a las proteínas del elemento lateral.

Con todos los resultados obtenidos en esta investigación podemos proponer la secuencia de los eventos que se pueden dar durante las etapas premeióticas e iniciales de la meiosis durante la búsqueda y reconocimiento de secuencias mediado por el ARN:

1. La búsqueda de secuencias homólogas a larga distancia comienza en la espermatogonia tipo B y se manifiesta por los ordenamientos de cromatina compacta y laxa y las estructuras plumuladas que se encuentran en transcripción.
2. El reconocimiento de secuencias homólogas a distancia en interfase meiótica, se manifiesta por la presencia de filamentos radiales uniendo los ejes de los plumulados que se encuentran en transcripción y que contienen ADN y gran cantidad de RNPs.
3. El alineamiento de secuencias homólogas en interfase meiótica y leptoteno, puede ser advertida por la presencia de *escalerillas de doble cuerda* y elementos axiales alineados en paralelo al inicio de su formación.
4. El apareamiento final de regiones homólogas en leptoteno y cigoteno, corresponde a la formación de los ejes cromosómicos alineados en paralelo y a la constitución de CS.

## VIII. CONCLUSIONES

- 1.- En el núcleo de las espermatogonias tipo B se inicia la búsqueda de homología de los cromosomas, manifestada por la presencia de estructuras que no se encuentran en el núcleo de células en interfase. Estas estructuras son sucesiones de cromatina laxa y compacta, así como estructuras plumuladas constituidas por cromatina, fibras y gránulos de ribonucleoproteínas. Estos eventos de búsqueda de homología son exclusivos de las células germinales (espermatogonias tipo B, células en interfase meiótica, leptoteno y cigoteno).
- 2.- Las *escaleras de doble cuerda* que aparecen en la interfase meiótica son la expresión de la búsqueda de homología exitosa, proceso que clásicamente se pensaba sucedía en el cigoteno de la profase meiótica.
- 3.- La hibridación in situ a nivel de microscopía electrónica demuestra que el ARN se localiza en la zona de reconocimiento y alineación de las regiones homólogas en las estructuras plumuladas y en las *escaleras de doble cuerda*.
- 4.- Las inmunolocalizaciones evidencian que el ARN mensajero es sintetizado en grandes cantidades en las estructuras plumuladas y que el procesamiento del ARNm es poco frecuente.
- 5.- La autorradiografía óptica señala que el ARN transcrito permanece periodos largos en el núcleo o que nunca es exportado al citoplasma en las espermatogonias tipo B, células de la interfase meiótica, leptoteno, cigoteno y paquiteno temprano.
- 6.- El eje axial en el leptoteno conserva las estructuras plumuladas de las que se origina y con las que mantiene continuidad.
- 7.- La mayor parte de los ejes axiales durante el leptoteno se forman como pares de elementos uno frente al otro simultáneamente en los ejes más cercanos y alineados, aunque esto no excluye la presencia de elementos axiales aislados.
- 8.- El CS comienza a desarrollarse antes de que los elementos axiales estén completamente formados.

## IX. PERSPECTIVAS

El que se demuestre que a partir de las espermatogonias tipo B se inicia la búsqueda de homología plantea nuevas interrogantes, en cuanto a si es un mecanismo que se pueda presentar en otro tipo de organismos como un mecanismo de búsqueda más universal. La sugerencia de que el reconocimiento de secuencias pueda estar mediado por el ARNm desde etapas premeioticas y durante la meiosis, abre la posibilidad de estudiar con mayor detalle la transcripción durante este periodo, así como el papel que pudiera estar teniendo el ARN en la búsqueda de homología. Si efectivamente el ARN es el que media el reconocimiento de homología, habría que analizar si se establecen relaciones ARN-ARN y/o relaciones ARN-ADN.

Otro aspecto de interés que se abre a partir de nuestros resultados es si las proteínas descritas como parte de los elementos axiales y laterales como la SCP3 y SCP2 forman parte de las estructuras plumuladas o de las escalerillas de doble cuerda.

Es probable que estas proteínas se incorporen hasta que el eje cromosómico se comienza a formar. Nuestras observaciones señalan que en el cigoteno se inicia el desarrollo del CS a partir de los ejes cromosómicos en crecimiento. Esto plantea la interrogante de cómo estas proteínas estructurales del CS se ensamblan a los elementos axiales o de cómo podrían estar en las estructuras plumuladas. Otro aspecto de interés sería valorar el efecto de los inhibidores de la transcripción sobre la ultraestructura y la citofisiología de la meiosis.

## X. REFERENCIAS

- Anderson L., Stack S., Todd R. and Ellis R. 1994. A monoclonal antibody to lateral element proteins in synaptonemal complexes of *Lilium longiflorum*. *Chromosoma* 103: 357-367.
- Anderson L.K., Offenberg H.H., Verkuijlen W.M.H.C. and Heyting C. 1997. RecA-like proteins are components of early nodules in lily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 6868-6873.
- Anderson L.K., Reeves A., Webb L.M. and Ashley T. 1999. Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics* 151: 1569-1579.
- Ashley T., Plug A., Xu J., Solari A., Reddy G., Golub E. and Ward D. 1995. Dynamic changes in Rad51 distribution on chromatin during meiosis in male and female vertebrates. *Chromosoma* 104: 19-28.
- Bähler J., Wyler T., Loidl J. and Kohli J. 1993. Unusual nuclear structures in meiotic prophase of fission yeast: a cytological analysis. *J. Cell Biol.* 121: 241-256.
- Baker T.G. and Franchi L.L. 1967. The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries. *J. Cell Sci.* 2: 213-224.
- Barlow A.L., Benson F.E., West S.C. and Hulten M.A. 1997. Distribution of the Rad51 recombinase in human and mouse spermatocytes. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 16: 5207-5215.
- Batanian J. and Hulten M. 1987. Electron microscopic investigation of synaptonemal complexes in a infertile human male carrier of a pericentric inversion inv(1)(p32q42). *Hum. Genet.* 76: 81-89.
- Bernhard W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27: 250-265.
- Biggiogera M., Fakan S., Kaufmann S.H., Black A., Shaper J.H. and Bush H. 1989. Simultaneous immunoelectron microscopic visualization of protein B23 and C23 distribution in the HeLa cell nucleolus. *J. Histochem. Cytochem.* 9: 1371-1374.
- Biggiogera M. and Fakan S. 1998. A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27: 250-265.
- Bishop D.K., Park D., Xu L. and Kleckner N. 1992. DMC1: A meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* 69: 439-456.
- Callan H.G. 1972. Replication of DNA in the chromosomes of eukaryotes. *Proc. Royal Soc. Lon. B* 181: 19-41.
- Carpenter A. 1975. Electron microscopy of meiosis in *Drosophila melanogaster* females: II: The recombination nodule - a recombination-associated structure at pachytene? *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72: 3186-3189.
- Carpenter A. 1979a. Recombination nodules and synaptonemal complex in recombination-defective females of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 75: 259-292.

- Carpenter A. 1979b. Synaptonemal complex and recombination nodules in wild-type *Drosophila melanogaster* females. *Genetics* 92: 511-541.
- Carpenter A.T.C. 1994. The recombination nodule story - Seeing what you are looking at. *BioEssays* 16: 69-74.
- Chandley A.C. 1986. A model for effective pairing and recombination at meiosis based on early replicating sites (R-bands) along chromosomes. *Hum. Genet.* 72: 50-57.
- Clermont Y. 1960. Cycle of the seminiferous epithelium of the guinea pig. A method for identification of the stages. *Fertil. Steril.* 6: 563-573.
- Cogliati R. and Gautier A. 1973. Mise en évidence de l'ADN et des polysaccharides á l'aide d'un nouveau réactif de type Schiff. *C R Acad. Sci. D* 276: 3041-3044.
- Coleman J. and Moses M. 1964. DNA and the fine structure of synaptic structures in the domestic rooster. *J. Cell Biol.* 23: 63-78.
- Comings D.E. and Riggs A.D. 1971. Mechanisms of chromosome pairing during meiosis. *Nature* 227: 451-456.
- Cook P.R. 1997. The transcriptional basis of chromosome pairing. *J. Cell Sci.* 110: 1033-1040.
- Darlington C.D. 1931. Meiosis. *Biol. Rep.* 6: 221-264.
- Dawe R.K. 1998. Meiotic chromosome organization and segregation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 371-395.
- de los Santos T. and Hollingsworth N.M. 1999. Red1p, a MEK1-dependent phosphoprotein that physically interacts with Hop1p during meiosis in yeast. *J. Biol. Chem.* 274: 1782-1790.
- Di Carlo A., Travia G. and De Felici M. 2000. The meiotic specific synaptonemal complex protein SCP is expressed by female and male primordial germ cells of the mouse embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 44: 241-244.
- Drapkin R., Sancar A. and Reinberg D. 1994. Where transcription meets repair. *Cell* 77: 9-12.
- Eddy E.M. and O'Brien D.A. 1998. Gene expression during mammalian meiosis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 37: 141-200.
- Eijpe M., Heyting C., Gross B. and Jessberger R. 2000. Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *J. Cell Sci.* 113: 763-682.
- Esponda P. and Stockert J.C. 1971. Localization of RNA in the synaptonemal complex. *J. Ultrastruct. Res.* 35: 411-417.
- Esponda P. and Jimenez-Martin C. 1973. The attachment of synaptonemal complex to the nuclear envelope. An structural and cytochemical analysis. *Chromosoma* 30: 405-417.
- Esponda P. and Jiménez-Martín C. 1975. Nucleolar organizer ultrastructure in *Allium cepa*. *Chromosoma* 52: 73-87.
- Esponda P. 1981. El complejo sinaptonémico y la estructura del cromosoma meiótico. *Bioteria-Genética* II: 83-123.
- Esquivel C., Rovira P., Echeverría O.M. and Vázquez Nin G.H. 1987. A simple staining method for chromatin in electron microscopy compatible with serial sectioning. *Ultramicroscopy* 21: 103-109.
- Fawcett D.W. 1956. The fine structure of chromosome in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 403-406.

- Friedman B., Bouchard R. and Stern H. 1982. DNA sequences repaired at pachytene exhibit strong homology among distantly related higher plants. *Chromosoma* 87: 409-424.
- Fussell C.P. 1987. The Rab1 Orientation: A prelude to synapsis. In *Meiosis*. Ed. Moens P.B. Academic Press. USA.
- Geremia R., Boitani C., Conti M. and Monesi V. 1977. RNA synthesis in spermatocytes and spermatids and preservation of meiotic RNA during spermiogenesis in the mouse. *Cell Differentiation* 5: 343-355.
- Gerke V. and Steitz J.A. 1986. A protein associated with small nuclear ribonucleoprotein particles recognizes the 3' splice site of pre-messenger RNA. *Cell* 47: 973-984.
- Gillies C.B. 1975. Synaptonemal complex and chromosome structure. *Annu. Rev. Genet.* 9: 91-109.
- Glamann J. 1986. Crossing over in the male mouse as analysed by recombination nodules and bars. *Carlsberg Res. Commun.* 51: 143-162.
- Haber J.E. 1998. Meiosis: Avoiding inappropriate relationships. *Curr. Op. Cell Biol.* 8: R832-R835.
- Hartung H. and Stahl A. 1976. Incorporation of tritiated uridine during pachytene and diplotene stages in the oocytes of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Experientia* 32: 96-97.
- Hasenkampf C.A. 1996. The synaptonemal complex - a chaperone of crossing over. *Chromosome Res.* 4: 133-140.
- Hawley R.S. and Arbel T. 1993. Yeast genetics and the fall of the classical view of meiosis. *Cell* 72: 301-303.
- Heyting C., Dietrich A.J.J., Redeker E.J.W. and Vink A.C.G. 1985. Structure and composition of synaptonemal complex, isolated from rat spermatocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 36: 307-314.
- Heyting C. 1996. Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr. Op. Cell Biol.* 8: 389-396.
- Heyting C., Dettmers R., Dietrich A., Redeker E. and Vink A. 1988. Two major components of synaptonemal complex are specific for meiotic prophase nuclei. *Chromosoma* 96: 325-332.
- Holliday R. 1977. Recombination and meiosis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 277: 359-370.
- Hotta Y. and Stern H. 1981. Small nuclear molecules that regulate nuclease accessibility in specific chromatin regions of meiotic cells. *Cell* 27: 309-319.
- Ikeya T., Shinohara A., Sato S., Tabaka S. and Ogawa T. 1996. Localization of mouse Rad1 and Lim15 proteins on meiotic chromosomes at late stages of prophase I. *Genes Cells* 1: 379-389.
- Jenkins G. and Okumus A. 1992. Indiscriminate synapsis in achiasmatic *Allium fistulosum* L. (Liliaceae). *J. Cell Sci.* 103: 415-422.
- John B. 1990. *Meiosis*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Jones H. 1973. Light and electron microscope studies of chromosome pairing in relation to chiasma localization in *Stethophyma grossum* (Orthoptera: Acrididae). *Chromosoma* 42: 145-162.
- Jones R.E., Okamura C.S. and Martin T.E. 1980. Immunofluorescent localization of the proteins of nuclear ribonucleoprotein complexes. *J. Cell Biol.* 86: 235-243.
- Kaback D.B. and Feldberg L.R. 1985. Yeast cells exhibit a sporulation-specific temporal program of transcript accumulation. *Mol. Cell Biol.* 5: 751-761.
- Karpova O., Penkina M., Dadashev S., Mil'shina N., Hernandez J., Radchenko Y and Bogdanov Y.

1995. Features of primary structure of DNA from the synaptonemal complex of the golden hamster. *Mol. Biol. (Mosk)* 29: 512-521.
- Kierszenbaum A.L. and Tres L.L. 1974 a. Nucleolar and periochromosomal RNA synthesis during meiotic prophase in the mouse testis. *J. Cell Biol.* 60: 39-53.
- Kierszenbaum A.L. and Tres L.L. 1974 b. Transcriptional sites in spread meiotic prophase chromosomes from mouse spermatocytes. *J. Cell Biol.* 63: 923-925.
- Kim W.Y. and Dahmus M.E. 1986. Immuno-cytochemical analysis of mammalian RNA polymerase II subspecies. Stability and relative in vivo concentration. *J. Biol. Chem.* 261: 14219-14225.
- Kleckner N., Padmore R. and Bishop D.K. 1991. Meiotic chromosome metabolism: one view. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 56: 729-743.
- Kleckner N. and Weiner B.M. 1993. Potential advantages of unstable interactions for pairing of chromosomes in meiotic, somatic and premeiotic cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58: 553-565.
- Kleckner N. 1996. Meiosis: How could it work? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8167-8174.
- Kleckner N. 1997. Interactions between and along chromosomes during meiosis. *The Harvey Lectures* 91: 21-45
- Kleene K.C. 2001. Possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mechanisms of Development* 106: 3-23.
- Klein F., Mahr P., Galova., M., Buonomo S.B.C., Michaelis C., Nairz K. and Nasmyth K. 1999. A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* 98: 91-103.
- Kurata N. and Ito M. 1978. Electron microscope autoradiography of <sup>3</sup>H-thymidine incorporation during zygotene stage in microsporocytes of Lily. *Cell Struct. Function* 3: 349-356.
- Langer P.R., Waldrop A.A. and Ward D.C. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 6633-6637.
- Latos-Bielenska A. Trautmann and Vogel W. 1990. Visualization of DNA in pachytene by monoclonal antibodies against BrdU reveals synaptonemal complex-like structures. *Cytogenet. Cell Genet.* 54: 24-28.
- Leblond C.P. and Clermont Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N Y Acad. Sci.* 55: 548-569.
- Lerner E.A., Lerner M.R., Janeway C.A. and Steitz J.A. 1981. Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituents: probes for molecular biology and autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2737-2741.
- Loidl J. 1990. The initiation of meiotic chromosome pairing: the cytological view. *Genome* 33: 759-778.
- Loidl J. 1994. Cytological aspects of meiotic recombination. *Experientia* 50: 285-294.
- Loidl J., Nairz K. and Klein F. 1991. Meiotic chromosome synapsis in haploid yeast. *Chromosoma* 100: 221-228.
- López-Velázquez G., Segura-Váldez L., Alcantara-Otigoza M.A. and Jiménez-García L.F. 1998. Localization of intranuclear RNA by electron microscopy in situ hybridization using a genomic DNA

- probe. Arch. Med. Res. 29: 185-190.
- Loseva E., Kolomiets O., Il'inskaia L. and Bashkirov V. 1996. Localization of RecA-like proteins in preparations of spread nuclei of mouse spermatocytes at meiotic prophase I. Genetika 32: 523-531.
- Magee PT. 1987. Transcription during meiosis. In Moens PB, Ed. Meiosis. Orlando: Academic Press.
- Maguire M.P. 1995. Is the synaptonemal complex a disjunction machine? J Heredity 86: 330-340.
- McKee B.D. 1996. The license to pair: identification of meiotic pairing sites in *Drosophila*. Chromosoma 105: 135-141.
- McKee BD. 1998. Pairing sites and the role of chromosome pairing in meiosis and spermatogenesis in male *Drosophila*. In Handel MA, Ed. Meiosis and gametogenesis. San Diego: Academic Press.
- Miyazaki W.Y. and Orr-Weaver T.L. 1994. Sister-chromatid cohesion in mitosis and meiosis. Ann. Rev. Genet. 28: 167-187.
- Moens P.B., Heyting C., Dietrich A.J.J., van Raamsdonk W. and Chen Q. 1987. Synaptonemal complex antigen location and conservation. J. Cell Biol. 105: 93-103.
- Moens P.B. and Pearlman R.E. 1988. Chromatin organization at meiosis. Bio Essays. 9: 151-161.
- Moens P.B. 1994. Molecular perspectives of chromosome pairing at meiosis. BioEssays 16: 101-106.
- Moens P.B., Pearlman R.E., Traut W. and Heng H.H.Q. 1998. Chromosome cores and chromatin at meiotic prophase. Curr. Top. Dev. Biol. 37: 241-262.
- Monesi V. 1964. Ribonucleic acid synthesis during mitosis and meiosis, in the mouse testis. J. Cell Biol. 22: 521-532.
- Monesi V. 1965. Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse. Exp. Cell Res. 39: 197-224.
- Monesi V., Geremia, R., D'Agostino A. and Biotani C. 1978. Biochemistry of male germ cell differentiation in mammals. RNA synthesis in meiotic and postmeiotic cells. Curr. Top. Dev. Biol. 12: 11-36.
- Moses M.J. 1956. Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2: 215-218.
- Moses M.J. 1968. Synaptonemal complex. Annu. Rev. Genet. 2: 363-412.
- Moses M.J. 1969. Structure and function of synaptonemal complex. Genetics 61 Suppl. 1: 41-51.
- Muckenthaler FA. 1964. Autoradiographic study of nucleic acids synthesis during spermatogenesis in the grasshopper, *Melanoplus differentialis*. Exp. Cell Res. 35: 531-547.
- Nebel B.R. and Coulon E.M. 1962. The fine structure of chromosomes in pigeon spermatocytes. Chromosoma 13: 272-291.
- Offenberg H.H. Dietrich A.J.J. and Heyting C. 1991. Tissue distribution of two major components of synaptonemal complexes of the rat. Chromosoma 101: 83-91.
- Paniagua, R., Nistal M., Sesma M.P., Alvarez-Uría M. y Fraile B. 1993. Citología e Histología Vegetal y Animal. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid
- Passy S.I., Yu X., Li Z., Radding Ch. M., Masson J.Y., West S. and Egelman E.H. 1999. Human Dmc1

- protein binds DNA as an octameric ring. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 10684-10688.
- Pathak S. and Hsu T.C. 1979. Silver stained structures in mammalian meiotic prophase. Chromosoma 70: 195-203.
- Pearlman R., Tsao N. and Moens P. 1992. Synaptonemal complexes from DNase-treated rat pachytene chromosomes contain (GT)<sub>n</sub> and LINE/SINE sequences. Genetics 130: 865-872.
- Peltari J., Hoja M.R., Yuan L., Liu J.G., Brundell E., Moens P., Santucci-Darmanin S., Jessberger R., Barbero J.L., Heyting C. and Höög C. 2001. A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. Mol. Cell. Biol. 21: 5667-5677.
- Plug A.W., Xu J., Reddy G., Golub E.I. and Ashley T. 1996. Presynaptic association of Rad 51 protein with select sites in meiotic chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5920-5924.
- Prescott D.M. 1976. Reproduction in eukaryotic cells. Academic Press. New York.
- Puvion-Dutilleul F. and Puvion E. 1980. New aspects of intranuclear structures following partial decondensation of chromatin: A cytochemical and high resolution autoradiographical study. J. Cell. Sci. 42: 305-321.
- Rasmussen S.W. 1977. Meiosis in *Bombix mori* females. Phil. Trans. R. Soc. B. 277: 343-350.
- Rhoades M.M. 1961. Meiosis. In Brachet J, Mirsky AE, editors. The Cell: Biochemistry, Physiology, and Morphology, Vol. 3. Meiosis and Mitosis. New York: Academic Press.
- Rockmill B., Sym M., Scherthan H. and Roeder G. 1995. Roles of two RecA homologues in promoting meiotic chromosome synapsis. Genes Dev. 9: 2684-2695.
- Roeder G.S. 1995. Sex and the single cell: Meiosis in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 10450-10456.
- Roeder G.S. 1997. Meiotic chromosomes: It takes two to tango. Gen. Dev. 11: 2600-2621.
- Sakaguchi K., Takagami M.H. and Ito M. 1983. Inhibition of RNA synthesis in meiotic cells and effect on meiotic development. Cell Struct. Func. 8: 127-135.
- Satyanarayana K. and Strominger J. 1992. DNA sequences near a meiotic recombinational breakpoint within the human HLA-DQ region. Immunogenetics 35: 235-240.
- Schalk J.A.C., Dietrich A.J.J. Vink A.C.G., Offenbergh H.H., van Aalderen M. and Heyting C. 1998. Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. Chromosoma 107: 540-548.
- Sekelsky J.J. and Hawley R.S. 1995. The bond between sisters. Cell 83: 157-160.
- Sherman J.D. Herickhoff L.A. and Stack M.S. 1992. Silver staining two types of meiotic nodules. Genome 35: 907-915.
- Scherthan H., Bähler J. and Kohli J. 1994. Dynamics of chromosome organization and pairing during meiotic prophase in fission yeast. J. Cell Biol. 127: 273-285.
- Scherthan H. 1995: Chromosome behaviour in earliest meiotic prophase. In Chromosoma Today. Ed. H. Gill J.S Parker and M. Puertas.
- Scherthan H., Weich S., Schwegler H., Heyting C., Härle M. and 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.

- Scherthan H., Elis R., Trelles-Sticken E., Dietsel S., Cremer T., Walt H. and Jauch A. 1998. Aspects of three-dimensional chromosome reorganization during the onset of human male meiotic prophase. *J. Cell Sci.* 111: 2337-2351.
- Schmekel K. and Daneholt B. 1995. The region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions. *Trends Cell Biol.* 5: 239-242.
- Schmekel K., Meuwissen R.L.J., Dietrich A.J.J., Vink A.C.G., van Marle J. van Veen H. and Heyting C. 1996. Organization of SCP1 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Exp. Cell Res.* 226: 20-30.
- Schulz-Schaeffer J. 1980. *Cytogenetics: Plants, Animals, Human.* Springer-Verlag, New York
- Shinohara A., Ogawa H., Matsuda Y., Ushio N., Ikeo K. and Ogawa T. 1993. Cloning of human, mouse, and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and RecA. *Nature Genet.* (Lond.) 4: 239-243.
- Smith A. and Benavente R. 1992. Identification of a structural protein component of rat synaptonemal complexes. *Exp. Cell Res.* 198: 291-297.
- Smithies O. and Powers P. (1996) Gene conversion and their relation to homologous chromosome pairing. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 312: 291-302.
- Söderström K.O. 1976. Characterization of RNA synthesis in mid-pachytene spermatocytes of the rat. *Exp. Cell Res.* 102: 327-245.
- Solari A.J. 1972. Ultrastructure and composition of the synaptonemal complex in spread and negatively stained spermatocytes of the golden hamster and the albino rat. *Chromosoma* 39: 231-263.
- Solari, A.J. 1999. *Génética Humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina.* 2ª Ed. Panamericana Argentina.
- Sotelo J.R. 1969. Ultrastructure of chromosomes at meiosis. In: Lima de Faria A. Ed. *Handbook of molecular cytology.* North-Holland, Amsterdam.
- Sotelo J.R. and Trujillo-Cenoz O. 1958. Microscopic structure of meiotic chromosomes during prophase. *Exp. Cell Res.* 14: 1-8.
- Stack S. 1973. The synaptonemal complex and the achiasmatic condition. *J. Cell Sci.* 13: 83-95.
- Stern H. 1993. The process of meiosis. In *Cell and Molecular Biology of the Testis.* De Claude Desjardins and Larry L. Ewing Eds. New York Oxford.
- Storlazzi A., Xu L., Schwacha A. and Klecker N. 1996. Synaptonemal complex (SC) component Zip1 plays a role in meiotic recombination independent of SC polymerization along the chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93: 9043-9048.
- Swanson C.P., Merz T. and Young W.J. 1981. *Cytogenetics: the chromosoma in division inheritance and evolution.* Prentice Hall, Englewood Cliffs, New York. 2ª Edición.
- Sybenga J. 1999. What makes homologous chromosomes find each other in meiosis. A review and an hypothesis. *Chomosoma* 108: 209-219.
- Sym M., Engebrecht J. and Roeder S. 1993. ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell* 72: 365-378.
- Sym M. and Roeder S. 1994. Crossover interference is abolished in the absence of a synaptonemal

- complex protein. *Cell* 79: 283-292.
- Sym M. and Roeder G. 1995. Zip1-induced changes in synaptonemal complex structure and polycomplex assembly. *J. Cell Biol.* 128: 455-466.
- Tarsounas M., Pearlman R.E., Gasser P.J., Park M. S. and Moens P.B. 1997. Protein-Protein interactions in synaptonemal complex. *Mol. Biol. Cell* 8: 1405-1414.
- Tarsounas M., Pearlman R.E. and Moens P.B. 1999. Meiotic activation of rat pachytene spermatocytes with okadaic acid: the behaviour of synaptonemal complex components SYN1/SCP1 and COR1/SCP3. *J. Cell Sci.* 112: 423-434.
- Taylor J.H. 1959. Autoradiographic studies of nucleic acids and protein during meiosis in *Lilium longiflorum*. *Am. J. Bot.* 46: 477-484
- Terasawa M., Shinohara A., Hotta Y., Ogawa H. and Ogawa T. 1995. Localization of RecA-like recombination proteins on chromosomes of lily at various meiotic stages. *Genes and Development* 9: 925-934.
- Tres L.L. 1975. Nucleolar RNA synthesis of meiotic prophase spermatocytes in the human testis. *Chromosoma* 53: 141-151.
- Vázquez-Nin, G.H. and Echeverría, O.M. 1976. Ultrastructural study on the meiotic prophase nucleus of rat oocyte. *Acta Anatomica (Basel)* 96: 218-231.
- Vázquez-Nin G.H., Ortiz A., López A. and Echeverría O.M. 1989. Electron microscope study of ribonucleoprotein polyparticles and their relation to perichromatin granules. *Biol. Cell* 65: 133-138.
- Vázquez-Nin G.H., Flores E., Echeverría O.M., Merkert H., Wettstein R. and Benavente R. 1993. Immunocytochemical localization of DNA in synaptonemal complexes of rat and mouse spermatocytes, and chick oocytes. *Chromosome* 102: 457-463.
- Vázquez-Nin G.H., Biggiogera M. and Echeverría O.M. 1995. Activation of osmium ammine by SO<sub>2</sub>-generating chemicals for electron microscopy Feulgen-type staining of DNA. *Eur. J. Histochemistry* 39: 101-106.
- Vázquez-Nin G.H. and Echeverría O.M. 1996. The polytene nucleus in morphological, cytochemical, and functional studies of messenger RNA transcription, processing and transportation. *Eur. J. Histochem.* 40: 7-16.
- Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M., Ortiz R., Ubaldo E. and Fakan S. 1997. Effects of hypophyseal hormones on transcription and RNA export to the cytoplasm. *Exp. Cell. Res.* 236: 519-526.
- von Wettstein D., Rasmussen S.W. and Holm P.B. 1984. The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu. Rev. Genet.* 18: 331-413.
- Wandall A. and Svendsen A. 1985. Transition from somatic to meiotic pairing and progression changes of the synaptonemal complex. *Chromosoma* 92: 254-264.
- Weiner B.M. and Kleckner N. 1994. Chromosome pairing via multiple interstitial interactions before and during meiosis yeast. *Cell* 77: 977-991.
- Welsch B. 1973. Synaptonemal complex und chromosomenstruktur in der achiasmatischen Spermatogenese von *Panorpa communis* (Mecoptera). *Chromosoma* 43: 19-74.
- Wettstein R. and Graver A. 1973. Film-supporting frames for mounting sections grids. *J. Ultrastruct.*

Res. 43: 436-447.

Wolfe S.L. 1972. *Biology of the cell*. Belmont Cal. Wadsworth Publishing Company.

Wolstenholme D.R. and Meyer G.F. 1966. Some facts concerning the nature and formation of axial core structures in spermatids of *Gninus domesticus*. *Chromosoma* 18: 272-280.

Yuan L., Brundell E., Bjorkroth B., Daneholt B. and Höög C. 1996. Localization of the N-terminus of SCP1 to the central element of the synaptonemal complex and evidence for direct interactions between the N-terminus of SCP1 molecules organized head-to-head. *Exp. Cell Res.* 226: 11-9.

Yuan L., Pettari J., Brundell E., Bjorkroth B., Zhao J., Liu J.G., Brismar H., Daneholt B., and Höög C. 1998. The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded, cross-striated fibers in vivo. *J. Cell Biol.* 142: 331-339.

Zickler D. and Kleckner N. 1998. The leptotene-zigotene transition of meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 32: 619-697.

Zickler D. and Kleckner N. 1999. Meiotic chromosomes: Integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* 33: 603-754.

## XI. AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin, quien ha sido un paciente maestro y me ha apoyado a lo largo de estos años de estudios, siendo un tutor excepcional que me ha mostrado que es un maestro y científico extraordinario.

A la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, por toda su experiencia y enseñanza aportada durante esta investigación con consejos siempre acertados. Muchas gracias por su apoyo incondicional durante todo este tiempo.

A la Dra. Sara Frías Vázquez, por haber aceptado ser parte de mi comité tutorial, colaborar con sus comentarios en el desarrollo del trabajo experimental y haberme enriquecido con su opinión todo este tiempo.

A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, por haber aceptado ser parte del comité tutorial y colaborar con sus sugerencias en este trabajo y haber sido una influencia positiva en mi desarrollo académico.

Al M. en C. Gabriel López Velázquez por haber tenido la disposición y paciencia al enseñarme todo lo relacionado con la metodología de la hibridación *in situ* ultraestructural.

A la M. en C. Ernestina Ubaldo Pérez por su apoyo técnico en el desarrollo de esta investigación.

Al M.V.Z. Mario Soriano Bautista por proporcionarme el material biológico empleado en esta investigación.

A mis amigos Gabriel, Rocio, Paty, Lety y Silvia con quienes pude compartir mis dudas y encontrar el apoyo siempre.

A cada uno de mis compañeros del laboratorio de Microscopía Electrónica de quienes siempre recibí apoyo para el desarrollo de este trabajo.

Durante este tiempo tuve la oportunidad de ser becaria de la DGAPA, agradezco al Departamento de Biología Celular, a la Subcomisión de Superación Académica del Personal Académico de la Facultad de Ciencias, así como al Consejo Técnico de esta facultad el apoyo que recibí durante mis estudios de doctorado.

## XII. DEDICATORIAS

**A ti, oh Dios de mis padres, te doy gracias y te alabo, porque me has dado sabiduría y fuerza.**

**Daniel 2:23.**

A la memoria de mi padre

Me es muy difícil en unas cuantas palabras, describir la profunda gratitud que siento hacia Dios, mi esposo, mi mami, mis hermanos y mi familia en la carne y en la fe, por el apoyo que me han brindado durante estos años de estudio. Este no es un logro personal, pues siempre todos ustedes han estado conmigo dándome ánimos para seguir adelante. Muchas gracias por su amor hacia mi y el gozo que han manifestado al poder compartir conmigo el que por fin alcance esta meta tan anhelada. Este logro que hoy puedo experimentar, es el fruto del apoyo incondicional que he recibido de todos ustedes. Me siento muy contenta de poder dedicarles con todo mi amor este trabajo que es fruto de un esfuerzo compartido.

Muchas gracias Miguel Angel por amarme y amar lo que es parte de mi vida, mi carrera.

Mami muchas gracias por apoyarme siempre en todo.

A Pili, Tito, Ale, Toño, y mis sobrinas Rebe y Ale que siempre han expresado respeto y admiración a mi trabajo.

A mi amada familia Almanza que siempre han estado conmigo cuando los he necesitado.

A mi entrañable familia de Berith que siempre me han sostenido en oración.

### XIII. LISTA DE ABREVIATURAS

CS	Complejo sinaptonémico
DSB	Ruptura de doble cadena
FISH	Hibridación in situ fluorescente
RNP	Ribonucleoproteínas
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
SCP1	Proteína del complejo sinaptonémico 1
SCP2	Proteína del complejo sinaptonémico 2
SCP3	Proteína del complejo sinaptonémico 3
ARNhn	Ribonucleoproteína heterogeneo nuclear
ARNpnu	Ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares
BSA	Albumina de suero bovino
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
GAR	Anticuerpo contra conejo hecho en cabra
IgG	Inmunoglobulina G
MAG	Anticuerpo contra cabra hecho en ratón
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
PTA	Tinción de ácido fosfotúnstico
ARNasa	Ribonucleasa

## Cytochemical study of the distribution of RNA and DNA in the synaptonemal complex of guinea-pig and rat spermatocytes

R. Ortiz<sup>1</sup>, O.M. Echeverría<sup>1</sup>, E. Úbaldo<sup>1</sup>, A. Carlos<sup>1</sup>, C. Scassellati<sup>2</sup>, G.H. Vázquez-Nin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Electron Microscopy, Department of Cell Biology, Faculty of Sciences, UNAM, Apartado Postal 70-438, México D.F. México and <sup>2</sup>Center of Electron Microscopy, University of Lausanne, 27 rue Bugnon, CH-1005 Lausanne, Switzerland

Accepted: 6/3/2002

Key words: mammalian testis, ribonucleoprotein, meiosis, *in situ* hybridization, electron microscopy

### SUMMARY

The distribution of DNA and RNA in the synaptonemal complex and related structures, was studied using high resolution cytochemical methods and *in situ* hybridization, in guinea pig and rat testis. Serial sectioning demonstrates that frequently the formation of the synaptonemal complex (SC) occurs without a previous development of isolated chromosomal axes. The lateral elements of the forming SC are in continuity with pairs of DNA-containing thin filaments. These chromatin filaments fold in numerous short loops just before incorporating to the lateral elements. Some of these loops are included in the ribbon-like structure of the lateral elements of the mature SC. We propose that these short loops contain the DNA attachment sequences associated with the proteins of the LE. During the formation of the SC one of the two chromatin filaments incorporates at the central surface of the forming lateral element (LE) and the other is located at the external side of the LE. This unexpected distribution does not correspond to the pair of thick filaments previously discerned in structure of the LE. The presence of RNA associated with the DNA-containing thin filaments, as well as with the axial chromatin elements of the forming SC, may be related with the

transcription occurring during meiotic prophase, specially during zygotene stage. We propose that RNA is involved in a still uncharacterized process essential for pairing.

### INTRODUCTION

The synaptonemal complex (SC) was observed for the first time by Watson (1952) in rat spermatocytes as filamentous structures, and described more accurately four years later by Moses (1956) in a crayfish and by Fawcett (1956) in the pigeon. In few years, structures corresponding to SCs were found in the meiotic prophase of protists, fungi, plants and animals (see review by Westergard and Wettstein, 1972). Three-dimensional reconstructions of complete nuclei of pachytene spermatocytes demonstrated that the total number of SC per nucleus is equal to the haploid number of chromosomes of the species, allowing the conclusion that this structure corresponds to a bivalent (Wettstein and Sotelo, 1967). The classical hypothesis that SC is related with crossing-over formation was supported by: a) its constant presence in meiotic prophase and their absence when pairing does not take place; b) its extension all along each bivalent; c) the regular

occurrence of the bridging system (see review by Sotelo, 1969). The presence of short stretches of SC in relation with chiasma in diplotene stage, also suggested a specific role for the SC in homologous exchanges (Westergaard and Wettstein, 1972). However, some findings cast some doubts on its relationships with chiasma development: the pairing space contains little or no DNA, and the SC occurs in circumstances other than orthodox pairing (Sotelo, 1969). The finding of recombination nodules provided support for the notion that SC is involved in chiasma formation (Carpenter, 1975, 1979 a, b). Posterior studies on the meiosis of yeast using synchronized cultures (Kleckner *et al.*, 1991), and fluorescent *in situ* hybridization (Scherthan *et al.*, 1992), demonstrated that in this group, double strand breaks (DSB) and recombination occur before synapsis and SC formation (Kleckner, 1996; Padmore *et al.*, 1991; see review by Hawley and Arbel, 1993). Experiments with meiotic mutants showed that the alteration of DSB prevents the formation of a normal SC (Bishop *et al.*, 1992; Roeder, 1995; Baker *et al.*, 1995). These results support the view that in yeast the SC is not involved in recombination and that its formation depends on previous DSB and recombination. However, electron microscopical studies demonstrated that in *Drosophila* females meiotic mutants eliminating crossing over and gene conversion do not alter the formation of the SC (McKim *et al.*, 1998).

Immunocytochemical localization of the DNA at the level of electron microscope in mouse and rat spermatocytes and chick oocytes, demonstrated the presence of significant amounts of DNA in the lateral elements (LEs). The labeling of the central space is very low except for few specific sites: the recombination nodules and few fibrils not related to these nodules (Vázquez-Nin *et al.*, 1993).

However, the precise location of the two sister chromatids in the SC is not yet known. As stated several years ago, the key to the knowledge of cytophysiological role of the SC is to find out the distribution of DNA in the SC (Sotelo, 1969).

RNA has not been related to recombination or other possible functions of the SC. Nevertheless, the presence of RNA in the LEs of the SC was suggested by Wolstenholme and Meyer (1966) using optical histochemistry and electron microscopy. The use of a preferential staining procedure for ribonucleoprotein (RNP)-containing structures in electron microscopy, indicated the presence of RNP in the

LEs of the synaptonemal complex, as well as in leptotene and zygotene axial cores (Esponda and Stocker, 1971; Vázquez-Nin and Echeverría, 1976). Furthermore, hydrolyses with RNase were found to cause profound alterations of the LEs (Vázquez-Nin and Echeverría, 1976). However, the precise distribution of RNA-containing structures associated with the forming SC, has not been studied.

The aim of the present work is to study the distribution of both nucleic acids during the formation and the maturity of the SC.

## MATERIALS AND METHODS

Testes of young adult guinea pigs and rats were used in all experiments.

The standard procedure for preparing the samples involves fixation with 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M phosphate buffer pH 7.3 for 1 h at room temperature, rinsing in the same buffer, dehydration with ethanol, and embedding in an epoxy resin (glycide ether 100, Merck, Darmstadt, Germany).

One micrometer thick sections were stained with toluidine blue. The cellular associations present in the seminiferous tubules were studied at light microscope and compared with the classical descriptions of the spermatogenic cycle of the guinea pig (Clermont, 1960) and of the rat (Leblond and Clermont, 1952).

In order to stain RNP structures, the uranyl acetate-EDTA-lead citrate (Bernhard, 1969) procedure was used. DNA was stained using the osmium-amine procedure (Cogliati and Gautier, 1973) modified by Vázquez-Nin and coworkers (1995).

### Immunolocalization

Samples of seminiferous tubules were fixed in 2-4% paraformaldehyde in 0.15 M phosphate buffer pH 7.3 and embedded in Lowicryl K4M. Polymerization was carried out using UV at -20 °C. The ultrathin sections were mounted in Formvar coated nickel grids, and processed for postembedding immunolocalization as described previously (Biggiogera *et al.*, 1989; Vázquez-Nin *et al.*, 1990).

### Ultrastructural *in situ* hybridization

Specimens were fixed in 2% paraformaldehyde with 0.2% glutaraldehyde added and embedded in Lowicryl K4M.

Genomic DNA from guinea pig liver and spleen was labeled with digoxigenin-11-dUTP by nick translation according with the manufacturer's protocol (Boehringer Mannheim, Germany).

The *in situ* hybridization was performed on the grids with the denatured probe with or without pre-annealing for 24-48 h at 37-45 °C. The probe was used at 10 ng/ml final concentration in a hybridization solution containing 10% deionized formamide, 10% Dextran sulfate and 1X saline sodium citrate buffer (0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate; pH 7.0). The DNA in the specimen was not denatured. The hybrids were detected by incubation of the grids on a drop of mouse anti-digoxigenin (Boehringer, Mannheim, Germany). The mouse anti-digoxigenin was detected by a rabbit anti-mouse IgG (Aurion, Wageningen, The Netherlands).

In order to confirm the specificity of the hybridization signal, some sections were pre-treated with 2mg/ml ribonuclease (type IA, Sigma) in 1 mM tri-ethanolamine-acetic acid buffer, pH 7,3 for 8 hr. at 37°C.

All preparations were contrasted with 2.5% uranyl acetate for 5 min and lead citrate for 1 min.

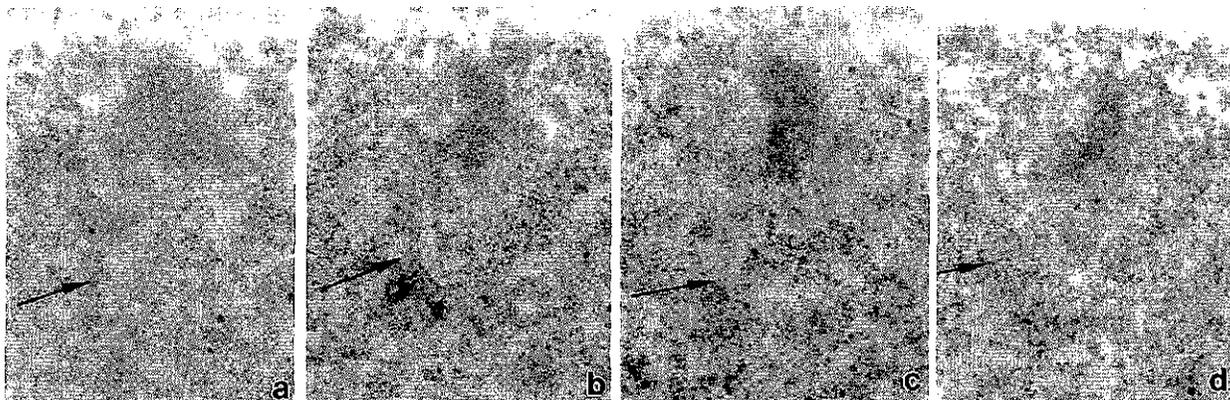
## RESULTS

### General Morphology

To describe the organization of the SC it is necessary to situate the sections in relation to the axes of the complex. The frontal plane contains lateral

and central elements lengthwise. The transverse plane is perpendicular to the main axis of the SC. Lateral plane is parallel to this axis and perpendicular to the frontal plane. It contains some, but not all the elements of the SC. This nomenclature has been used by Moses (1968) and Sotelo (1969).

Serial sectioning of the nuclei of spermatocytes in early meiotic prophase demonstrated the presence of short SC between 0.5 and 1.8 mm in length. One extremity of some of them is in contact with nuclear envelope, but others are distant from the nuclear periphery (Fig. 1). The reconstruction of 29 SC of 10 different nuclei showed that the ends of the lateral elements of most of these short SC are not in continuity with converging axial elements. Continuities of the lateral elements of the forming SC with a pair of thin filaments can be seen when both structures are contained in the thickness of one section (Figs. 2, 3). Frontal sections show that one of these filaments is incorporated in the external side of the lateral element and the other at the central side, that is in the border of the pairing space (Fig. 2). The pairs of thin filaments and the LE are surrounded by loops of different length and filaments of chromatin that correspond to long loops not contained in the section (Fig. 3). The frequency of short loops (40 to 200 nm in length, measured from the tip to the axial filament) increases in the proximity of the forming chromosomal axis or lateral element of the growing SC. These short loops are



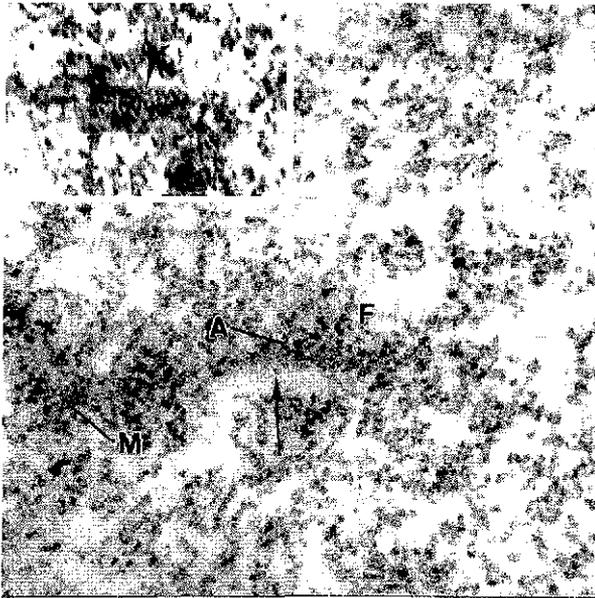
**Fig. 1** - Serial sections of a synaptonemal complex in the process of formation. The arrows indicate the position of the synaptonemal complex. Figure a. No synaptonemal complex can be seen. Figure b. The three elements of the synaptonemal complex are depicted. The lower tip of the lateral elements are apparently in continuity with aligned structures (arrow head). Figures c and d. No structure related to the forming synaptonemal complex is visible. The complex is 530 nm in length, no contact with the nuclear envelope or continuity with converging axial elements can be seen. X 28,500.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 2 - Forming synaptonemal complex.** General staining. A continuity between the fibers of the lateral element (arrow heads) and a pair of filaments (arrow), can be seen. p - perichromatin granules. X 40,000. Inset. The external and central filaments of the forming lateral element (arrow head) are clearly continuous with the precursor fine filaments (arrow). X 55,000.

closely distributed in quasi-periodic form along the filament (Fig. 3 inset). The period is about 22

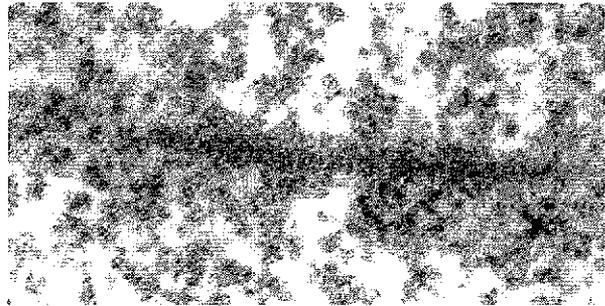


**Fig. 3 - Zygotene.** The formation of the chromosome axis is simultaneous with final pairing. The lateral element (A) is continuous with two fine filaments (M). The central space of the forming synaptonemal complex is visible as a chromatin exclusion zone (arrow). F - filaments of chromatin surrounding the complex. X40,000. Inset. Numerous short loops form a quasi-periodic structure (arrow head). X26,500.

nm ( $X=22.3$ ,  $SD=3.98$ ,  $N=87$ ). It was estimated from measures carried out in 24 LEs of 8 nuclei.

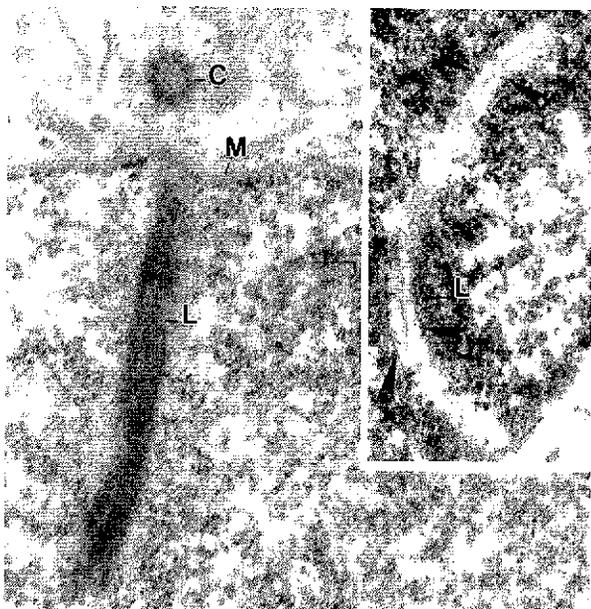
The LEs of mature SCs present a transverse striation (Fig. 4) with a period about 20 nm ( $X=20.5$ ,  $SD=2.39$ , 36 LEs were measured in 10 nuclei). The lateral views show that the LEs of pachytene SC are longitudinal striated ribbons about 0.2  $\mu$ m wide, in which some thick irregular bundles of fibrils can be discerned, but no cross striation can be seen (Fig. 5).

Frontal sections demonstrate the presence of a dark stained filament of irregular thickness in the border between central space and the LEs. This filament frequently appears as beads on a string or aligned beads (Fig. 5 inset).

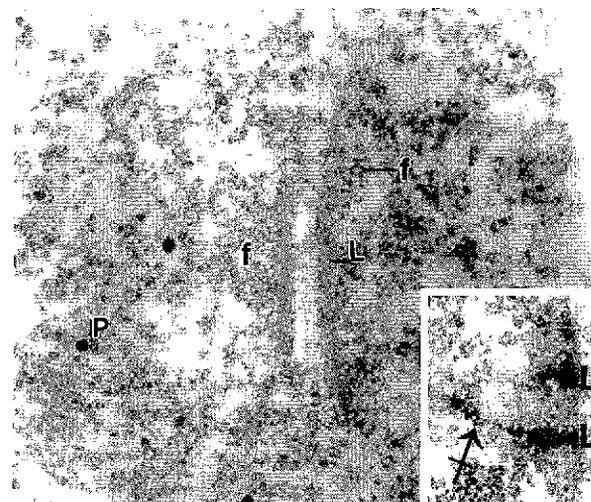


**Fig. 4 - Pachytene.** General staining. A lateral element of a synaptonemal complex showing a periodic transverse striation. X74,000

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 5 - Pachytene. General staining.** Lateral view of the ribbon-like lateral element (L) of a synaptonemal complex. Longitudinal ill defined bundles of fibrils can be seen. No periodic pattern can be discerned. C- centriole. M- nuclear envelope X34,500. Inset. Frontal section of a synaptonemal complex. Portions of a dark stained filament (arrow heads) can be seen in the central side of the lateral elements (L). X37,000.



**Fig. 6 - Advanced pachytene. EDTA staining.** The lateral elements are stained clear gray (L). A row of dark stained granules can be seen in the central surface of the lateral elements. The central space is devoid of RNP structures. Numerous perichromatin fibrils (f) are located in the vicinity of the synaptonemal complex and to a lesser extent in the rest of nucleoplasm. Perichromatin granules (p) are dark stained. X37,000. Inset. Two forming axial elements aligned in the vicinity of the nuclear membrane are dark stained (L). The crossed arrow indicates the continuity of a forming axial element with a dark stained fibril depicting short folds. X24,000.

**Distribution of RNP**

The lateral elements of the mature pachytene SC are faintly stained with EDTA procedure. A row of small granules positively contrasted with this staining method can be seen in contact with the medial face of the LEs of the SC in frontal sections (Fig. 6). The forming chromosome cores and the developing LE are frequently darkly stained. The fine folding fibrils found in continuity with the growing end of these structures are also positively contrasted with EDTA procedure. These fibrils present short loops as those depicted with standard contrast techniques (Fig. 6 inset).

The fibrils and granules surrounding the SC are intensively labeled by *in situ* hybridization of a genomic probe carried out without denaturation of the DNA of the sample (Fig. 7). The internal face of the LE is also labeled. The sections treated with RNase before hybridization present few or no gold grains (data not shown).

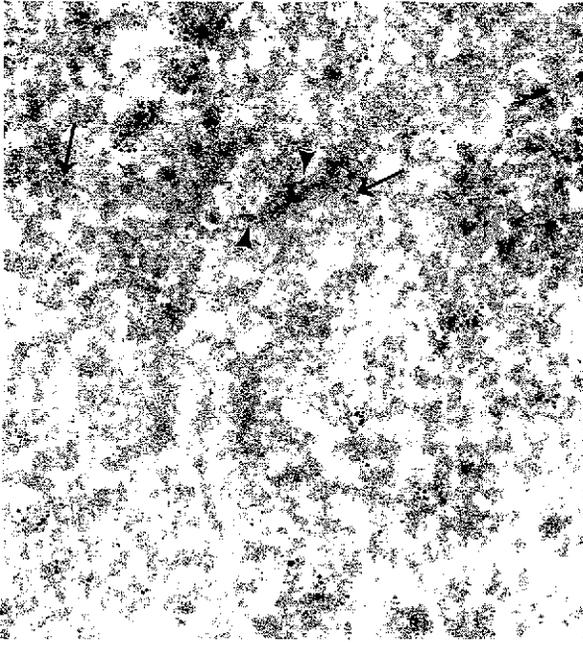
**Distribution of DNA**

Osmium-ammine procedure specific for DNA contrasts positively the fine filaments aligned in pairs.

These filaments correspond to those found in continuity with the lateral elements of the SC in preparations stained with general contrasting method. The loops of different length surrounding the fine filaments are also contrasted with osmium-ammine. Short loops are specially abundant (Fig. 8).

Important changes in the distribution of chromatin take place at the moment of the formation of the SC. The central space is almost empty of DNA-containing fibrils, except for few transverse fibrils of chromatin. A longitudinal fibril located to the central surface of the LE is positively contrasted with osmium ammine staining method (Figs. 9, 10). This fibril corresponds to the filament of irregular diameter showed by general staining (Fig 5 inset), and to the row of small granules found with EDTA procedure for RNP (Fig. 6). Oblique sections of the LE demonstrate the presence of numerous short DNA-containing loops and fibrils inside the LE (Figs. 10, 11). Some of the fibrils crossing the LE are continuous with the chromatin surrounding the SC (Figs. 9, 10).

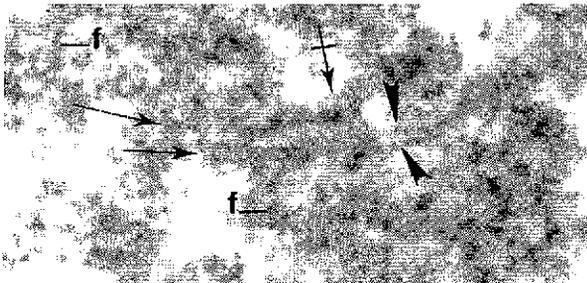
TESIS CON FALLA DE ORIGEN



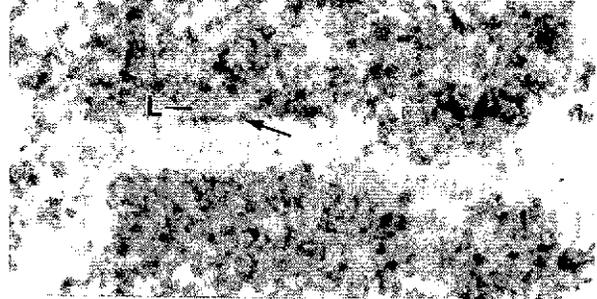
**Fig. 7** - *In situ* hybridization using a genomic probe to detect RNA. General staining. Pachytene stage. Numerous RNP fibrils and granules located in the nucleoplasm are labeled. Gold grains are also associated with fibrils surrounding a synaptonemal complex (arrows). The boundary between the lateral element and the central space is also labeled (arrow heads). X74,000.

## DISCUSSION

The distribution of DNA in the mature pachytene SC has been studied by Coleman and Moses (1964) using of indium trichloride staining complemented with DNase hydrolysis. They concluded



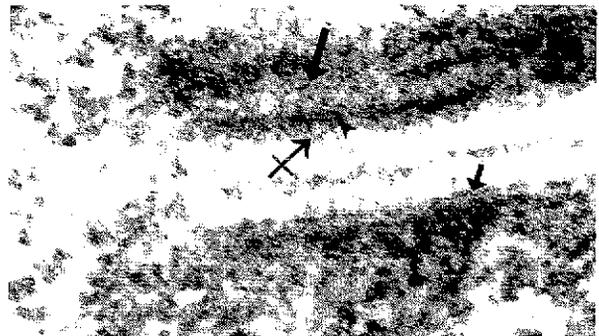
**Fig. 8** - Osmium-amine staining specific for DNA. Zygotene stage. Two aligned fine filaments are positively contrasted (arrows). The two filaments composing the forming lateral elements are clearly depicted (arrow heads). At this stage the fine filaments are folded forming short loops (crossed arrow). Abundant fibers of extended chromatin are present in the nucleoplasm (f). X75,000.



**Fig. 9** - Pachytene. Osmium-amine staining specific for DNA. An irregular filament located in the central side of the lateral element is dark stained (arrow). The pairing space is devoid of chromatin. No precise external limit of the lateral element (L) can be seen. X80,000.

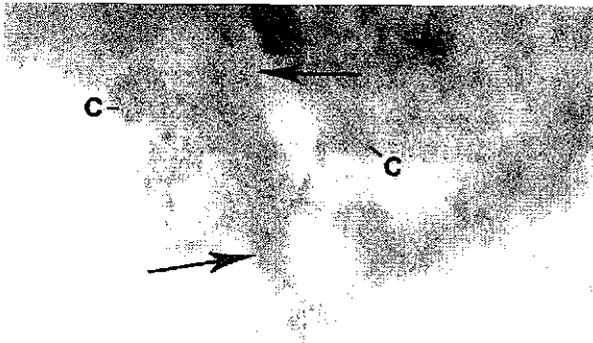
ed that there is few or no DNA in the central element and that the central space is traversed by some fibrils containing DNA. These results were supported by a study using immunolocalization of DNA at the level of the electron microscope (Vázquez-Nin *et al.*, 1993).

The use of the osmium-amine method allowed us a precise and specific determination of the distribution of the DNA-containing structures in forming and mature SC. The present results demonstrate that, in rat and guinea-pig spermatocytes, each lateral element of the SC in the process



**Fig. 10** - Pachytene. Osmium-amine staining. Both lateral elements of the synaptonemal complex are sectioned at different inclination probably due to a turn of the complex. The beads on a string aspect of the filament located in the central side of the lateral element is clearly depicted (short arrow). The thicker regions of these filaments are dark stained. The filaments of the surrounding chromatin are continuous with those of the LE. The upper LE is cut along the wider surface of the ribbon. Short loops protrude to the pairing space (crossed arrow). Numerous fibrils and short loops lay in the thickness of the LE (long arrow). The external border of the element indicated by a denser arrangement of the filaments of chromatin. X70,000.

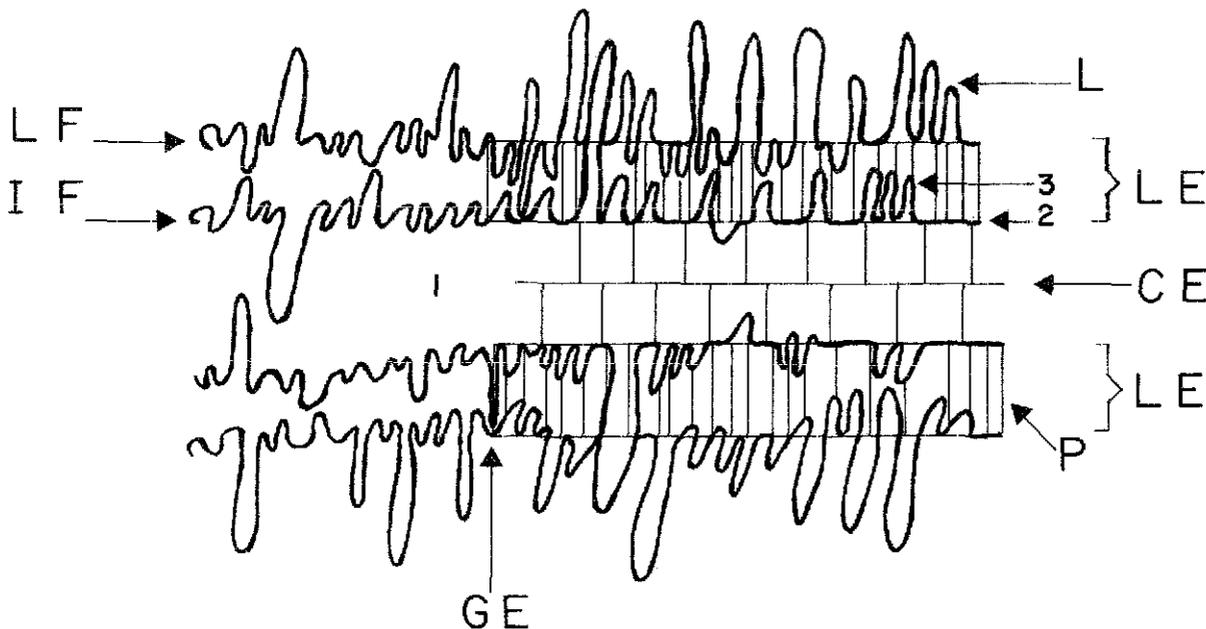
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 11** - Pachytene. Osmium-ammine staining Lateral view of a LE. Positively contrasted short loops can be seen immersed in a ribbon-like region stained clear gray (arrows). C- filaments of the chromatin surrounding the complex. X57,000.

One of these filaments is located at the medial side of the LE, while the other is folded in numerous loops at the external face of the LE. The presence of a chromatid axis at the internal side and the other at the external side of the LE is an unexpected distribution, its cytophysiological interpretation is open to discussion in terms of the opportunities of each filament to become involved in different meiotic processes. If the SC is essential for the initiation of recombination, in organisms other than yeast as was classically proposed (see review by Hawley and Arbel, 1993), the proximity of each chromatid with the recombination nodules located in the central space may influence its opportunity to become involved in a recombination event. Nevertheless, the filament located at the external side of the LE may gain access to the medial space by means of the inward oriented loops or by changing positions with the filament situated at the internal side of the LE. However, if in mam-

of formation is frequently continuous with a pair of thin DNA-containing filaments folded in loops of different length representing the sister chromatids of one of the homologous chromosomes.



**Fig. 12** - Schematic drawing of a frontal view of a forming synaptonemal complex showing the distribution of some of its macromolecular components. The lateral elements (LE) extend to the right of the growing end (GE) of the synaptonemal complex. At a short distance from the GE the central element (CE) and the transversal filaments appear. The lateral thin DNA-containing filament (LF), situated to the left of the growing end, is continuous with the filament located in the external side of the lateral element. The loops of these filaments are associated with RNA-containing structures. The internal DNA-containing filament (IF) is continuous with the filament located in the internal border of the lateral element (2). These filaments are also associated with RNP. Numerous DNA-containing loops (3) are located inside the protein structure (P) of the lateral elements. Proteins form cross striation in a periodic pattern (P) that can be seen in frontal section. The appearance of a zone of exclusion of DNA and RNA (1), takes place before the formation of the classical elements of the synaptonemal complex.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

mals the recombination is initiated before the SC formation as in yeast (Padmore *et al.*, 1991; Sym *et al.*, 1993; Borde *et al.*, 2000), the association of the chromatids with the both sides of the LE may be only relevant to crossover interference and disjunction process (Maguire, 1995).

The two DNA-containing thin filaments are present in frontal sections of the SC. Doubleness of the LE has been observed in rat spermatocytes (Sotelo and Trujillo-Cenoz, 1958), in pigeon (Nebel and Coulon, 1962) and in various other animals and plants (see review by Moses, 1968). These pairs of thick fibers frequently found in lateral sections of the LE, were interpreted as representing the two chromatids of one chromosome (Nebel and Coulon, 1962; Baker and Franchi, 1967; Moses, 1968). The results of the present work indicate that in rat and guinea-pig the DNA-containing filaments do not correspond to thicker fibers that can be discerned in the protein structure of the lateral elements.

The development of the SC is accompanied by an intense rearrangement of chromatin characterized by: 1) the formation of a region of almost complete exclusion of DNA and RNA, the central space, and 2) the folding of the fine filaments to form multiple short loops before incorporating into the SC. These short loops are included in the ribbon-like structure of the LE in mature SC.

Periodical striated patterns were described in animals, fungi and plants (see reviews by Westergaard and Wettstein, 1972; Zickler and Kleckner, 1999). When SCP3 is expressed in cultured somatic cells, cross-striated filaments with a periodicity of about 20 nm are formed (Yuan *et al.*, 1998). This period approximately coincides with the spacing of the bands of the LEs found in some animals and in an Ascomycete (Zickler and Kleckner, 1999). The periodicity of the numerous short loops contained in the thickness of the ribbon-like structure of the LE is also about 20 nm, although there is some dispersion of data. The DNA isolated and sequenced from purified SC was found to be different from random genomic sequences (Pearlman *et al.*, 1992). It presents excess of microsatellites, mostly GT/CA repeats, and fragments of LINE and SINE sequences, which are interpreted as specialized attachment sequences (Pearlman *et al.*, 1992; Moens, 1994; Moens *et al.*, 1998). The loops of DNA lying inside the LE probably correspond to

these attachment sequences associated with the proteins of the LE.

The irregular filament located at the central face of the LE of SC is stained with EDTA procedure and labeled by *in situ* hybridization carried out without the denaturation of the DNA of the sample. These features demonstrate that RNA is associated with the DNA-containing axial filament situated at the medial side of the LE in mature SC. The presence of the RNA in the fine axial chromatin filaments is detected short before these filaments are incorporated in the forming LE, and disappears progressively during the course of pachytene stage. It is difficult to ascertain the whether the filament located at the external side of the LE also contains RNA, due to its numerous loops and the multiple RNP structures, as perichromatin fibrils and perichromatin granules (Monneron and Bernhard, 1969), associated with it. The appearance of RNA bound to the chromosome axes during final pairing may represent the newly synthesized RNAs previously found using biochemical procedures and referred to as PsnRNA and zygRNA. A small nuclear RNA 125 nucleotides in length (PsnRNA) transcribed by RNA polymerase III was found to be synthesized during meiotic prophase in *Lilium* (Hotta and Stern, 1981). The transcription of a DNA replicated during chromosome pairing has been reported in lily and mouse meiocytes (Hotta *et al.*, 1985). These transcripts (zygRNA) contain poly(A) and are found only in meiocytes (Hotta *et al.*, 1985). Furthermore, autoradiographic experiments at the light microscope level have demonstrated nucleolar and extranucleolar transcription during meiotic prophase in various animals and plants (Taylor, 1959; Muckenthaler, 1964; Monesi, 1965; Kierszenbaum and Tres, 1974; Tres, 1975; Hartung and Stahl, 1976; Söderström, 1976; Geremia *et al.*, 1977). The inhibition of transcription during meiotic prophase results in strong interference with meiotic process (Sakaguchi *et al.*, 1983). When the inhibitor was applied in leptotene or zygotene, meiotic development arrests and synapsis does not take place (Sakaguchi *et al.*, 1983). The authors suggest that late zygonema probably represents a physiological distinctive stage in meiotic development with respect to RNA metabolism which is related to the completion of synapsis. Taking into account all these results, the asso-

ciation of RNA with the axial filaments before the formation of the SC and its presence in the chromatin axes of the LE during early pachytene is probably related to a still uncharacterized process essential for the achievement of final pairing. The intensity of the positive contrast of the forming leptotene and zygotene chromosomal axes with EDTA procedure for RNP is much higher than that of the lateral element of the forming SC. During pachytene stage the specific contrast due to RNA fades and finally disappears from the lateral elements of the SC. These observations lead us to speculate that the RNA is probably related to the assembly of the component of the axial element and its transformation to lateral element of the SC.

Further work aimed at characterizing morphologically and cytochemical the structures associated with homology search and with the formation of the SCs is in progress. In order to interpret the presence of RNA in the SC it is important to study the localization of the transcriptional activity in several stages of meiotic prophase.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant I/74 348 of the Volkswagen-Stiftung and by UNAM, PAPIIT IN227398 grant. The authors are indebted with Ricardo Benavente for helpful and critical reading of the manuscript. We also wish to thank Mario Soriano for animal care and Porfirio Munguía Reyes for drawing the diagram.

## REFERENCES

- Baker S.M., Bronner C.E., Zhang L., Plug A.W., Robatzek M., Warren G., Elliott E.A., Yu J., Ashley T., Arnheim N., and Liskay M.: Male mice defective in the DNA mismatch repair gene *PNS2* exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell* 82, 309-319, 1995
- Baker T.G., and Franchi L.L.: The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries. *J. Cell Sci.* 2, 213-224, 1967.
- Bernhard W.: A new staining procedure for electron microscopical cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27, 250-265, 1969
- Biggiogera M., Fakan S., Kaufmann S.H., Black A., Shaper J.H., and Bush H.: Simultaneous immunoelectron microscopic visualization of protein B23 and C23 distribution in the HeLa cell nucleolus. *J. Histochem Cytochem.* 9, 1371-1374, 1989.
- Bishop D.K., Park D., Xu L., and Kleckner N.: DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* *recA* required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* 69, 439-456, 1992.
- Borde V., Goldman S.H., and Lichten M.: Direct coupling between meiotic replication and recombination initiation. *Science* 290, 806-809, 2000.
- Carpenter A.T.C.: Electron microscopy of *Drosophila melanogaster* females. II. The recombination nodule: a recombination associated structure at pachytene? *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 3186-3189, 1975.
- Carpenter A.T.C.: Synaptonemal complex and recombination nodules in wild type of *Drosophila melanogaster* females. *Genetics* 92, 511-541, 1979a
- Carpenter A.T.C.: Recombination nodules and synaptonemal complex in recombination defective females of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 75, 259-292, 1979b.
- Clermont Y.: Cycle of the seminiferous epithelium of the guinea pig. *Fert. Steril* 6, 563-573, 1960.
- Cogliati R., and Gautier A.: Mise en évidence de l'ADN et des polysaccharides à l'aide d'un nouveau réactif de type Schiff. *C. R. Acad. Sci. D* 276, 3041-3044, 1973.
- Coleman J., and Moses M.: DNA and the fine structure of synaptic structures in the domestic rooster. *J. Cell Biol.* 23, 63-78, 1964.
- Esponda P., and Stockert J.C.: Localization of RNA in the synaptonemal complex. *J. Ultrastruct. Res.* 35, 411-417, 1971.
- Fawcett D.W.: The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2, 403-406, 1956.
- Geremia R., Boitani C., Conti M., and Monesi V.: RNA synthesis in spermatocytes and spermatids and preservation of meiotic RNA during spermiogenesis in the mouse. *Cell Differentiation* 5, 343-355, 1977.
- Hartung H., and Stahl A.: Incorporation of tritiated uridine during pachytene and diplotene stages in the oocytes of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Experientia* 32, 96-97, 1976.
- Hawley R.S., and Arbel T.: Yeast genetics and the fall of the classical view of meiosis. *Cell* 72, 301-303, 1993.
- Hotta Y., and Stern H.: Small nuclear RNA molecules that regulate nuclease accessibility in specific chromatin region of meiotic cells. *Cell* 27, 309-319, 1981.
- Hotta Y., Tabata S., Stubbs L., and Stern H.: Meiosis-specific transcripts of a DNA component replicated during chromosome pairing: homology across the phylogenetic spectrum. *Cell* 40, 785-793, 1985.
- Kierszenbaum A.L., and Tres L.L.: Transcription sites in spread meiotic prophase chromosomes from mouse spermatocytes. *J. Cell Biol.* 63, 923-925, 1974.
- Kleckner N.: Meiosis: How could it work? *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93, 8167-8174, 1996.

- Kleckner N., Padmore R., and Bishop D.K.: Meiotic chromosome metabolism: one view. *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* 56, 729-743, 1991.
- Leblond C.P., and Clermont Y.: Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. New York Acad. Sci.* 55, 548-569, 1952.
- Maguire M.P.: Is the synaptonemal complex a disjunction machine? *J. Heredity* 86, 330-340, 1995.
- McKim K., Green-Marroquin B.L., Sekelsky I.I., Chin G., Steinberg C., Khodosh R., and Hawley R.S.: Meiotic synapsis in the absence of recombination. *Science* 279, 876-878, 1998.
- Moens P.B.: Molecular perspectives of chromosome pairing at meiosis. *BioEssays* 16, 101-106, 1994.
- Moens P.B., Pearlman R.E., Heng H.H.Q., and Traut W.: Chromosome cores and chromatin at meiotic prophase. *Curr. Topics Develop. Biol.* 37, 241-262, 1998.
- Monneron A., and Bernhard W.: Fine structural organization of the interphase nucleus of some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.* 27, 266 - 288, 1969.
- Monesi V.: Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse. RNA and protein. *Exp. Cell Res.* 39, 197-224, 1965.
- Moses M.J.: Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2, 215-218, 1956.
- Moses M.J.: Synaptonemal complex. *Ann. Rev. Genet.* 2, 363-412, 1968.
- Muckenthaler F.A.: Autoradiographic study of nucleic acids synthesis during spermatogenesis in the grasshopper, *Melanoplus differentialis*. *Exp. Cell Res.* 35, 531-547, 1964.
- Nebel B.R., and Coulon E.M.: The fine structure of chromosomes in pigeon spermatocytes. *Chromosoma* 13, 272-291, 1962.
- Padmore R., Cao L., Kleckner N.: Temporal comparison of recombination and synaptonemal complex formation during meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell* 66, 1239-1256, 1991.
- Pearlman R.E., Tsao N., and Moens P.B.: Synaptonemal complexes from DNase-treated rat pachytene chromosomes contain (GT)<sub>n</sub> and LINE sequences, but no MARs/SARs. *Genetics* 130, 865-872, 1992.
- Roeder G.S.: Sex and the single cell: Meiosis in yeast. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92, 10450-10456, 1995.
- Sakaguchi K., Miyako H., Takagami M.H., and Ito M.: Inhibition of RNA synthesis in meiotic cells and its effect on meiotic development. *Cell Struct. Funct.* 8, 127-135, 1983.
- Scherthan H., Loidl J., Schuster T., and Schweitzer D.: Meiotic chromosome condensation and pairing in *Saccharomyces cerevisiae* studied by chromosome painting. *Chromosoma* 101, 590-595, 1992.
- Söderström K.O.: Characterization of RNA synthesis in mid-pachytene spermatocytes of the rat. *Exp. Cell Res.* 102, 327-245, 1976.
- Sotelo J.R.: Ultrastructure of the chromosomes at meiosis. In *Handbook of Molecular Cytology*. (Ed. Lima de Faria A) North-Holland Pub. Co., Amsterdam, pp. 412-434, 1969.
- Sotelo J.R., and Trujillo-Ccnos O.: Microscopic structure of meiotic chromosomes during prophase. *Exp. Cell Res.* 14, 1-8, 1958.
- Sym M., Engebrecht J., and Roeder G.S.: ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell* 72, 365-378, 1993.
- Taylor J.H.: Autoradiographic studies of nucleic acids and proteins during meiosis in *Lilium longiflorum*. *Am. J. Botany* 46, 477-484, 1959.
- Tres L.L.: Nucleolar RNA synthesis of meiotic prophase spermatocytes in the human testis. *Chromosoma* 53, 141-151, 1975.
- Vázquez-Nin G.H., Biggiogera M., and Echeverría O.M.: Activation of osmium ammine by SO<sub>2</sub>-generating chemicals for electron microscopy Feulgen-type staining of DNA. *Eur. J. Histochemistry* 39, 101-106, 1995.
- Vázquez-Nin G.H., and Echeverría O.M.: Ultrastructural study on meiotic prophase nucleus of rat oocytes. *Acta Anat.* 96, 218-231, 1976.
- Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M., Fakan S., Leser G., and Martin T.E.: Immunoelectron microscope localization of snRNPs in the polytene nucleus of salivary glands of *Chironomus thummi*. *Chromosoma* 99, 44-51, 1990.
- Vázquez-Nin G.H., Flores E., Echeverría O.M., Merkert H., Benavente R., and Wettstein R.: Immunocytochemical localization of DNA in synaptonemal complexes of rat and mouse spermatocytes and chick oocytes. *Chromosoma* 102, 457-463, 1993.
- Watson M.L.: Spermatogenesis in the adult albino rat as revealed by tissue sections in the electron microscope. *Univ. Rochester Atomic Energy Report UR-185*, 1952.
- Westergaard M., and Wettstein D.: The synaptonemal complex. *Ann. Rev. Genet.* 6, 71-110, 1972.
- Wettstein R., and Sotelo J.R.: Electron microscope serial reconstruction of the spermatocyte I nuclei at pachytene. *J. Microscop.* 6, 557-576, 1967.
- Wolstenholme D.R., and Meyer G.F.: Some facts concerning the nature and formation of axial core structures in spermatids of *Gryllus domesticus*. *Chromosoma* 18, 272-286, 1966.
- Yuan L., Pelttari J., Brundell E., Bjorkroth B., Zhao J., Liu J.G., Brismar H., Daneholt B., and Hoog C.: The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded cross-striated fibers in vivo. *J. Cell Biol.* 142, 331-339, 1998.
- Zickler D., and Kleckner N.: Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* 33, 603-754, 1999.