

00322

81



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“FORMACIÓN DEL CUERPO XY DURANTE ETAPAS INICIALES DE LA PROFASE MEIÓTICA I EN ESPERMATOCITOS DE RATA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

PRESENTA:

ABRAHAN HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

DIRECTOR DE TESIS:

DR. GERARDO HEBERT VÁZQUEZ NIN



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

2003



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Formación del cuerpo XY durante etapas iniciales de la profase
meiótica I en espermatoцитos de rata"

realizado por Abrahan Hernández Hernández

con número de cuenta 9957744-5 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin

Propietario

Dra. Sandra Gómez Arroyo

Propietario

Dra. Patricia Ostrosky Shejee

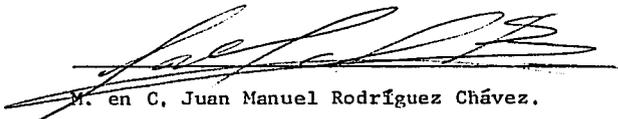
Suplente

Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez

Suplente

Dra. Rosario Ortiz Hernández

Consejo Departamental de Biología


M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez.

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la
Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México,
bajo la dirección del Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin.
Con apoyo económico del Sistema Nacional de Investigadores,
como ayudante de investigador SNI nivel III.**

FORMACIÓN DEL CUERPO XY DURANTE ETAPAS INICIALES DE LA PROFASE MEIÓTICA I EN ESPERMATOCITOS DE RATA.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	3
- Reproducción	3
- Las ventajas de la reproducción sexual	3
- Meiosis	4
- Complejo sinaptonémico	7
- Espermatogénesis	8
- Ciclos y ondas espermatogénicas	9
- Dimorfismo sexual en meiosis	11
- Comportamiento de los cromosomas sexuales durante la meiosis	12
- Meiosis en hembras	12
- Meiosis en machos	12
- Cuerpo XY	15
- Formación del cuerpo XY	18
- Contenido genético de los cromosomas X e Y	19
- El apareamiento de los cromosomas sexuales asegura su segregación	19
- Consecuencias de la inactivación del cromosoma X de células germinales de machos	20
- Secuencias pseudoautosomales	20
- Homología de los cromosomas sexuales	21
- Proteínas asociadas al cuerpo XY	21
Justificación	26

Objetivos	27
Material y métodos	27
- Procesamiento del material biológico	27
- Fijación en glutaraldehido	27
- Fijación en paraformaldehido - photo flo	28
- Lavados y deshidratación	28
- Preinclusión	28
- Inclusión	29
-Corte	29
-Contraste	29
- Reconstrucción tridimensional	30
Resultados	31
Discusión	49
Conclusión	51
Referencias	52
Agradecimientos	57
Dedicatoria.	58

Resumen.

Los cromosomas sexuales se comportan de manera diferente en las células de hembras y machos de mamíferos, las células somáticas de hembras tiene dos cromosomas sexuales X, uno de los cuales se inactiva transcripcionalmente por medio del proceso de compensación de dosis y se condensa para formar el cuerpo o corpúsculo de Barr, mientras que en las células sexuales durante su proceso de división meiótica ambos cromosomas X permanecen en su forma de cromatina laxa y activos transcripcionalmente; en cambio los machos tienen un cromosoma X y un cromosoma Y los cuales en las células somáticas se encuentran en forma de cromatina laxa y activos transcripcionalmente. En las células sexuales, durante el proceso de división meiótica I, particularmente en la profase I, se observa la cromatina de los cromosomas sexuales condensada e inactiva transcripcionalmente, este proceso se conoce como inactivación de los cromosomas sexuales meióticos, formando un cuerpo denso llamado cuerpo XY.

Se ha estudiado con inmunocitoquímica ultraestructural al cuerpo XY en su forma madura, pero no se han hecho estudios de la ultraestructural de este cuerpo durante su formación, ya que tampoco se sabe cual es la etapa de la profase meiótica I del inicio de la condensación de los cromosomas sexuales para la formación del cuerpo XY.

En este trabajo se realiza un estudio a nivel de microscopía electrónica del cuerpo XY en sus etapas iniciales de formación, con el fin de conocer el momento de la profase meiótica I en la cual se comienza a constituir, así como la ultraestructura de su formación. Para este estudio se emplean ratas de 21 días de edad que se encuentran en maduración sexual y los meiocitos están en las etapas iniciales de la profase meiótica I, por lo que se encontrarán espermatocitos primarios en etapas de leptoteno – zigoteno. Las ratas utilizadas, de la raza Wistar, se sacrifican, se obtienen los testículos y se seccionan en pequeños fragmentos que se fijan en glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 1% más photo flo al 0.4%

estas muestras posteriormente se deshidratan con alcoholes de concentraciones graduales y se incluyen en resina epóxica y acrílica. Los bloques obtenidos de la inclusión se cortan y se tiñen para microscopía óptica y se escogen las zonas adecuadas que posteriormente se cortan y contrastan para microscopía electrónica, las observaciones se registran en papel fotográfico para su análisis e interpretación de los resultados.

Se obtienen cortes seriados de núcleos de espermatoцитos primarios en etapa de leptoteno y zigoteno, en estos cortes se observa una zona inicial de heterocromatización, correspondiente a las etapas iniciales de la formación del cuerpo XY. Dentro de esta zona se observan los ejes cromosómicos, se realiza un esquema de la reconstrucción tridimensional de los cortes seriados en la cual se observa la disposición de los ejes cromosómicos dentro de la zona de heterocromatización, además dicha zona se observa dividida en dos regiones y con continuidades entre estas y con la cromatina laxa.

Los resultados indican que la condensación de los cromosomas sexuales y la formación del cuerpo XY se da en espermatoцитos en etapa de leptoteno, así como que la condensación de los cromosomas sexuales es de manera individual para aparearse posteriormente durante el paquiteno, también se observó la ultraestructura de la formación del cuerpo XY y la relación entre la heterocromatina de las etapas iniciales del cuerpo XY y el resto de la cromatina laxa del núcleo.

Introducción.

Reproducción.

Para la reproducción no es imprescindible el sexo. Los organismos unicelulares pueden reproducirse mediante una simple división mitótica y se conoce como reproducción asexual la cual es simple y directa y la descendencia es genéticamente idéntica al organismo progenitor. En cambio la reproducción sexual implica la mezcla de los genomas procedentes de dos individuos distintos, para producir descendientes que se diferencian genéticamente entre sí y también de sus progenitores. La reproducción sexual puede presentar una ventaja al producir variabilidad genética y ha sido adoptada por la gran mayoría de las plantas y animales, incluso muchos procariontes y eucariontes unicelulares han desarrollado la capacidad de reproducirse sexualmente (Alberts B. et al. 1996).

Las ventajas de la reproducción sexual.

El ciclo de la reproducción sexual implica una alternancia cíclica de generaciones de células haploides (cada una de las cuales contiene una dotación sencilla de cromosomas) con generaciones de células diploides (cada una de las cuales contiene una dotación doble de cromosomas). Así al fusionarse dos células haploides se mezclan los genomas y se forma una célula diploide, posteriormente, cuando una célula derivada de la multiplicación mitótica se divide por medio del proceso de meiosis se generan nuevas células haploides. Durante la **meiosis** los cromosomas de la dotación diploide intercambian ADN mediante el proceso de recombinación génica, antes de ser repartidos en conjuntos haploides. De esta manera, cada célula de nueva generación haploide recibe un aporte genético diferente, de manera que cada cromosoma presenta unos genes que provienen de una célula de la generación haploide anterior y otros genes de otra. Así, a través de ciclos de haploidía, fusión celular, diploidía y meiosis desaparecen las antiguas combinaciones de genes y se crean otras nuevas (Alberts B. et al. 1996).

En casi todos los animales pluricelulares la mayor parte de su ciclo vital se encuentra en un estadio diploide, por lo que las células haploides tienen una corta existencia, no se dividen y están altamente especializados para realizar la fusión celular (Fig. 1).

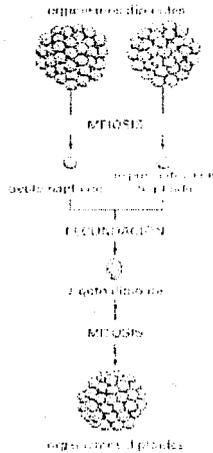


Fig. 1: Dibujo que representa la fusión de células haploides, por medio de la fecundación, formando así células diploides (Tomado de Alberts B. et al. 1996)

Eucariontes superiores

Las células haploides que están especializadas para la fusión sexual reciben el nombre de gametos. Se forman dos tipos de gametos: uno de los cuales es llamado óvulo (o huevo) y el otro se denomina espermatozoide los cuales son productos de la meiosis (Alberts B. et al. 1996).

Meiosis.

La meiosis, cuya raíz griega significa disminución, es el tipo de división por medio de la cual las células germinales se forman (Alberts B. et al. 1996).

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. La primera denominada meiosis terminal o gamética, la segunda meiosis intermedia o esporógena y la tercera inicial o zigótica (Wolfe, 1972).

En contraste con la mitosis, la meiosis consiste en la división de células diploides en células haploides, cada célula de esta progenie tiene sólo la mitad de cromosomas homólogos que presenta la célula progenitora. Esta reducción en el número cromosómico es producida por dos divisiones secuenciales celulares y nucleares (llamadas meiosis I y meiosis II) que ocurren después de una simple división del ADN en la fase S (interfase) del ciclo celular donde los cromosomas homólogos se han replicado para dar origen a cromátidas hermanas idénticas. El patrón de segregación de los cromosomas durante la meiosis I es muy distinto del que ocurre en la mitosis. Durante la meiosis I se recombina el material genético y se separan los cromosomas homólogos mientras las cromátidas hermanas aún permanecen unidas, segregando así las muchas combinaciones de genes (Alberts B. et al. 1996, Cooper G. 2000). De esta forma al término de la meiosis I se tienen dos células hijas con un solo miembro, de cada par de cromosomas homólogos, el cual consta de dos cromátidas hermanas. La meiosis I es seguida por la meiosis II, la cual se asemeja a la mitosis, en donde las cromátidas hermanas se separan y se segregan en diferentes células hijas, al término de la meiosis II se tienen cuatro células hijas haploides cada una de las cuales contiene únicamente una copia de cada cromosoma (Cooper G. 2000).

El apareamiento de los cromosomas homólogos se lleva a cabo durante una extensa profase I, la cual se divide en cinco etapas (leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis) con base a la estructura de los cromosomas (Fig. 2). La asociación inicial de los cromosomas homólogos se cree es mediada por el apareamiento de bases entre cadenas complementarias de ADN durante la etapa leptoteno antes de que la cromatina este altamente condensada. El acercamiento de los cromosomas homólogos haciendo una sinapsis ocurre

durante el zigoteno. En esta etapa se forma una estructura proteica a semejanza de un cierre, llamada complejo sinaptonémico, a lo largo de los cromosomas apareados. Este complejo mantiene a los cromosomas homólogos asociados estrechamente y alineados uno con otro durante la etapa de paquiteno donde ocurre la recombinación ("*crossing over*") entre los cromosomas homólogos en sitios llamados quiasmas de recombinación. El complejo sinaptonémico desaparece en diploteno, durante esta etapa cada par de cromosomas (llamado bivalente) consiste de cuatro cromátidas, durante la diacinesis los cromosomas están altamente condensados y es una etapa de transición hacia la metafase I.

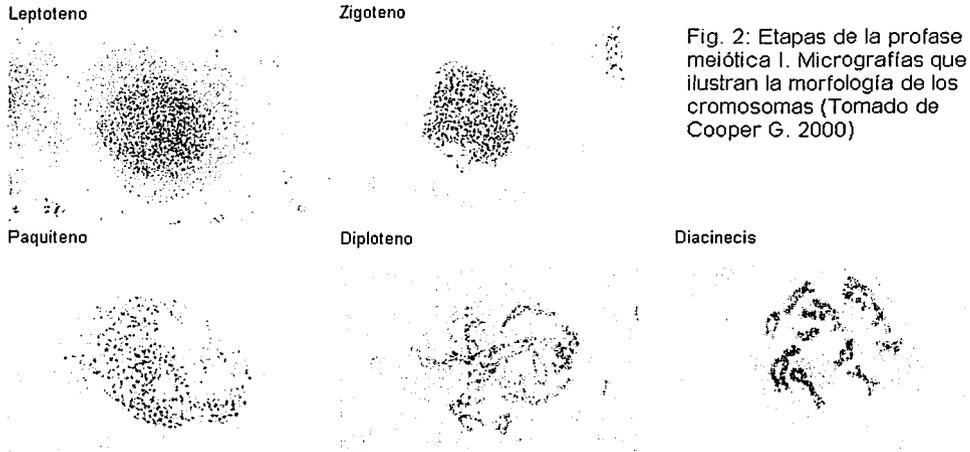


Fig. 2: Etapas de la profase meiótica I. Micrograffas que ilustran la morfología de los cromosomas (Tomado de Cooper G. 2000)

En la metafase I, los cromosomas bivalentes se alinean al huso, quedando los cinetocoros de los cromosomas homólogos en lados opuestos apuntando hacia los polos del huso. Durante la anafase I se disocia el quiasma, quedando separados los cromosomas homólogos y los microtúbulos se contraen hacia los polos del huso y jalan a los homólogos a través de sus cinetocoros, al final de la meiosis I cada célula hija contiene un miembro de cada par de cromosomas que consiste en dos cromátidas hermanas. La meiosis II inicia después de la citocinesis, cuando usualmente los cromosomas ya están descondensados y la

meiosis II se lleva a cabo de manera similar que una mitosis dando como resultado cuatro células hijas con una cromátida hermana de cada cromosoma del par de homólogos quedando como células haploides (Cooper G. 2000).

Complejo sinaptonémico.

Mantiene una estructura general muy conservada a lo largo de la evolución. 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). 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 lo largo del eje y en cercanías a la envoltura nuclear (Moens et al. 1998).

El ancho del complejo es de 210 nm, con dos elementos laterales de aproximadamente 60 nm de grosor y un espacio central de alrededor de 100 nm (Solari A.1999).

Los elementos laterales están constituidos por un material amorfo y muy afín a las tinciones de plata y al ácido fosfotúngstico (a pH 5 a 7), característica que depende de su contenido de proteínas básicas. En algunas especies cada elemento lateral puede mostrar componentes lineales, sin embargo esta subdivisión en filamentos (2 o mas) no es permanente y, en especial, no se encuentra durante el diploteno ni durante el zigoteno, cuando los ejes están vinculados con los desplazamientos cromosómicos. Los elementos laterales conforman el espacio donde las dos cromátidas de un cromosoma se asocian y se abren en amplios lazos de cromatina que se encuentran dispuestos como un halo alrededor de los elementos laterales. Estos elementos laterales están constituidos

de proteínas, aunque existe ADN central en la base de los lazos de cromatina (Solari A. 1999) y finos filamentos de ADN atravesando la parte medial del elemento lateral en forma de asas, los cuales tienen ARN asociado antes de su incorporación al elemento lateral (Ortiz R. et al. 2002).

Cuando el complejo sinaptonémico se encuentra en formación, cada elemento lateral frecuentemente se continua con un par de filamentos finos de ADN que se encuentran en forma de asas de diferente tamaño, representando a las cromátidas hermanas de uno de los cromosomas homólogos. Uno de estos filamentos está localizado en la parte medial del elemento lateral, mientras que el otro se ubica en la parte exterior del elemento lateral con numerosas asas (Ortiz R. et al. 2002)

La región central del complejo sinaptonémico está constituida por elementos fibrilares de muy pequeño diámetro (1.6 a 2 nm), los filamentos transversales, los cuales se ha sugerido que corresponden a dos α - hélices proteínicas entrelazadas. Estos filamentos son rectos e insensibles a la ADNasa, pero digeribles por la tripsina, atraviesan el espacio entre el elemento lateral y el central, y por lo menos algunos de ellos se superponen con otros filamentos que provienen del otro elemento lateral. En medio del espacio central estas fibrillas se asocian con otro material, de tipo globular, y con filamentos del mismo diámetro pero dispuestos longitudinalmente, que son los que componen el elemento central (Solari A. 1999).

Espermatogénesis.

Es el proceso mediante el cual se producen los espermatozoides en los túbulos seminíferos de testículo (Alberts B. et al. 1996).

Las paredes del tubo seminífero contienen a las células germinales inmaduras, denominadas espermatogonias, que descansan sobre el borde de los túbulos seminíferos junto a la membrana basal, son células diploides que proliferan por

medio de una mitosis ordinaria. Cada espermatogonia incrementa su tamaño y se diferencia en espermatocito primario, el cual sufre la primera división meiótica produciendo espermatocitos secundarios, los dos espermatocitos secundarios sufren la segunda división meiótica originando cuatro espermátidas, cada una conteniendo un número haploide de cromosomas. Una espermátida puede contener todos los cromosomas que heredó de su madre o aquellos que fueron heredados de su padre o la combinación de ambos. Sin más divisiones las espermátidas son transformadas en espermatozoides maduros (Alberts B. et al. 1996) (Fig. 3).

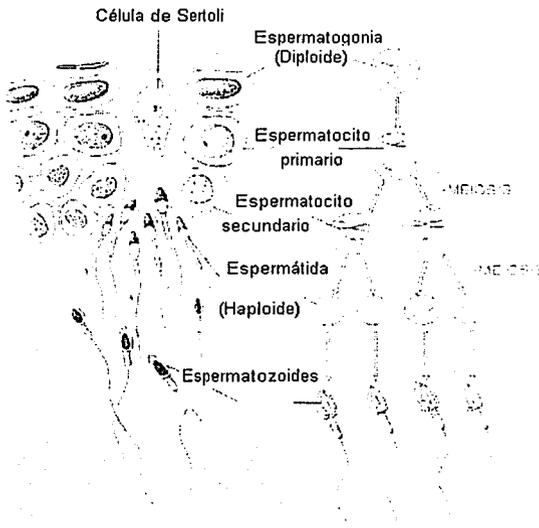


Fig. 3: Esquema de la espermatogénesis. La espermatogonia sufre una división para formar el espermatocito primario el cual sufre la primera división meiótica para formar espermatocitos secundarios que por medio de la meiosis II forma las espermátidas que sufren un proceso de maduración para formar espermatozoides (Tomado de Hickman C. et al. 1995)

Ciclos y ondas espermatogénicas.

La espermatogénesis comienza en una célula del tallo germinal o espermatogonia del tipo A, que proporciona el punto de partida de una serie espermatogénica. La cinética de la espermatogénesis se caracteriza por tres fenómenos notables: 1) en cualquier segmento dado el túbulo seminífero, las células del tallo germinal inician una serie de divisiones mitóticas que preceden a la meiosis en intervalos

extremadamente regulares (en la rata Sherman este intervalo es de 12 días, en el ratón de 8.6 días), 2) una vez que las células del tallo germinal han iniciado el proceso de multiplicación y diferenciación, cada paso de la espermatogénesis tiene una duración fija y constante; 3) en cualquier área del epitelio seminífero, antes de que la producción haya logrado la formación de los espermatozoides, varias series nuevas de células del tallo germinal inician su desarrollo que transcurre simultáneamente (Austin C.R. y Short R.V. 1982).

Estos tres factores explican la alineación típica de las células germinales a lo largo del epitelio seminífero, en la mayoría de los mamíferos, exceptuando al hombre, el epitelio seminífero está compuesto por capas concéntricas de células germinales que se encuentran en fases de desarrollo progresivamente más avanzadas partiendo desde la periferia hacia el centro del túbulo. Cada capa está compuesta por células que se encuentran exactamente en la misma fase, y las diferentes generaciones celulares o fases de desarrollo están relacionadas entre sí en un orden constante y bien definido. Por lo tanto, cada capa constituye una generación de células germinales que se desarrollan sincrónicamente y en una correlación fija con las otras generaciones. En la rata, por ejemplo, las espermátidas maduras (las que se encuentran en el paso 19 de la espermiogénesis), que se localizan en el centro del túbulo, siempre se encuentran con los espermatoцитos primarios a la mitad del paquiteno, con espermatoцитos en el preleptoteno y con espermatoгонios del tipo A, en las diferentes capas (Austin C.R. y Short R.V. 1982) (Fig 4).

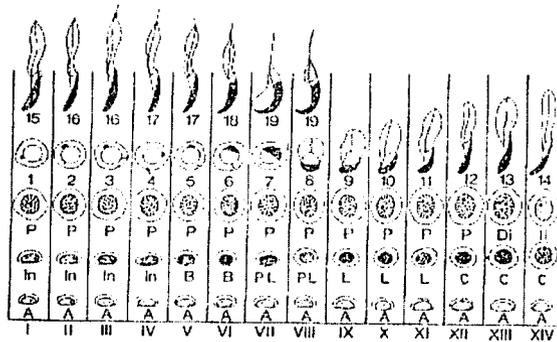


Fig. 4: Composición de las catorce asociaciones celulares que se observan en el epitelio seminífero de rata. Cada columna conata de varios tipos de células que forman una asociación celular o la fase del ciclo (que se identifican con números romanos en la base de la figura). Las diferentes asociaciones celulares se suceden una a otra desde la fase I a la XIV. La sucesión de las catorce asociaciones celulares constituye el ciclo del epitelio seminífero. Abreviaciones A, In, B: espermatogonias tipo A, intermedio y B; PL, L, C, P, Di: espermatoцитos primarios durante el preleptoteno, leptoteno, cigoteno, paquiteno y diacinecisis respectivamente; II, espermatoцитos secundarios; del 1 al 19 las fases sucesivas de la espermiogénesis. (Tomado de Austin C.R. y Short R.V. 1982)

Dimorfismo sexual en meiosis.

El dimorfismo sexual en meiosis ocurre en el comportamiento de los cromosomas; así mientras que en ovocitos los cromosomas sexuales son activos transcripcionalmente, en espermatoцитos son inactivos y la conformación de la heterocromatina es diferente en la misma especie (Mckee B. y Handel M. 1993). La inactivación de los cromosomas sexuales meióticos que sufren los cromosomas X e Y en células germinales de machos es distinta a la inactivación del X, que ocurre en las hembras de los mamíferos, debido a la compensación de dosis (dosage compensation), y que se presenta en células somáticas y ovogonias, pero no en meiocitos. Los cromosomas homólogos de hembras homogámicas se aparean y recombinan para asegurar la segregación del cromosoma X en anafase I y prevenir las alteraciones cromosómicas, mientras que la heteromorfia de los cromosomas X e Y no permite que se recombinen en su totalidad ya que el intercambio de información podría resultar en un entrecruzamiento ectópico entre secuencias repetidas de cromosomas no homólogos, o en daños cromosómicos irreparables, así como en rupturas de la doble cadena de ADN en zonas no heterólogas. La conformación de la eucromatina de los cromosomas sexuales en ovocitos facilita el apareamiento de

los cromosomas, mientras que la conformación de heterocromatina de los cromosomas X e Y en espermatocitos evita la recombinación (Mckee B. y Handel M. 1993).

Se propone que este dimorfismo en el comportamiento de los cromosomas sexuales en meiocitos es la causa del nivel de recombinación diferencial en organismos heterogaméticos y homogaméticos. La condensación de los cromosomas sexuales es una adaptación meiótica para prevenir la iniciación de daños potenciales en los eventos de recombinación de regiones no homólogas de los cromosomas X e Y (Mckee B. y Handel M. 1993; Jablonka E. y Lamb M. 1988, 1990), dicha condensación también está involucrada en la inactivación de los cromosomas sexuales (Hoyer-Fender S. et al. 2000 b).

Comportamiento de los cromosomas sexuales durante la meiosis.

Meiosis en hembras.

En las ovogonias de hembras mamíferos, así como en células somáticas, un cromosoma X sufre compensación de dosis, debido a que tiene un cromosoma X activo, permaneciendo en forma de heterocromatina e inactivo transcripcionalmente. Sin embargo en las células germinales, durante la profase meiótica, la cromatina del cromosoma X es reactivada por lo que, a diferencia de todas las otras células del cuerpo, los ovocitos tienen dos cromosomas X activos transcripcionalmente y la conformación de la cromatina se distingue de la autosómica (Mckee B. y Handel M. 1993, Peters A. et al. 1997).

Meiosis en machos.

El comportamiento de los cromosomas sexuales durante la meiosis se ha estudiado intensamente En 1891 Henking observa el comportamiento del cromosoma X, siete años después Lenhossek observó un cuerpo grande y

densamente teñido en el núcleo de espermatocitos de mamíferos durante la profase meiótica (paquiteno). Esta estructura recibió diferentes nombres, por ejemplo cuerpo intranuclear por Lenhossek en 1898; nucleolo cromático por Painter en 1924; heterocariosoma por Minouchi en 1928, y vesícula X por Makino en 1941. Fue descrito con detalle en muestras incluidas en parafina, cortando tejidos de muchas especies de mamíferos (Solari A. 1974).

Regaud (1910) describe con detalle la evolución de este cuerpo durante la primera profase meiótica en espermatocitos de rata, y hace una clara distinción entre el cuerpo de Lenhossek y el verdadero nucleolo. Guthertz (1922) describió este cuerpo en espermatocitos de ratón y notó la existencia de una región nucleolar asociada a la parte cromosómica (Solari A. 1974)

A pesar de que se ha obtenido mucha información de la interrelación X-Y en la primera metafase meiótica en diferentes mamíferos, hasta el momento no existe acuerdo acerca de la etapa de condensación de los cromosomas XY en espermatocitos de mamíferos (Solari A. 1974).

El criterio para definir morfológicamente la etapa de leptoteno es que contiene largos y delgados filamentos de cromatina, los ejes cromosómicos de los cromosomas homólogos se encuentran alineados formando estructuras conocidas como "escaleras de doble cuerda" (Ortiz R. 2002) y los cromosomas se aprecian como estructuras plumuladas (Ortiz R. 2002), los espermatocitos de humanos y de ratón no presentan los cromosomas XY condensados. El zigoteno es una etapa difícil de distinguir claramente, aunque el núcleo muestra procesos de apareamiento (Solari A.1974, Moses M. 1977).

Hay un acuerdo general según el cual en las etapas que siguen del leptoteno los cromosomas sexuales forman una masa sencilla de heterocromatina, el cuerpo XY (Solari A.1974). Esta idea es soportada por observaciones de apariciones

simultáneas de complejos sinaptonémicos y de cuerpos XY en espermatocitos de ratones (Solari A. 1974).

Por lo tanto el núcleo de espermatocitos de ratón en leptoteno no presenta un cuerpo condensado, pero los espermatocitos en etapa de paquiteno muestran un claro y definido cuerpo XY.

Los cromosomas XY pueden no estar completamente unidos uno al otro durante el zigoteno (Solari A. 1974).

Durante el paquiteno la estructura del cuerpo XY es muy evidente al igual que en diploteno.

Se ha advertido que existe una relación entre el cuerpo XY y el nucleolo de espermatocitos de ratones, sin embargo estudios estructurales y ultraestructurales en espermatocitos de humanos, ratas y ratones demuestran que no siempre existe una relación entre el cuerpo XY y el nucleolo, dicha relación, cuando la hay, puede ser de dos tipos, dependiendo de la localización del organizador nucleolar en los cromosomas sexuales, como en el ratón (Onho 1957 citado por Solari A. 1974), o en los autosomas, como en el hombre (Ferguson-Smith 1964 citado por Solari A. 1974). En el primer caso (organizador nucleolar en los cromosomas sexuales), una cercana asociación es siempre desarrollada entre el nucleolo y el cuerpo XY. En el segundo caso (organizador nucleolar en autosomas) el nucleolo y el cuerpo XY se asocian ocasionalmente en algunas células; la primera asociación está restringida a pocas especies, mientras que la segunda asociación se encuentra más comúnmente (Solari A. 1974). Sin embargo, cuando existe esta relación, ambas estructuras están separadas por un claro y estrecho espacio ocasionalmente atravesado por finas fibras, el cuerpo XY y el nucleolo no comparten estructuras ribonucleoproteicas (RNP) y la cromatina del cuerpo XY no penetra en el nucleolo (Echeverría O. et al. 2003). Las finas fibras que atraviesan el espacio entre ambas estructuras son probablemente finos filamentos de proteínas. Por lo que la relación espacial entre el cuerpo XY y el nucleolo es

únicamente una yuxtaposición la cual aparece muy frecuentemente en ratas y cobayos (Echeverría O. et al. 2003).

Cuerpo XY.

Estudios citoquímicos clásicos revelan que el cuerpo XY es positivo a la tinción de Feulgen, específica para ADN, pero en algunas especies la tinción no es muy homogénea mostrando una diferencia en las intensidades de tinción, lo que corresponde a una condensación diferencial de los cromosomas XY, el cromosoma X es periférico en el cuerpo XY, y en algunas etapas el cromosoma X puede estar menos condensado que el interior del cuerpo XY que es el cromosoma Y (Solari A.1974).

Las descripciones de la ultraestructura del cuerpo XY muestran que está formado de dos componentes: (1) cromatina fibrilar, de menos de 100 \AA de ancho, la cual tiene diferentes grados de compactación en distintas especies; (2) filamentos o ejes, los que se acomodan en un patrón fijo dentro de la masa formada por la cromatina fibrilar. Invaginaciones en forma de hilo del material granular del nucleolo pueden aparecer como componentes accesorios dentro del cuerpo XY en el paquiteno medio o tardío. La masa principal del cuerpo XY, constituida de cromatina fibrilar, contiene ADN, por otra parte existe evidencia de que el complejo sinaptonémico y los ejes cromosómicos contienen ARN (Echeverría O. et al. 2003) además de la sustancia de construcción proteica (Solari A.1974); y se ha sugerido que los elementos laterales y los ejes (Esponda P. y Jiménez-Martin C. 1973) están compuestos de ribonucleoproteínas en espermatoцитos de ratas, basados en resultados de la tinción de uranilo – EDTA – plomo (Solari A. 1974, Vázquez – Nin G. y Echeverría O. 1976), que desaparecen con el tratamiento de ARNasas y la técnica preferencial para ADN corrobora esta evidencia (Vázquez – Nin G. y Echeverría O. 1976). En etapas tempranas de la profase meiótica pocas estructuras ribonucleoproteicas (RNPs) se localizan en la periferia del cuerpo

sexual, sin embargo en paquíteno tardío y diploteno inicial numerosas fibras ribonucleoproteicas aparecen rodeándolo (Echeverría O. et al. 2003).

En lo que corresponde a la evolución de los componentes ultraestructurales del cuerpo XY, durante el leptoteno y el zigoteno temprano la cromatina compacta es muy escasa, en el zigoteno y el paquíteno temprano, el área ocupada por la cromatina del cuerpo XY es mayor que la de los autosomas, y por lo tanto la densidad de la cromatina del cuerpo XY es menor, también se ha observado que durante el zigoteno tardío la cromatina que rodea los ejes cromosómicos comienza a doblarse hacia la región interna de los cromosomas y se observan fibras de cromatina, del cuerpo XY en formación, en contacto con filamentos de cúmulos de cromatina compacta (Echeverría O. et al. 2003). Durante el paquíteno medio, el grado de compactación es semejante en el cuerpo XY y en los autosomas. Durante el paquíteno tardío y el diploteno temprano, los autosomas se encuentran descondensados y el cuerpo XY, que se aprecia desde el paquíteno medio, se observa más oscuro que los autosomas. Después del diploteno temprano el par XY y los autosomas tienen un incremento en su compactación; durante la metafase es difícil de distinguir uno del otro (Solari A. 1974).

Durante la formación del cuerpo XY las fibras de cromatina de los cromosomas X e Y adquieren formas fibrogranulares o estructuras en forma de cuerda de collar. Cuando el cuerpo XY es maduro se observan fibras en forma de collares en continuidad con la cromatina externa y se pueden encontrar en asociación a gránulos pericromatinianos pendunculados, lo que sugiere que la cromatina de los cromosomas sexuales no está completamente contenida dentro del cuerpo XY y que no toda la cromatina de estos cromosomas está transcripcionalmente inactiva (Echeverría O. et al. 2003).

El cuerpo XY mantiene una muy cercana interrelación con la envoltura nuclear, como todos los bivalentes el par XY está anclado a la envoltura nuclear por sus extremos finales (Woollam 1966 citado por Solari A. 1974), el anclaje del cuerpo

XY a la envoltura se da por la unión de los telómeros de los ejes cromosómicos X e Y a ella, por lo que los ejes adquieren una forma de arco, de manera que los extremos finales de los ejes permanecen perpendiculares con respecto al interior de la envoltura nuclear; este reajuste de los ejes durante el zigoteno permite que una amplia superficie se ancle. Los ejes dentro del cuerpo XY sufren una serie de cambios desde el zigoteno temprano hasta la primera metafase. Los ejes aparecen en el zigoteno temprano bastante rectos y densos, constituidos por dos filamentos estrechamente unidos aproximadamente a 400 \AA en el paquiteno los ejes son más flexibles y los dos componentes de cada eje se separan uno de otro, esta separación llega a su máximo en el paquiteno medio. Durante el paquiteno tardío los dos componentes de los ejes nuevamente se acercan y se vuelven rectos (Solari A. 1974).

Se observan dos ejes dentro del cuerpo XY. El tamaño, la morfología y el patrón espacial de estos dos ejes son constantes en etapas específicas de la profase (Solari A. 1974) (Fig. 5). En el ratón el eje largo corresponde al cromosoma X y tiene una longitud aproximada de $8.9 \mu\text{m}$, mientras que el eje corto, corresponde al cromosoma Y que tiene una longitud aproximada de $3.5 \mu\text{m}$. Los dos ejes siempre muestran cuatro extremos anclados a la envoltura nuclear; dos se encuentran muy cercanos debido a que tienen una zona de homología donde se aparean formando un extremo común, y los otros dos son los extremos finales (Fig. 5). Esta zona de homología se aparea originando un complejo sinaptonémico (SC), en el cual cada elemento lateral (LE) corresponde a un eje (Fig. 5). En el ratón la longitud de este complejo sinaptonémico se va acortando progresivamente de $1.9 \mu\text{m}$ en el zigoteno a $0.25 \mu\text{m}$ en el diploteno. La formación del complejo sinaptonémico en la zona de homología es una característica constante del cuerpo XY en ratones, en humanos y en ratas (Solari A. 1974); además de este acortamiento ocurre un segundo cambio en el complejo sinaptonémico, el cual empieza en paquiteno tardío y continúa durante el diploteno; este consiste en la disociación del elemento central y de las fibras transversales que ocupan el espacio central de dicho complejo. Entonces se puede observar una zona densa,

donde antes se encontraba el complejo sinaptonémico, lo cual se asemeja a la prueba morfológica de la recombinación en los autosomas (quiasma de recombinación) (Solari A. 1974).

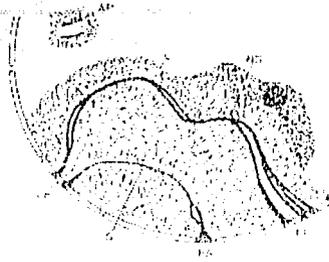


Fig. 5: Esquema de la ultraestructura del cuerpo XY en paquitenio medio. Ejes largo (L) y corto (S), extremo común (CE) con un pequeño complejo sinaptonémico; extremos finales de los ejes largo (FL) y corto (FS), gránulos nucleolares (NG), par autosomal (AP) (Tomado de Solari A. 1974).

Formación del cuerpo XY.

La formación del cuerpo XY en la transición leptoteno - paquitenio involucra la compactación de la cromatina extendida alrededor de los ejes cromosómicos en formación. La compactación de la cromatina comienza en zigoteno cuando los ejes cromosómicos se forman por filamentos finos rodeados de asas de cromatina. Así mismo la compactación comienza en una o dos regiones del cromosoma, los filamentos de cromatina progresivamente adquieren una forma fibrogranular los cuales se doblan formando una masa tridimensional no tan compacta como los cúmulos de cromatina compacta (Echeverría O. et al. 2003).

En el leptoteno y parte del zigoteno la cromatina de los cromosomas sexuales, igual que la de los autosomas, se asocia con fibras ribonucleoproteicas y gránulos. Durante la compactación de la cromatina las estructuras ribonucleoproteicas y la ARN polimerasa II desaparecen, por lo que el cuerpo sexual maduro carece de ARN polimerasa II, hnRNPs y ARNs pequeños nucleares ricos en uridina

(snURNAs) involucrados en la transcripción y procesamiento del RNA pre mensajero (Echeverría O. et al. 2003).

Durante la meiosis, las regiones diferenciales de los ejes en el cuerpo XY humano sufren una serie de modificaciones secuenciales (se ramifican, se forman excrescencias y nódulos densos) que permiten determinar un patrón temporal de las secuencias de eventos durante el estadio de paquiteno (Solari A. 1999)

Contenido genético de los cromosomas X e Y

En la parte eucromática del cromosoma Y humano se han definido por lo menos 12 genes y pseudogenes, algunos de los cuales son de gran importancia, empezando por el gen SRY o conmutador del sexo. En el cromosoma X humano se conoce un número considerable de genes situados en él. Los cuales (excepto los de la región pseudoautosomal) presentan ligamiento al sexo (Solari A. 1999).

El apareamiento de los cromosomas sexuales asegura su segregación.

Los cromosomas homólogos se aparean durante la profase meiótica I y luego se segregan, sin embargo los cromosomas sexuales en machos de mamíferos no son homólogos en su totalidad. Las hembras tienen dos cromosomas X, que se aparean y se segregan de la misma forma que los otros homólogos, pero los machos tienen un cromosoma X y un Y, el apareamiento necesario es posible gracias a una pequeña región de homología entre los cromosomas X e Y, situada en uno de sus extremos. En esta zona ambos cromosomas se aparean y se entrecruzan durante la primera profase meiótica. El quiasma correspondiente a esta pequeña recombinación genética es suficiente para mantener apareados a los cromosomas XY en el huso, de manera que normalmente durante la espermatogénesis se forman dos tipos de espermatozoides unos conteniendo un cromosoma X y otros conteniendo un cromosoma Y (Alberts B. et al. 1996)

Consecuencias de la inactivación del cromosoma X de células germinales de machos.

Se ha propuesto que la inactivación de los cromosomas sexuales meióticos no es una característica esencial de la gametogénesis en células heterogaméticas y que en el cromosoma X están codificados productos que inhiben la espermatogénesis. Sin embargo, no hay evidencia de proteínas codificadas por el cromosoma X, que sean perjudiciales para las células germinales. De hecho en las células espermatogénicas existen diversos mecanismos para asegurar la disponibilidad de productos codificados normalmente en el cromosoma X. Una de estas estrategias es la presencia de genes autosómicos alternativos, los cuales son variantes de los codificados por el X pero similares funcionalmente, aunque existen genes codificados por el X que no tienen genes autosómicos alternativos, por lo que los niveles de estos productos disminuyen en cuanto el cromosoma X se inactiva. Estudios en insectos machos sugieren la hiperactivación compensadora del cromosoma X antes de la meiosis lo que asegura la disponibilidad de productos codificados por el X durante la espermatogénesis; la evidencia del mecanismo compensador hace improbable que la inactivación del cromosoma X involucre la producción de inhibidores de la espermatogénesis (Mckee B. y Handel M. 1993).

Secuencias pseudoautosomales.

Aunque han divergido mucho, en humanos y ratones, el par de cromosomas X e Y han conservado una región limitada de homología, la cual es llamada región pseudoautosómica que se localiza en los extremos distales de los brazos cortos de los cromosomas X e Y en humanos y en los extremos distales de los brazos largos de los cromosomas sexuales de ratones (Willis 1989 citado por Mckee B. y Handel M. 1993) los cuales se aparean en la meiosis, sin embargo no hay evidencia de la actividad transcripcional de la zona apareada (Mckee B. y Handel M. 1993).

Homología de los cromosomas sexuales.

La inactivación de los cromosomas sexuales meióticos se ha documentado ampliamente en mamíferos y algunos artrópodos como son los grillos, por otra parte existen ejemplos de organismos con cromosomas sexuales homomórficos que sufren inactivación de los cromosomas sexuales meióticos especialmente algunos mosquitos (Mckee B. y Handel M. 1993).

Sin embargo no todas las especies con cromosomas sexuales heteromórficos están caracterizadas por formar un típico cuerpo XY, la más notable excepción en vertebrados no mamíferos son los reptiles, anfibios y algunas aves (Solari A. 1992 citado por Mckee B. y Handel M. 1993). En el caso de los espermatocitos de algunos anfibios los cromosomas sexuales no se organizan en el típico cuerpo sexual, estos exhiben un patrón de condensación diferente al de los autosomas, lo cual sirve para evitar la recombinación promiscua de los cromosomas sexuales (Mckee B. y Handel M. 1993).

Proteínas asociadas al cuerpo XY.

Estudios posteriores ayudaron a identificar bioquímicamente tres proteínas en asociación al cuerpo XY. Proteína XY77 (Movilidad electroforética: Mr 77 000) ha sido en todo el cuerpo XY (Kralewski M. et al. 1997, Kralewski M. y Benavente R. 1997). Proteína P51 (Mr 51 000) distribuida sobre todo el cuerpo XY, pero también se localiza en la heterocromatina centromérica de los autosomas de líneas germinales (Smith A. y Benavente R. 1992), proteína XY40 (MR 40 000) esta proteína tiene una distribución más limitada y se encuentra en los elementos axiales del cuerpo XY (Smith A. y Benavente R. 1992). La proteína XY40 se detecta en paquiteno temprano, las proteínas XY77 y P51 fueron descritas en el cuerpo XY solo durante el paquiteno tardío, pero son evidentes también durante el diploteno (Kralewski M. y Benavente R. 1997). Debido a que XY77 sólo se localiza hasta el paquiteno tardío no participa en la formación del cuerpo XY (Kralewski M.

et al. 1997), XY40 se transcribe en varios tejidos pero su traducción está restringida a la espermatogénesis, esto aunado a los estudios citoquímicos que demuestran que la proteína XY40 y su correspondiente ARN se enriquecen en espermatoцитos en paquiteno (Smith A. y Benavente R. 1992), refuerza la hipótesis de que la proteína puede jugar un rol importante en el comportamiento alocíclico de los cromosomas sexuales durante la meiosis en machos (Alzheimer M. et al. 1997).

La asinaptina ASY (Mr 90 000) fue localizada en la meiosis de machos en asociación con la cromatina del cromosoma X e Y del cuerpo sexual, exclusivamente en espermatoцитos en paquiteno y diploteno. ASY aparece en paquiteno medio haciéndose más abundante en paquiteno tardío y diploteno, desapareciendo abruptamente en metafase I. Esta proteína no es exclusiva del cuerpo XY, como lo son XY40 y XY77, ya que también se localiza en la cromatina autosómica no apareada. Por lo que ASY aparece en el cuerpo XY como respuesta a la presencia de ejes que no logran completar la sinapsis (Turner J. et al. 2000). La proteína del cuerpo XY (XYbp) se localiza principalmente en el cuerpo XY de espermatoцитos y en los centrómeros de células somáticas y germinales en todas las fases del ciclo celular (Párraga M. y del Mazo J. 2000).

Es bien sabido por los estudios de microscopía óptica y microscopía electrónica que la condensación de la cromatina de los cromosomas sexuales difiere de la de los autosomas, así como el tiempo al cual los cromosomas sexuales se aparean, particularmente en rata los cromosomas sexuales entran al paquiteno sin sinapsis, la cual se da parcialmente durante el paquiteno medio.

La transformación del cromosoma X de la forma activa a la forma inactiva en las células somáticas femeninas está mediada por una molécula de ARN, la cual no traduce en proteína, producida por el gen *Xist* (transcrito inactivo inespecífico X). El *Xist* ARN es requerido para la iniciación de la inactivación del cromosoma X (Ayoub N. et al. 1997), y determina la compactación de la cromatina de ese eje

cromosómico (Solari A. 1999). Esto es apoyado por la presencia de Xist ARN en el dominio de la cromatina X inactiva (conocida como cuerpo o corpúsculo de Barr) en núcleos somáticos de hembras humanas, lo que sugiere que Xist ARN está estructuralmente involucrado en la inactivación del cromosoma X, el cual tiene un centro inactivador – X que ayuda a definir cual de los dos cromosomas X en células somáticas de hembras mamíferos se inactiva (Plath K. et al. 2002). Por otra parte se ha encontrado Xist ARN a lo largo de los ejes cromosómicos X e Y (Ayoub N. et al. 1997) y en el interior del cuerpo XY, así como U2snRNA en la periferia del cuerpo XY, que es donde se encuentra el gen Xist ADN del cromosoma X, que transcribe y procesa por la presencia de U2snRNA (Ayoub N. et al. 1997). Xist también es expresado durante la condensación/inactivación del cromosoma X y contribuye a la conformación heterocromática del cuerpo XY. El traslado de moléculas de Xist ARN del cromosoma X al Y requiere de un modo de función cuasi-cis Xist ARN conocido únicamente en la interrelación de los cromosomas X e Y por lo que el agente de transferencia de la característica de inactivación es Xist ARN (Ayoub N. et al. 1997). Aunque algunos experimentos, donde el gen Xist fue suprimido en hembras de ratones produciendo descendencia que muere en embriogénesis y en machos que producen descendencia fértil y normal, hacen suponer que Xist ARN es requerido para la compensación de dosis, pero no para la inactivación del cromosoma X en la espermatogénesis (Marahrens Y. et al. 1997). Sin embargo la fertilidad en machos no requiere necesariamente de la inactivación del cromosoma X (Hoyer-Fender S. et al. 2000 b).

Xist ARN preferencialmente se encuentra asociado con histonas hipoacetiladas H3 y H4, por lo que Xist ARN se encuentra asociado a regiones promotoras hipoacetiladas de los genes inactivos del X, lo cual puede producir complejos ribonucleoproteicos que poseen actividad modificadora de la cromatina (Gilbert S. et al. 2000)

La histona macroH2A se encuentra en células germinales de ratones machos en el cuerpo XY. MacroH2A1.2, subtipo de H2A, se localiza preferencialmente

concentrada en el cromosoma X inactivo de hembras mamíferos lo que sugiere que la inactivación del cromosoma X involucra una alteración nucleosomal en machos (Costanzi C. y Pehrson J. 1998, Richler C. et al. 2000) y hembras en el cuerpo de Barr (Perche P. et al. 2000). Además macroH2A1.2 también se concentra predominantemente en el cuerpo XY de espermatoцитos en paquitenio temprano, lo que sugiere que esta alteración de la estructura nucleosomal puede estar involucrada en la inactivación del cromosoma X en células germinales de machos (Hoyer-Fender S. et al. 2000 b). Durante el paquitenio tardío macroH2A1.2 se encuentra distribuida en todo el núcleo aunque más concentrada en el cuerpo XY. Inicialmente macroH2A1.2 reside en el centrosoma del cromosoma X y se extiende a todo lo largo del cromosoma al tiempo de su inactivación (Rasmussen T. et al. 2000). La presencia de macroH2A en el cuerpo XY aumenta la posibilidad de que el gen Xist pueda jugar un rol en la conformación de la cromatina del cuerpo XY, ya que Xist es requerido para la localización de macroH2A en el cromosoma X inactivo de fibroblastos de hembras (Csankovszki G. et al. 1999), aunque no necesariamente en el cuerpo XY (Turner J. et al. 2002). Si Xist está involucrado en la inactivación de los cromosomas sexuales en el cuerpo XY, la fertilidad de los machos que tienen la delección del gen Xist indica que hay mecanismos independientes de Xist para la inactivación de los cromosomas sexuales en el cuerpo XY (Hoyer-Fender S. et al. 2000 b, Turner J. et al. 2002).

La proteína M31 isoforma M31(p21), una proteína homóloga a las proteínas involucradas en el empaquetamiento del DNA con cromodominio HP1 (Proteína Heterocromática 1) de los genes homeóticos cromobox en *Drosophila*, se encuentra distribuida en el cuerpo XY desde el paquitenio medio hasta el paquitenio tardío en espermatoцитos de ratón, lo cual apoya la idea de que existe un mecanismo común para la represión heterocromática inducida, el silenciamiento de los genes homeóticos y la inactivación de los cromosomas sexuales durante la espermatogénesis en mamíferos (Motzkus D. et al. 1999). M31 también es un componente de la heterocromatina centromérica de los cromosomas, lo que sugiere que M31 está involucrada en la alta organización de

la cromatina específicamente en espermatocitos y espermatozoides (Hoyer-Fender S. et al. 2000 a).

M31 y MacroH2A1.2 se colocan en la región pseudoautosomal del cuerpo XY, que es el sitio de apareamiento del X e Y durante la meiosis de machos, por lo que se ha hipotetizado que estas proteínas pueden asegurar la unión y la disyunción normal de los cromosomas sexuales durante la metafase I (Tuner J. et al. 2001).

La proteína XMR (Mr 30 000) se localiza en el núcleo de espermatocitos de ratones en etapa de pre – leptoteno, aumenta durante el zigoteno tardío y disminuye progresivamente al entrar al paquíteno, en el cuerpo XY aparece durante el zigoteno y se concentra aún más durante el paquíteno tardío, la localización de esta proteína en el cuerpo XY se da en los ejes de los cromosomas sexuales (Calenda A. et al. 1994) y rodeando las asas de cromatina en los extremos finales de los ejes, aunque cuando se aparean los extremos finales, XMR desaparece de éstos, por lo tanto XMR tal vez participe en los eventos de inactivación del cromosoma X en meiocitos de machos mamíferos (Escalier D. y Garchon H. 2000),

También se ha localizado un receptor nuclear, designado GCNF (Factor nuclear de células germinales), así como su transcrito y proteína en espermatocitos en paquíteno tardío, por medio de inmunolocalización se observa un intenso marcado del factor nuclear de células germinales en el cuerpo XY y en espermátidas redondas, por lo que se piensa que este factor nuclear puede jugar un papel crucial en los eventos genéticos reguladores de la formación del cuerpo XY mediante la represión de la transcripción ya que interfiere con los procesos de rearreglo de la cromatina en forma de correpresor o desacetilador de las histonas; por esto el factor nuclear de células germinales puede participar en el estado de inactividad transcripcional de los cromosomas sexuales en el cuerpo XY, al producir una estructura de condensación heterocromática del ADN (Bauer U. et al. 1998).

Posteriormente se encontraron proteínas de recombinación Rad 51 / Dmc 1 en nódulos asociados con las regiones no apareadas de los cromosomas sexuales. Durante la meiosis de machos, estas proteínas se encuentran en los elementos axiales durante el reconocimiento y desaparecen cuando recombinan. La presencia de estas proteínas en el cuerpo XY no se asocian con el proceso de recombinación, o bien las proteínas aún permanecen debido a que no hay región de homología y la recombinación no se lleva a cabo (Echeverría O. et al. 2003).

Justificación.

El cuerpo XY se ha estudiado en su forma madura, pero no existe un acuerdo de la etapa de la profase meiótica en la cual se origina y se desconoce la ultraestructura de su formación, por lo que este trabajo se enfoca a localizar la etapa de la profase meiótica I en la cual se empieza a condensar la cromatina de los cromosomas sexuales X e Y, así como a conocer la ultraestructura de esta formación del cuerpo XY con ayuda del microscopio electrónico.

Hipótesis de trabajo: La formación del cuerpo XY se da en etapas iniciales de la profase meiótica I. En leptoteno se empieza a observar el acercamiento de los ejes cromosómicos autosómicos homólogos (alineamiento o escalerilla de doble cuerda) y la cromatina aún es muy laxa, por lo que en esta etapa está el inicio de la condensación del cuerpo XY o en la etapa de zigoteno que es donde los ejes cromosómicos homólogos hacen sinapsis y comienzan a evidenciarse condensaciones iniciales de cromatina autosómica, por lo que esta etapa también podría ser el de inicio de la condensación del cuerpo XY.

Objetivos.

1. Localizar la etapa de la formación del cuerpo XY (condensación de los cromosomas sexuales X e Y) por medio de técnicas generales de microscopía electrónica.
2. Detallar la ultraestructura de la cromatina y de los ejes cromosómicos del cuerpo XY durante su formación.

Material y Métodos.

Se utilizan testículos de ratas machos de la raza Wistar de 20, 21, 22, días de edad, ya que a estas edades se observa la presencia de espermatozoides primarios en los estados iniciales de la profase meiótica (Leblond C.P. y Clermont Y. 1952) y ratas adultas que se sacrifican para obtener los testículos y procesarlos de la siguiente forma:

Procesamiento del material biológico:

Fijación en glutaraldehído:

Se colocan muestras de testículos en una gota del fijador sobre una placa de cera y se seccionan en fragmentos de 1 mm^3 los cuales se pasan a los frascos con el fijador glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de fosfatos pH 7.3 a una concentración 0.2 M, permaneciendo en fijación durante una hora y media a temperatura ambiente (Vázquez-Nin G. H. y Echeverría O.M. 2000).

Fijación en paraformaldehído - photo flo.

Otras muestras de testículos se fijan en una mezcla de paraformaldehído al 1% más photo flo al 0.4% (detergente) en buffer de sacarosa al 0.1M y pH 9, ajustando el pH con borato de sodio al 0.1M en amortiguador de sacarosa a pH 9, esto con el fin de que el detergente entre en las células y produzca un extendido o dispersión del material nuclear; la mitad de estas muestras se lavan con amortiguador de fosfatos y se post fijan en glutaraldehído al 2.5% durante una hora a temperatura ambiente (Vázquez-Nin G. et al. 1989, Vázquez-Nin G. et al. 1992, Vázquez-Nin G. et al. 1994).

Lavados y deshidratación:

Después de fijadas las muestras (ambas fijaciones) se lavan con amortiguador de fosfatos tres veces durante 10 minutos cada lavado.

Posteriormente las muestras se deshidratan con alcoholes etílicos de diferentes concentraciones hasta llegar al alcohol absoluto seguido de óxido de propileno como paso para preinclusión (Vázquez-Nin G. H. y Echeverría O.M. 2000).

Nota: el óxido de propileno es el agente intermediario que permite una deshidratación más intensa a la vez que es solvente de la resina, lo que permite la sustitución del agua por la resina de inclusión en los espacios intermoleculares (Vázquez-Nin G. H. y Echeverría O.M. 2000).

Preinclusión:

Las muestras se colocan en el agente intermediario, posteriormente se pasan a una mezcla del agente intermediario con la resina epóxica de inclusión y posteriormente se cambian las muestras hacia resina pura (Vázquez-Nin G. H. y Echeverría O.M. 2000).

Inclusión:

La inclusión se realiza en resina epóxica y es necesaria para dar una consistencia firme y proporcionar soporte, para lo cual las muestras se colocan en moldes llenos de la resina epóxica y se polimerizan en una estufa a 60 °C durante 48 horas (Vázquez-Nin G. H. y Echeverría O.M. 2000).

Corte:

Una vez polimerizados los bloques se realizan cortes semifinos, con ayuda del microtomo Ultracut, de un grosor de 400 a 600 nm, los cuales se pasan a un portaobjetos y se tiñen con azul de toluidina-bórax y después se observan en el microscopio óptico con el fin de localizar las zonas con las células deseadas en preleptoteno, leptoteno y zigoteno (etapas VII a XIV de la onda espermatogénica) (Austin C.R. y Short R.V. 1982) para el corte de ultrafinos. Ya localizada la zona adecuada se retalla el bloque en forma pirámide con la muestra en la punta para poder realizar cortes ultrafinos en el microtomo de aproximadamente 60 nm (Vázquez-Nin G. H. y Echeverría O.M. 2000).

Se obtienen cortes ultrafinos seriados los cuales se recogen en una rejilla de cobre con una ranura en el centro, la cual posteriormente se coloca sobre una membrana de formvar; además se obtienen cortes aislados que son recogen en una rejilla de cobre con múltiples barrotos previamente cubierta con membrana de formvar. Todas las rejillas se llevan al contraste (Vázquez-Nin G. H. y Echeverría O.M. 2000).

Contraste:

Después de obtener los cortes ultrafinos colocados sobre las rejillas de cobre se procede al contraste con compuestos químicos de elevado número atómico, como el acetato de uranilo y el citrato de plomo, para dar contraste en el microscopio

electrónico. Esta tinción es general y se une a proteínas y ácidos nucleicos. Posteriormente se observan las rejillas en el microscopio electrónico y se toman fotografías para la interpretación de los resultados (Vázquez-Nin G. H. y Echeverría O.M. 2000).

Reconstrucción tridimensional:

Las fotografías, obtenidas de los cortes seriados de una rejilla, se copian en papel celofán con el fin de superponer todas las copias y obtener una reconstrucción tridimensional de la zona de interés en la serie, luego se realiza el esquema general de esta reconstrucción, observando así la morfología de los ejes cromosómicos durante la formación del cuerpo XY.

Resultados.

Se realizan cortes de testículos de ratas de 20, 21, 22 días de edad y adultas, se contrastan con la tinción general de acetato de uranilo y citrato de plomo y se observan en el microscopio electrónico.

Los cortes del material de rata de 20 días de edad presentan núcleos de espermatocitos primarios en etapas de pre - leptotenos, los cuales tienen la cromatina muy laxa y no se observan condensaciones, ni escalerillas de doble cuerda y mucho menos complejos sinaptonémicos.

Los cortes del material de rata de 21 días de edad presentan de la misma forma espermatocitos primarios en etapas de leptoteno y zigoteno, los cuales ya presentan indicios de condensaciones de la cromatina, escalerilla de doble cuerda, cromosomas plumulados y en algunos cortes se apreciaron complejos sinaptonémicos y nucleolos periféricos.

El material de rata de 22 días de edad presenta espermatocitos primarios en etapas avanzadas de la profase meiótica I (paquitenos y diplotenos), con zonas de cromatina compacta y con cuerpos XY maduros o zonas de heterocromatización bien definidas, complejos sinaptonémicos maduros y en disociación.

En los cortes de material de rata adulta se observa toda la onda espermatogénica con espermatocitos primarios en etapas avanzadas de la profase meiótica I (paquiteno, diploteno y diacinecís), pero las etapas iniciales de la profase meiótica I (leptoteno – zigoteno) son muy difíciles de localizar.

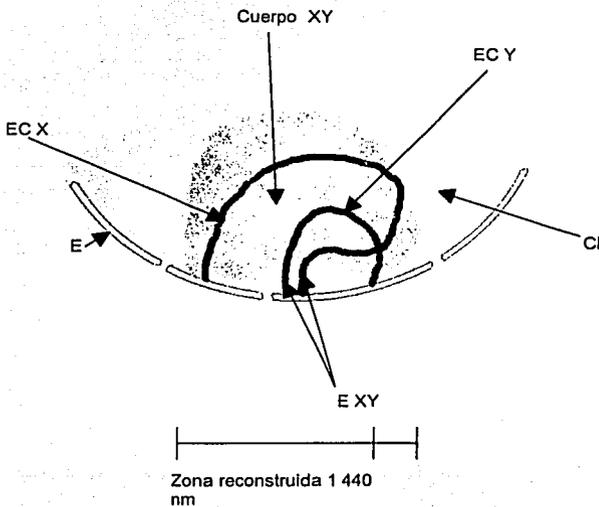
Por lo tanto se realizan cortes del material de rata de 21 días de edad obteniendo tres series de cortes ultrafinos continuos y cortes aislados de dicho material.

Serie 1:

La serie 1 tiene 24 cortes seriados de un núcleo de espermatozoides en etapa de leptoteno - zigoteno. En el corte 1 (plancha 1) se observa una zona de condensación de la cromatina diferente al resto de la cromatina laxa y cerca de la envoltura nuclear (zona punteada XYb, serie 1 corte 1); esta zona de condensación de la cromatina es apenas discernible del resto de la cromatina; dentro de esta zona se encuentran 4 restos de ejes cromosómicos cortados transversalmente (EC). La zona de condensación (XYb) se hace más evidente en los cortes 2, 3 (plancha 1) y está en contacto con la envoltura nuclear, los ejes cromosómicos siguen observándose en estos cortes; a partir del corte 4 (plancha 1), y hasta el corte 24 (plancha 3), ya se observa una zona de heterocromatización (XYb) con un arreglo nucleosomal más denso que el resto de la cromatina del núcleo, en este corte se observan los 4 ejes cromosómicos, uno de los cuales se encuentra ya en contacto con la envoltura nuclear y permanece hasta el siguiente corte, en el corte 5 (plancha 1) aparece el primer indicio de nucleolo (nl) cerca de la zona de heterocromatización (XYb) y de la envoltura nuclear (en), el nucleolo se hace más evidente a lo largo de la serie y desaparece en el corte 22 (plancha 3). En los cortes 6, 7 y 8 (plancha 1) se observan solo tres ejes cromosómicos dentro de la zona de heterocromatización, uno de estos tres ejes se ancla a la envoltura nuclear, observable en el corte 9 y 10 (plancha 2), y desaparece en el corte 11, mientras que los otros dos ejes continúan dentro de la zona de heterocromatización, permaneciendo así hasta el corte 14 y 15 (plancha 2) donde otro eje cromosómico se ancla a la envoltura nuclear, en estos cortes también se aprecia una disminución en la zona de heterocromatización; en los cortes 16 (plancha 2) hasta el 20 (plancha 3) ya solo se observa un eje cromosómico el cual se ancla en la envoltura nuclear en el corte 21 y 22 (plancha 3); la zona de heterocromatización se empieza a perder en el corte 22 y en los cortes 23 y 24 (plancha 3) ya es difícil de distinguir.

También se tomaron micrografías tres veces aumentadas de los cortes 4 y 7 de la serie 1 (Micrografías 1 y 2 respectivamente) (plancha 4), donde se observa que existen continuidades en forma de cuerdas de collar (flechas en micrografías 1 y 2) entre la zona de heterocromatización y el resto de la cromatina laxa del núcleo.

Con los cortes de la serie 1 se realiza un esquema de la reconstrucción tridimensional de la zona de heterocromatización y sus componentes (Esquema 1), cada corte mide aproximadamente 60 nm de grosor, por lo que al realizar la reconstrucción se tiene una profundidad de 1 440 nm, esta reconstrucción permite observar los ejes cromosómicos X e Y, su forma de arco, así como sus 4 extremos anclados a la envoltura nuclear, dos de los cuales conforman el extremo de homología (extremo común) y los otros dos son los extremos finales no homólogos de los ejes cromosómicos que se encuentran anclados a la envoltura nuclear, muy separados entre ellos y orientados en sentidos opuestos



Esquema 1: Reconstrucción tridimensional de la Serie 1 donde se observa la forma en arco de los ejes cromosómicos además del extremo donde los ejes tienen homología (E XY) y que en etapa de paquiteno estarán en sinápsis. EC X, Eje cromosómico X; EC Y, Eje cromosómico Y; Cl, Cromatina laxa; E, Envoltura nuclear, Cuerpo XY.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Serie 2:

La serie 2 consta de 21 cortes seriados de un núcleo de espermatocito de rata en etapa de zigoteno. En el corte 1 (plancha 5) se aprecia la zona de heterocromatización correspondiente al cuerpo XY (zona punteada, XYb), de igual forma que en la serie 1, se observan ejes cromosómicos dentro de la zona de heterocromatización, esta zona de heterocromatización se encuentra en contacto con la envoltura nuclear (en), no se observa un límite entre la zona de heterocromatización y el resto de la cromatina, y si se observan continuidades (flechas) entre estos tipos de cromatina. En los cortes 2 y 3 (plancha 5) se siguen apreciando los ejes cromosómicos (EC) cortados de forma longitudinal y transversalmente, así como las continuidades (flechas) entre la zona de heterocromatización (XYb) y la cromatina laxa. A partir del corte 4 (plancha 5) la zona de heterocromatización parece que se empieza a dividir en dos regiones unidas por continuidades (flecha triangular) y cerca de un eje cromosómico, por otra parte las continuidades con la cromatina laxa siguen apreciándose en la misma zona de los cortes anteriores; En el corte 5 (plancha 5) ya se observan dos regiones de heterocromatina bien definidas (XYb) unidas por una continuidad (flecha triangular), las continuidades con la cromatina laxa permanecen, y ya solo se observa un eje cromosómico cortado transversalmente dentro de la zona de heterocromatización; en los cortes 6, 7 y 8 (plancha 5) se observan las dos regiones de heterocromatización (XYb) unidas por medio de una continuidad (flecha triangular), el único eje cromosómico se sigue apreciando y las continuidades con la cromatina laxa aún permanecen (flechas), dichas continuidades con la cromatina laxa desaparecen en los siguientes cortes y en los cortes 9, 10, 11 y 12 (plancha 6) las dos regiones de heterocromatización siguen unidas por la continuidad (flecha triangular); es en el corte 13 (plancha 6) donde desaparece la continuidad que había entre las dos regiones de heterocromatización quedando separadas entre sí hasta el corte 15 (plancha 6) donde desaparece la pequeña región de heterocromatización. Por lo que en el corte 16 (plancha 6) solo se aprecia una zona de heterocromatización con un eje

cromosómico adentro, en los siguientes cortes (plancha 7) el eje cromosómico permanece hasta el último corte rodeado de heterocromatina que ya no se observa claramente en el último corte.

Se realizaron micrografías tres veces aumentadas del corte 4 y 12 de la serie 2 (Micrografías 3 y 4) (plancha 8). La micrografía 3 permite observar las continuidades (flechas) que existen entre la zona de heterocromatización (XYb) y el resto de la cromatina laxa, mientras que en la figura 8 se aprecian las dos regiones de heterocromatización (XYb) y las continuidades que unen las dos regiones (flechas).

Cortes aislados:

Se obtuvieron también grandes aumentos de otros núcleos de células en etapas de leptoteno (Micrografías 5 y 6) (plancha 9) donde se observan con más claridad las continuidades entre la zona de heterocromatización (XYb) y la cromatina laxa (flechas) del núcleo. La zona de heterocromatización se encuentra en contacto con la envoltura nuclear (en) y el nucleolo (nl) se encuentra en cercanía a la zona de heterocromatización (Micrografía 6).

Serie 3:

Corresponde al material fijado para dispersiones y consta de 21 cortes seriados de un núcleo de espermatocito de rata en etapa de zigoteno. La técnica de fijación permite un extendido del material nuclear por lo que no se observa el borde de la zona de heterocromatización (XYb), las cromatinas se encuentran en contacto y no se observa diferencia, la característica que permite reconocer la zona de heterocromatización es la presencia de ejes cromosómicos dentro de la zona XYb. En el corte 1 (plancha 10) se aprecia un eje cromosómico (EC) en forma de arco rodeado por heterocromatina que apenas es diferente de la cromatina laxa, esta

zona de heterocromatización se encuentra en contacto con la envoltura nuclear (nl). En los cortes 2 y 3 (plancha 10) se observa como el eje cromosómico comienza a dirigirse por sus extremos hacia la envoltura nuclear, mientras que la zona de heterocromatización (XYb) aún es difícil de distinguir. En el corte 4 (plancha 10) un extremo del eje cromosómico se ancla a la envoltura nuclear (en) y el otro continúa cortado de forma transversal; en los cortes 5 y 6 (plancha 10) aún se aprecian estos dos restos de eje cromosómico, uno de estos restos permanece de la misma forma hasta el corte 13. En el corte 7 (plancha 10) un segundo extremo de otro eje cromosómico se ancla a la envoltura nuclear, en el corte 8 (plancha 10) se distingue el segundo eje cromosómico que se ancló a la envoltura nuclear en el corte anterior. De los cortes 9 al 13 (plancha 11) se aprecia estos dos restos de ejes casi sin cambios y la zona de heterocromatización sigue confusa, es en el corte 14 (plancha 11) cuando el primer eje cromosómico comienza a ascender y a girar y se empieza a distinguir con mayor facilidad la zona de heterocromatización, en los cortes 15 y 16 (plancha 11) ya se distingue la zona de heterocromatización y el primer eje cromosómico sigue girando, mientras que el segundo eje se observa de forma transversal en la misma posición que en los cortes anteriores, en los cortes 17 y 18 (plancha 12) el primer eje cromosómico ha girado por completo y se encuentra dirigiéndose hacia la envoltura nuclear y se ancla a esta en el corte 19; el otro eje cromosómico permanece igual, el cuerpo XY en estos cortes es distinguible. En los cortes 20 y 21 (plancha 12) la zona de heterocromatización del cuerpo XY se vuelve difusa y se observa restos de los ejes cromosómicos.

Plancha 1.

Serie 1: Micrografías de los cortes 1 a 24. Núcleo de espermatocito en etapa de leptoteno - zigoteno. Material de rata de 21 días de edad fijado en glutaraldehído al 2.5% e incluido en resina epóxica. Aumento 23 750. En toda la serie.

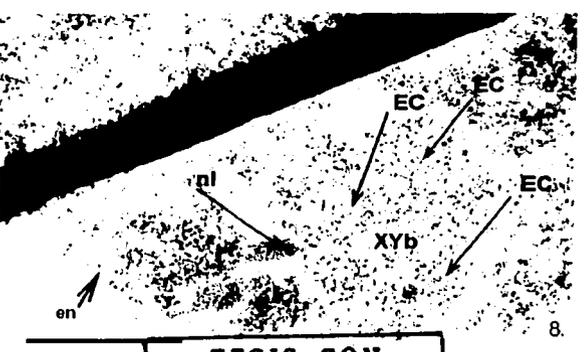
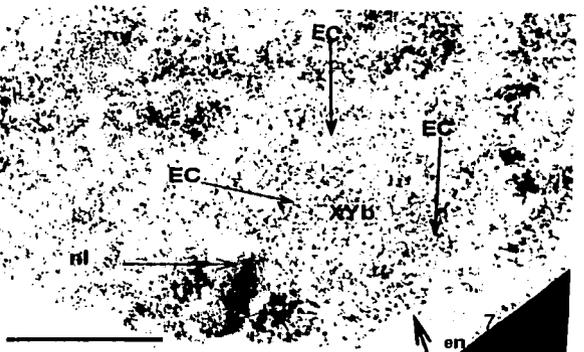
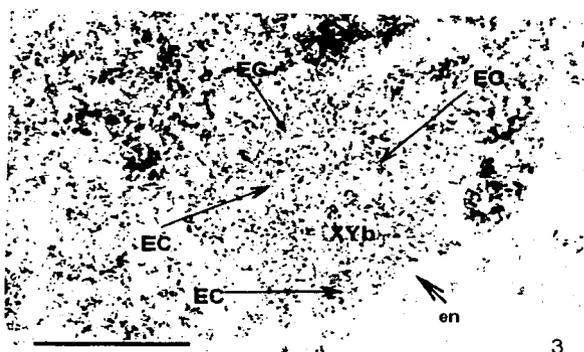
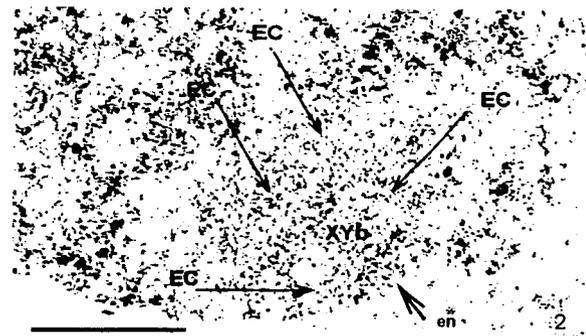
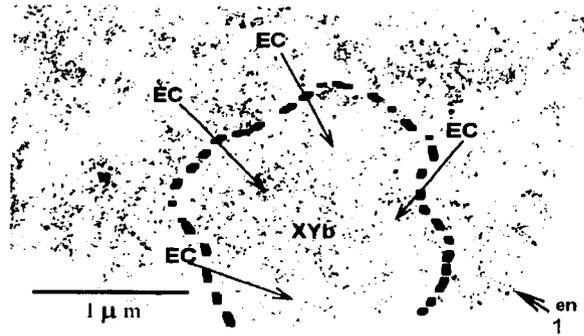
Corte 1: Se observa una zona de condensación de la cromatina (zona punteada XYb) diferente al resto de la cromatina laxa del núcleo y cerca de la envoltura nuclear (en), no se observa un límite entre estas dos cromatinas; dentro de esta zona de condensación se encuentran 4 ejes cromosómicos cortados transversalmente (EC)

Corte 2 y 3: La zona de condensación de (XYb) es más evidente, se encuentra en contacto con la envoltura nuclear (en), también se observan los 4 ejes cromosómicos (EC) cortados transversalmente.

Corte 4: Zona de heterocromatización (XYb) con un arreglo nucleosomal más denso que el resto de la cromatina del núcleo, se observan los 4 ejes cromosómicos (EC) dentro de la zona XYb. Uno de estos ejes cromosómicos se encuentra en contacto con la envoltura nuclear (en)

Corte 5: Aún se distingue el eje cromosómico (EC) anclado a la envoltura nuclear (en) y los tres ejes cromosómicos dentro de la zona de heterocromatización (XYb); aparece el primer indicio de nucleolo (nl) cerca de la zona de heterocromatización y de la envoltura nuclear.

Corte 6, 7 y 8: Ya solo se observan tres ejes cromosómicos (EC) dentro de la zona de heterocromatización (XYb), el nucleolo (nl) se hace más evidente y se encuentra cerca de la zona de heterocromatización y de la envoltura nuclear (en).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

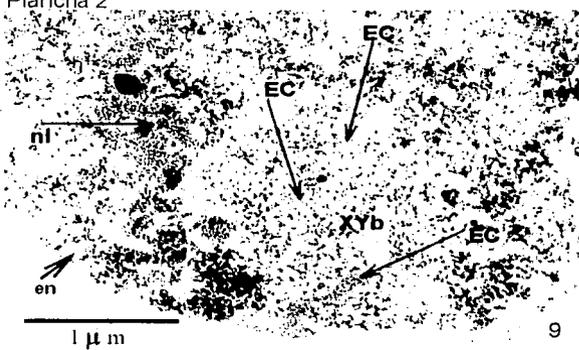
Plancha 2

Cortes 9 y 10: Uno de los tres ejes cromosómicos (EC), observables dentro de la zona de heterocromatización (XYb), se encuentra anclado a la envoltura nuclear (en) y es claramente distinguible de los otros, ya que en este corte (corte 9) se observa de forma longitudinal y los otros dos ejes están cortados transversalmente. El nucleolo (nl) se observa cerca de la zona de heterocromatización. En el corte 10 apenas si se distingue el eje cromosómico correspondiente al eje anclado en el corte 9, y los dos ejes cromosómicos dentro de la zona de heterocromatización.

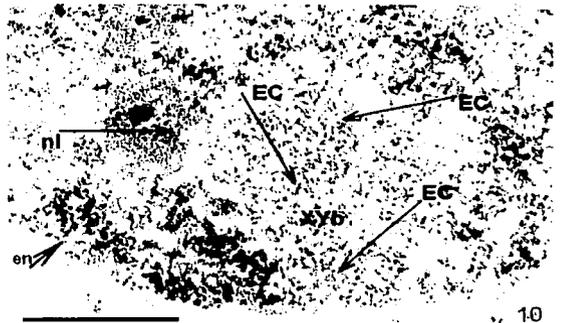
Cortes 11, 12 y 13 En estos cortes solo se observan dos ejes cromosómicos (EC) dentro de la zona de heterocromatización (XYb).

Cortes 14 y 15: En el corte 14 uno de los dos ejes cromosómicos (EC) se encuentra anclado a la envoltura nuclear (en) y se observa de forma longitudinal, la zona de heterocromatización ocupa menos área que en los cortes anteriores y aún se observa el nucleolo (nl) cerca de la zona de heterocromatización (XYb). En el corte 15 se aprecia una pequeña parte del eje cromosómico, correspondiente al eje anclado a la envoltura nuclear en el corte 14, y el otro eje cromosómico dentro de la zona de heterocromatización.

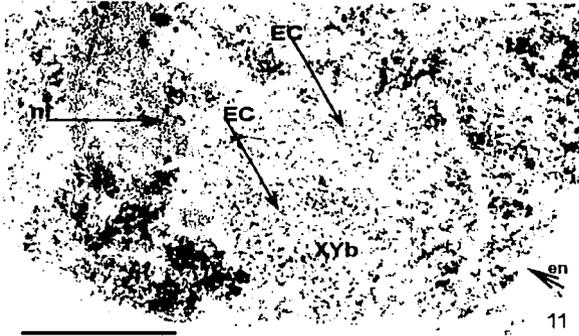
Corte 16: Solo se aprecia un eje cromosómico (EC) dentro de la zona de heterocromatización (XYb), además de que esta zona sigue disminuyendo de área, se observa el nucleolo cerca de la zona de heterocromatización.



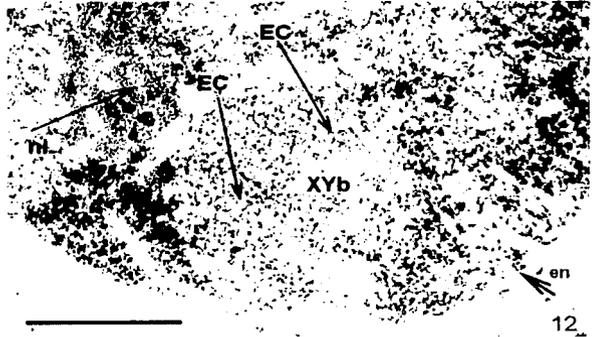
9



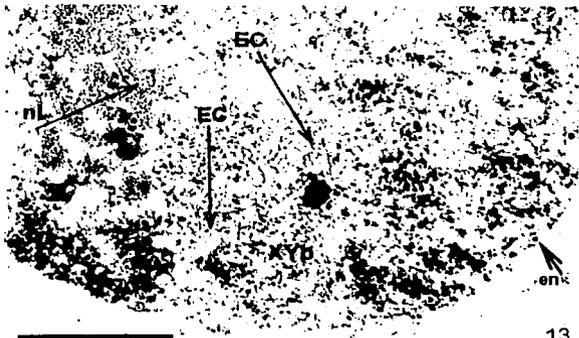
10



11



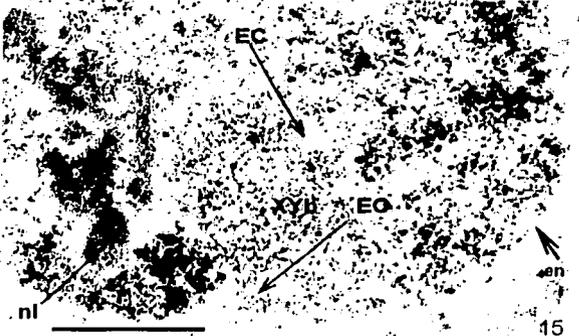
12



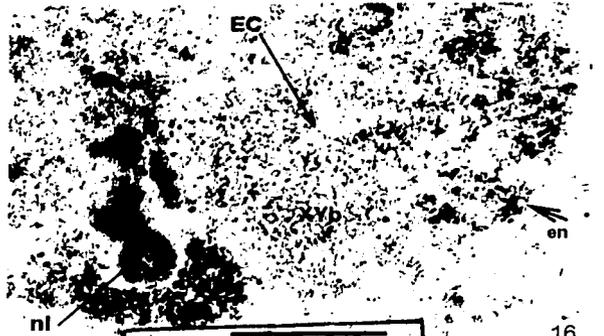
13



14



15



16

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

38

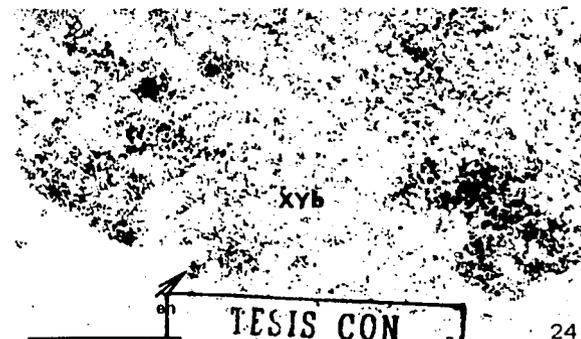
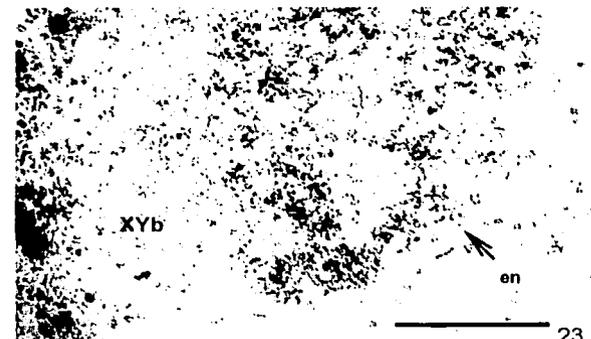
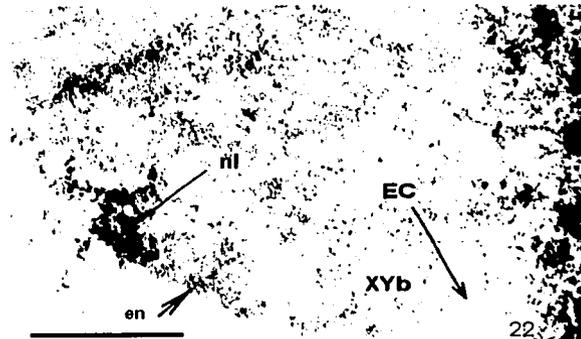
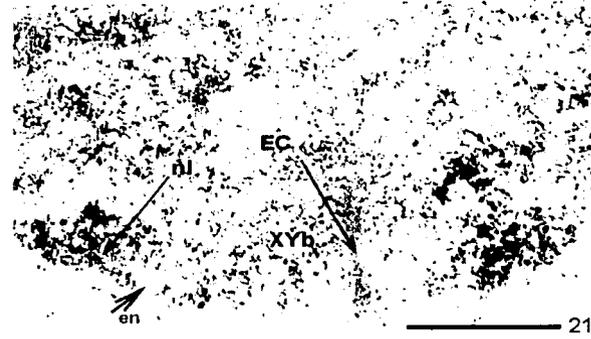
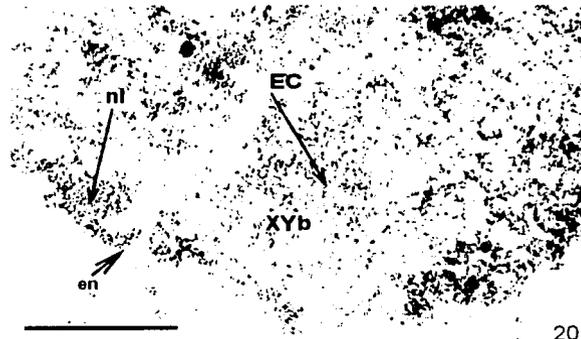
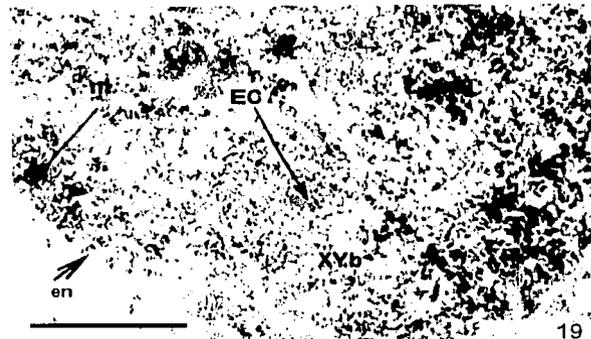
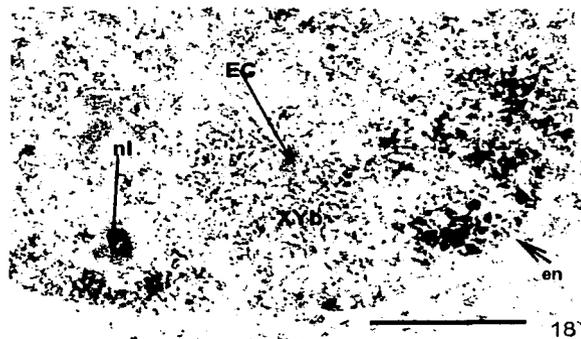
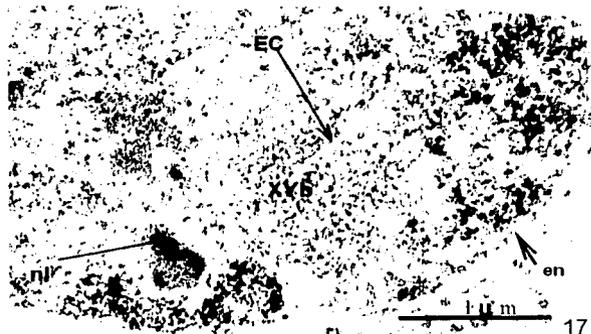
Plancha 3.

Corte 16, 17 y 18: En estos corte ya solo se observa un eje cromosómico (EC) dentro de la zona de heterocromatización (XYb), la zona de heterocromatización pierde área y es difícil establecer límites entre esta zona y el resto de la cromatina, el nucleolo (nl) comienza a desaparecer y en el corte 19 ya se observa poca parte del nucleolo.

Corte 20: el último eje cromosómico visible (EC) parece que empieza a descender hacia la envoltura nuclear (en), y el nucleolo (nl) ya se ve poco.

Cortes 21 y 22: En el corte 21 el eje cromosómico (EC) se ancla a la envoltura nuclear (en) y se observa longitudinalmente, la zona de heterocromatización ha disminuido y ya solo se encuentra rodeando al eje cromosómico. En el corte 22 solo se observa un resto de eje cromosómico y la zona de heterocromatización se observa poco, el nucleolo en estos cortes ya casi no se observa.

Cortes 23 y 24: Ya no existen ejes cromosómicos y la zona de heterocromatización es difusa y poco distinguible del resto de la cromatina, el nucleolo ya no se aprecia.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

17

18

19

20

21

22

23

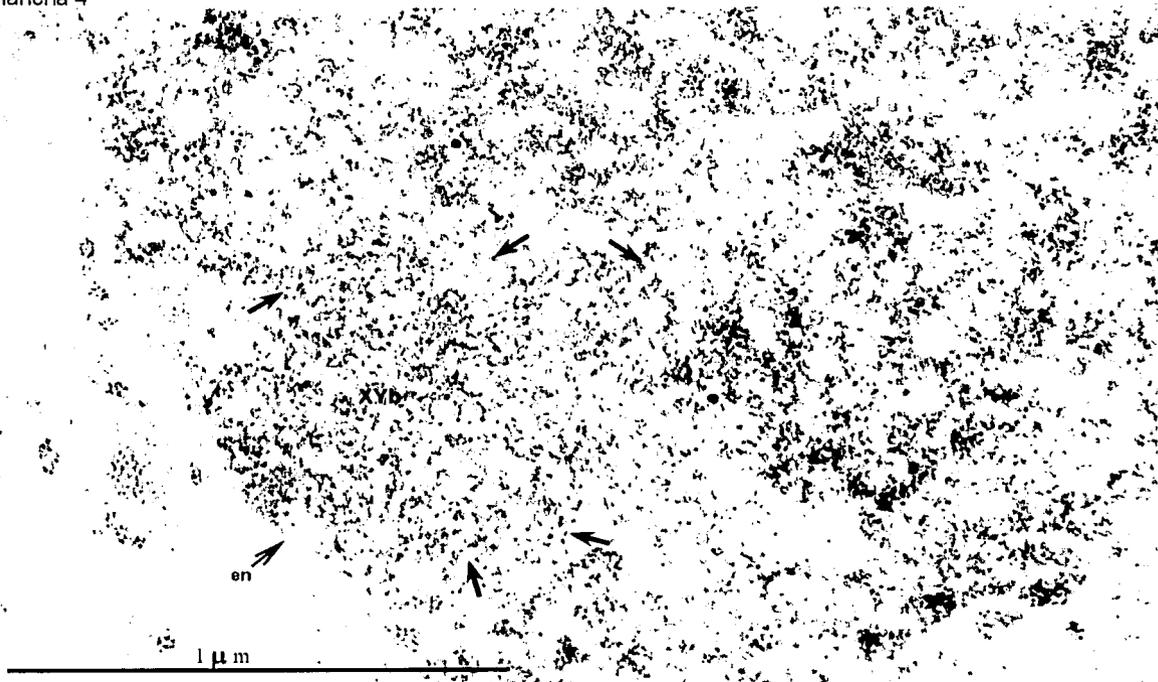
24

39

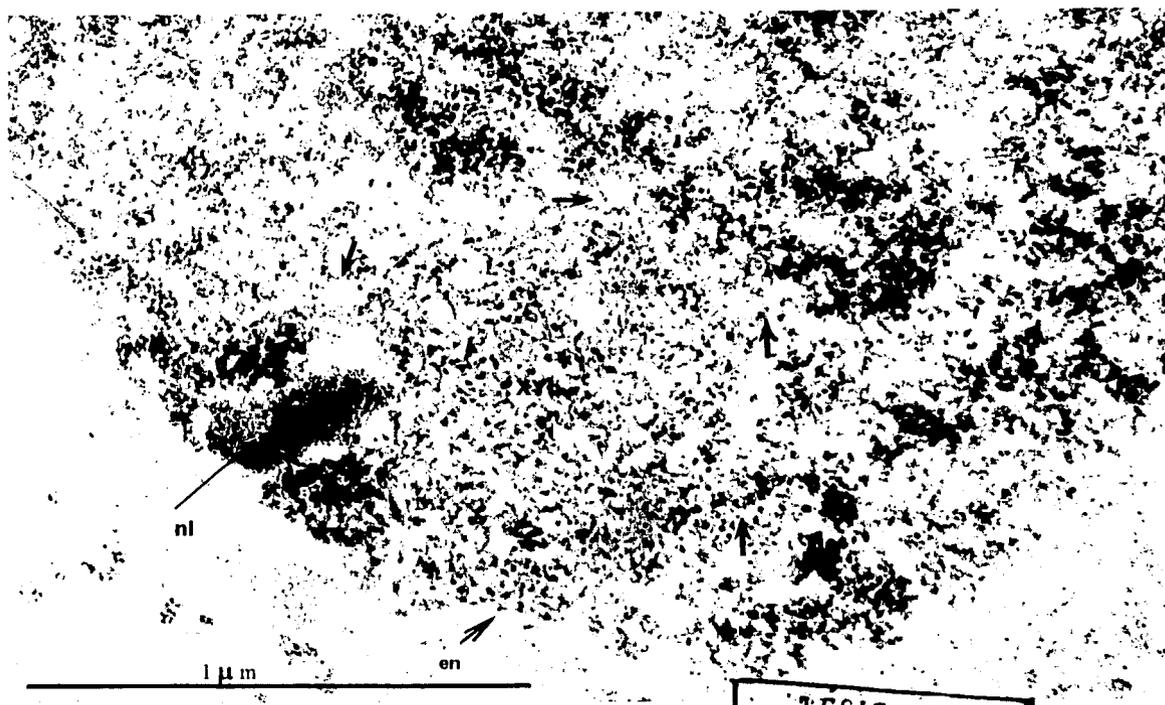
Plancha 4.

Micrografía 1: Aumento triplicado de la formación del cuerpo XY correspondiente al corte 4 de la serie 1 (Plancha 1). Las continuidades en forma de cuerda de collar (flechas) representan la transformación de la cromatina laxa en heterocromatina del cuerpo XY (XYb). Abreviaturas: Cuerpo XY (XYb); envoltura nuclear (en). Material fijado en glutaraldehído al 2.5% e incluido en resina epóxica. Aumento 77 500.

Micrografía 2: Aumento triplicado de la formación del cuerpo XY correspondiente al corte 7 de la serie 1 (Plancha 1). La transformación de la cromatina laxa en heterocromatina del cuerpo XY se observa en forma de continuidades (flechas). Abreviaturas: Cuerpo XY (XYb). Nucleolo (nl), envoltura nuclear (en). Material fijado en glutaraldehído al 2.5% e incluido en resina epóxica. Aumento 77 500.



Micrografía 1



Micrografía 2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Plancha 5.

Serie 2: Micrografías de los cortes 1 a 21. Núcleo de espermatocito de rata en etapa de zigoteno. Material de rata de 21 días de edad fijado en glutaraldehído al 2.5% e incluido en resina epóxica. Aumento 30 400. En toda la serie.

Corte 1: Se aprecia la zona de heterocromatización correspondiente al cuerpo XY (zona punteada XYb) en contacto con la envoltura nuclear (en), se observan los ejes cromosómicos (EC) dentro de la zona, no se observa un límite entre la zona de heterocromatización y la cromatina laxa y si se aprecian continuidades (flecha)

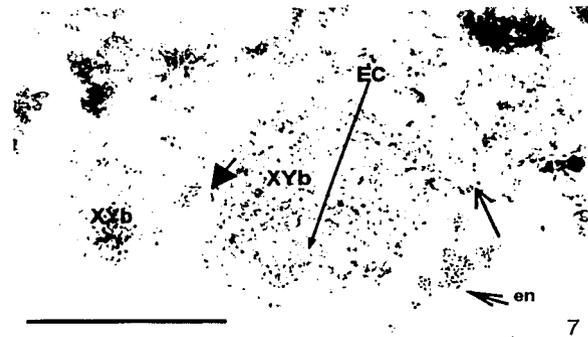
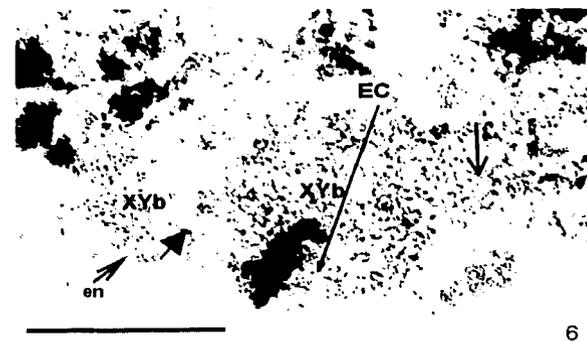
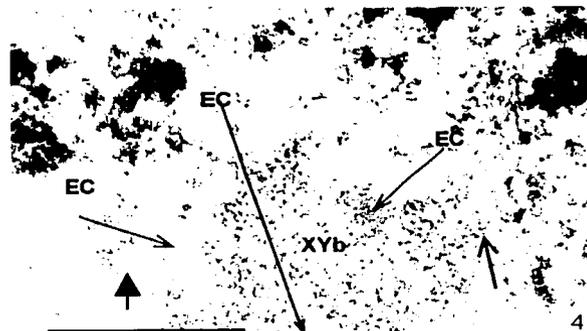
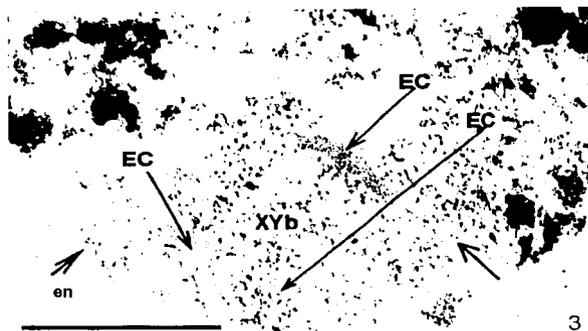
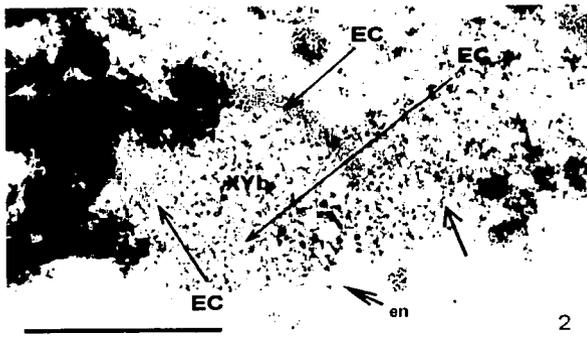
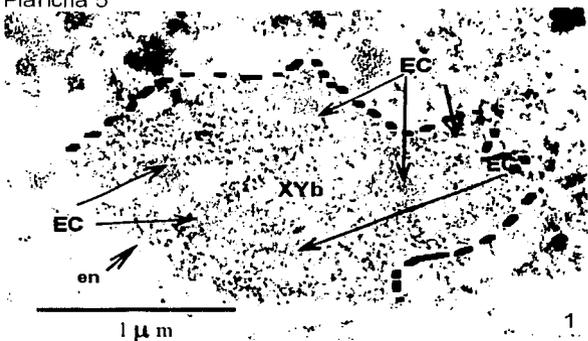
Cortes 2 y 3: Se siguen apreciando los ejes cromosómicos (EC) cortados de forma longitudinal y transversalmente, así como las continuidades (flecha) entre la zona de heterocromatización (XYb) y la cromatina laxa.

Corte 4: La zona de heterocromatización (XYb) se empieza a dividir en dos regiones unidas por continuidades (flecha triangular) y cerca de un eje cromosómico, las continuidades (flecha) con la cromatina laxa siguen apreciándose en la misma zona que en los cortes anteriores.

Corte 5: Se observan dos regiones de heterocromatina bien definidas (XYb) unidas por continuidades (flecha triangular), las continuidades con la cromatina laxa permanecen, y ya solo se observa un eje cromosómico (EC) dentro de la zona de heterocromatización cortado transversalmente.

Cortes 6, 7 y 8: Se aprecian las dos zonas de heterocromatización (XYb) unidas por una continuidad (flecha triangular), el único eje cromosómico (EC) se sigue observando y las continuidades con la cromatina laxa aún permanecen (flecha)

HB-A



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

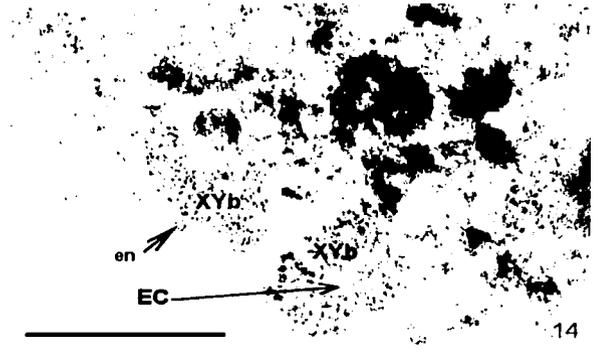
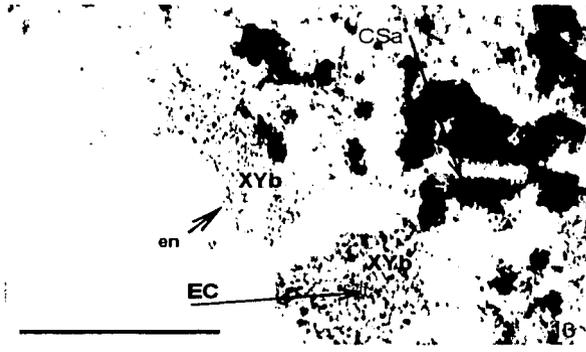
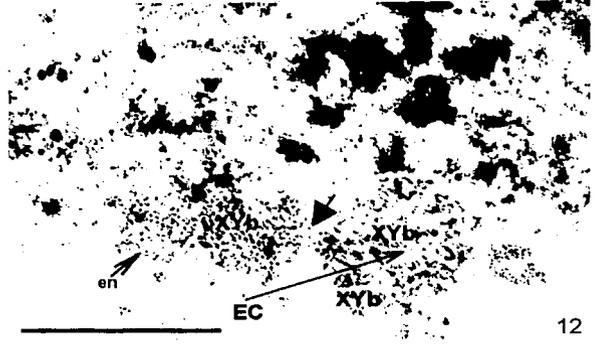
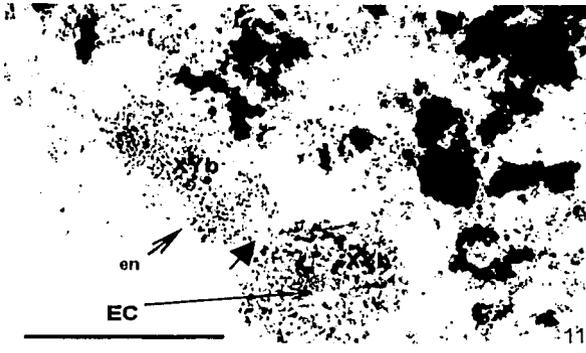
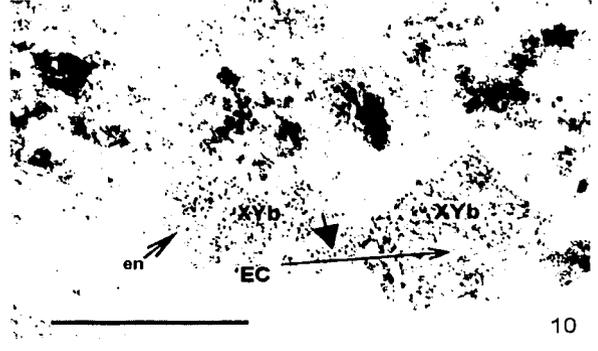
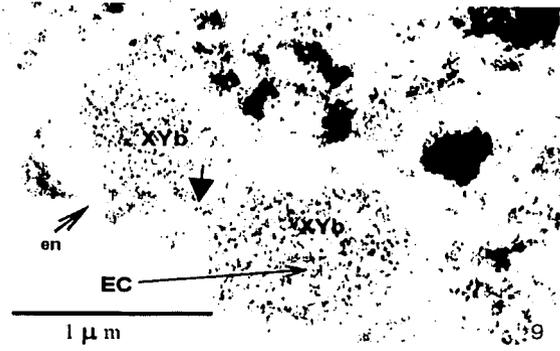
Plancha 6.

Cortes 9, 10, 11 y 12: Las dos regiones de heterocromatización (XYb) siguen unidas (flecha triangular) y las continuidades con la cromatina laxa ya no se aprecian. Eje cromosómico (EC).

Corte 13: Desaparece la continuidad que unía las dos zonas de heterocromatización (XYb) por lo que se aprecian separadas entre sí, el eje cromosómico (EC) permanece.

Corte 14 y 15: La pequeña región de heterocromatización (XYb) comienza a desaparecer, a la vez que la zona de heterocromatización (XYb) grande empieza a disminuir de área, pero el eje cromosómico (EC) se observa aún dentro de esta.

Corte 16: Solo se aprecia una zona de heterocromatización (XYb) con un eje cromosómico (EC) adentro.

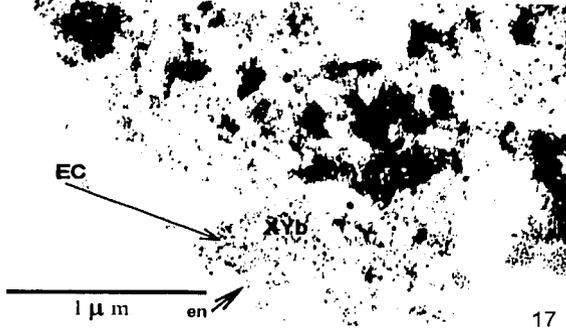


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

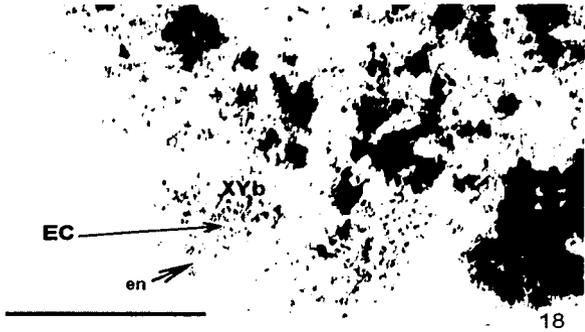
Plancha 7.

Corte 17, 18, 19 y 20: La zona de heterocromatización (XYb) ha disminuido de tamaño y parece estar rodeando al eje cromosómico (EC) que se aprecia en estos cortes.

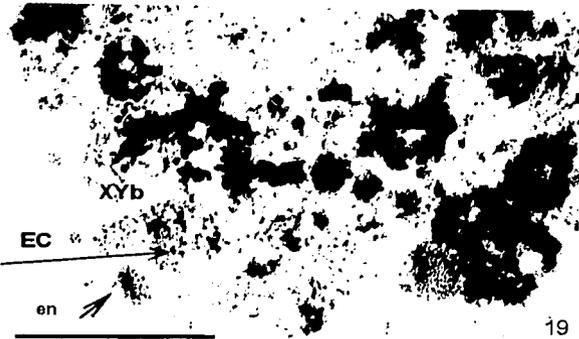
Corte 21: La heterocromatina que rodea al eje cromosómico (EC) ya no es distinguible.



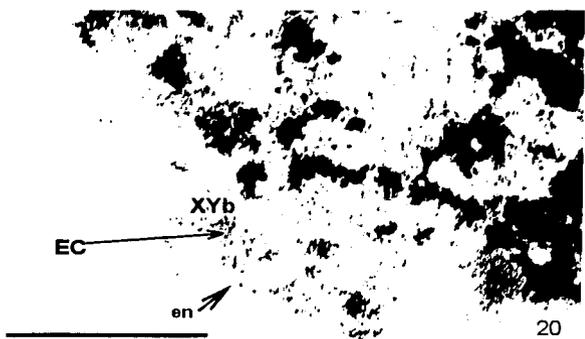
17



18



19



20



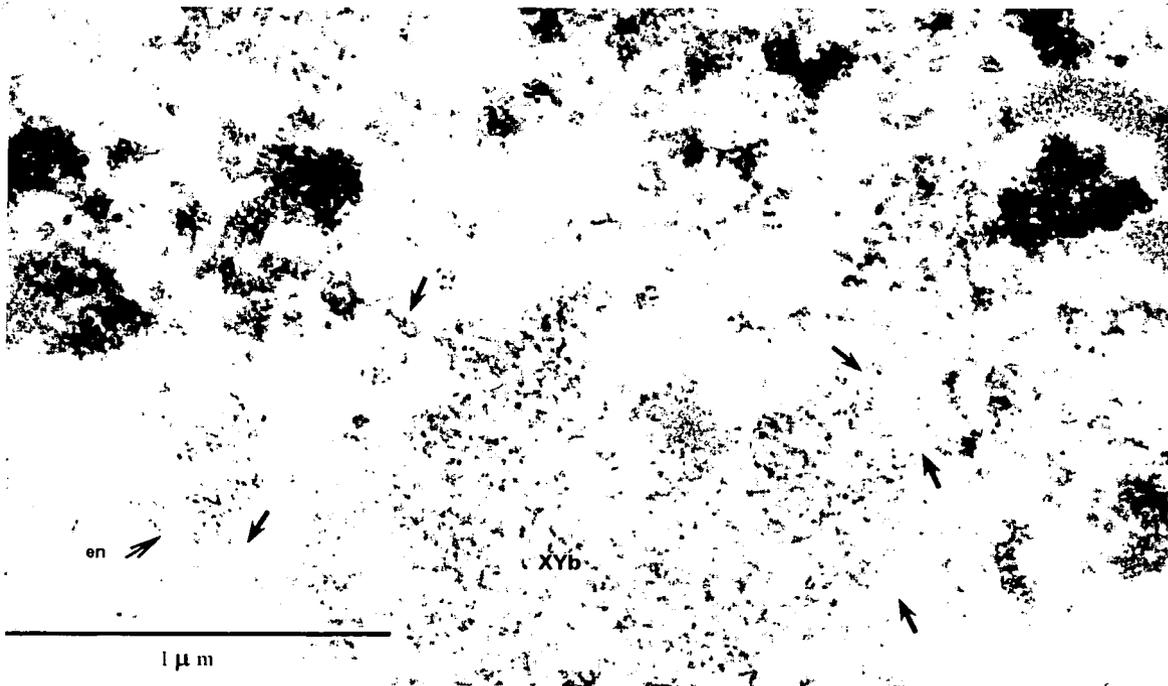
21

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

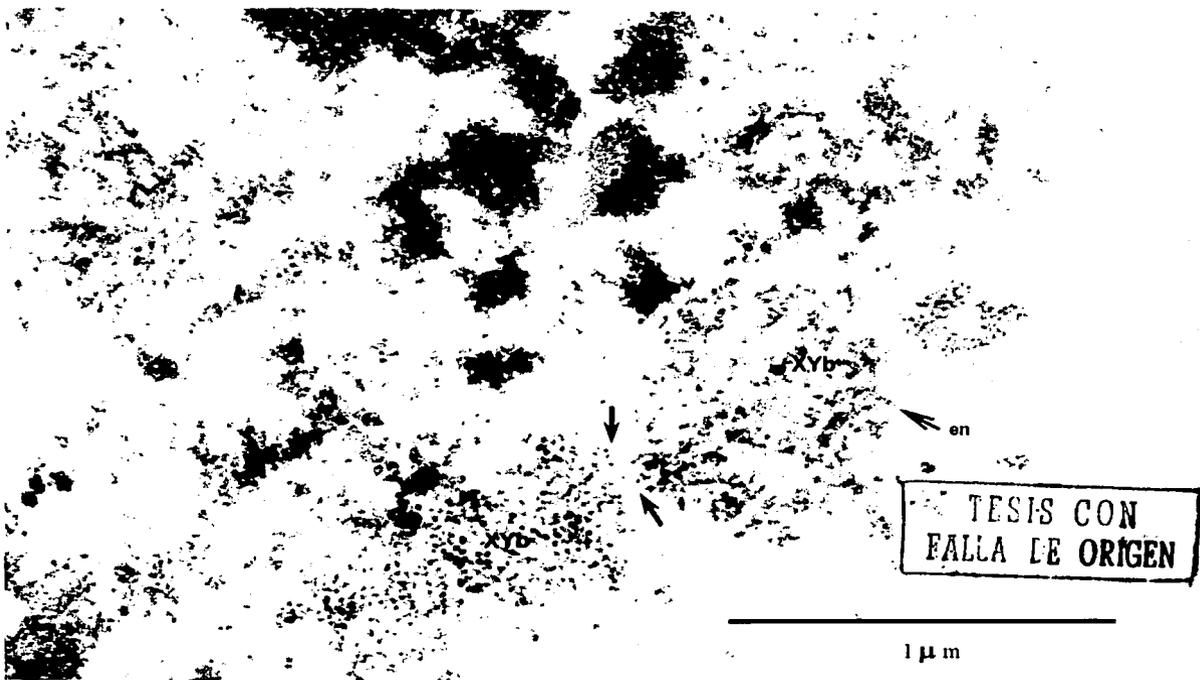
Plancha 8.

Micrografia 3: Aumento triplicado de la formación del cuerpo XY correspondiente al corte 4 de la serie 2 (Plancha 5). Se observan las continuidades en forma de cuerdas de collar (flechas) de la heterocromatina del cuerpo XY hacia la cromatina laxa del núcleo. Abreviaturas: Cuerpo XY (XYb), envoltura nuclear (en). Material fijado en glutaraldehído al 2.5% e incluido en resina epóxica. Aumento 59 200

Micrografia 4: Aumento triplicado de la formación del cuerpo XY correspondiente al corte 12 de la serie 2 (Plancha 6), con continuidad entre las dos regiones del cuerpo XY (flechas). Abreviaturas: Cuerpo XY (XYb), envoltura nuclear (en). Material fijado en glutaraldehído al 2.5% e incluido en resina epóxica. Aumento 59 200.



Micrografia 3

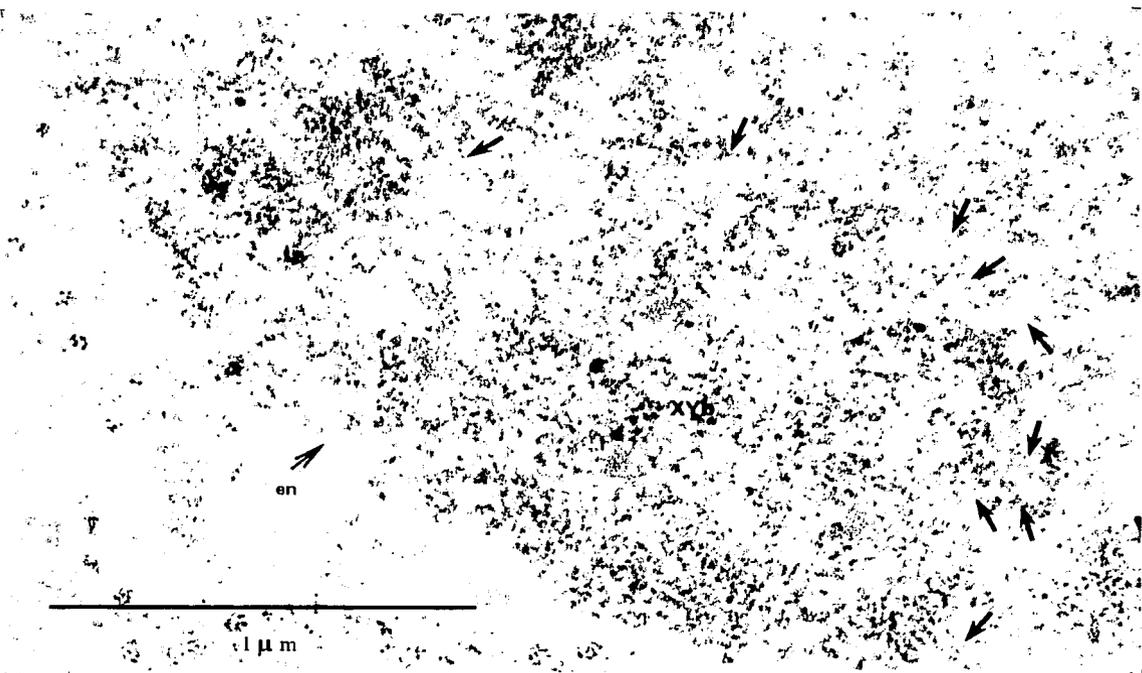


Micrografia 4

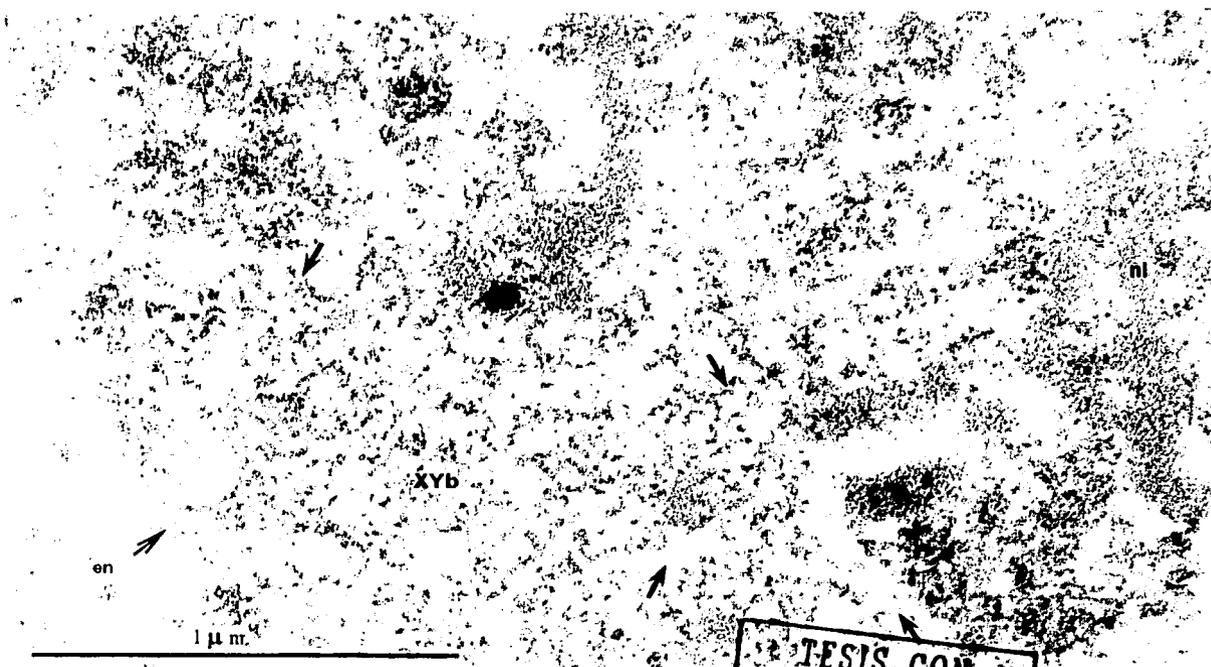
Plancha 9

Micrografía 5: Gran aumento de un núcleo de espermatocito primario en etapa de leptoteno - zigoteno. Se observan continuidades en forma de cuerda de collar entre la heterocromatina del cuerpo XY y la cromatina laxa, lo que representa la transformación de la cromatina. Abreviaturas: Cuerpo XY (XYb), envoltura nuclear (en). Material fijado en glutaraldehído al 2.5% e incluido en resina epóxica. Aumento 67 500.

Micrografía 6: Gran aumento de un núcleo de espermatocito en etapa de leptoteno - zigoteno. Se observan las continuidades (flechas) que representan la transformación de la cromatina laxa en heterocromatina del cuerpo XY. Abreviaturas: Cuerpo XY (XYb), Nucleolo (nl), envoltura nuclear (en). Material fijado en glutaraldehído al 2.5% e incluido en resina epóxica. Aumento 67 500.



Micrografía 5



Micrografía 6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Plancha 10.

Serie 3: Micrografías de los cortes 1 a 21. Núcleo de espermatocito de rata en etapa de zigoteno. Material de rata de 21 días de edad fijado para dispersiones en paraformaldehído al 1% e incluido en resina epóxica. Aumento 47 500 en toda la serie.

Corte 1: Se aprecia un eje cromosómico (EC) en forma de arco rodeado por heterocromatina que apenas es diferente del resto de la cromatina laxa, esta zona de heterocromatización (XYb) se encuentra en contacto con la envoltura nuclear (en).

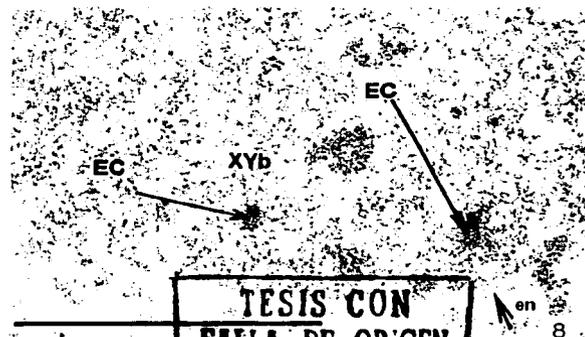
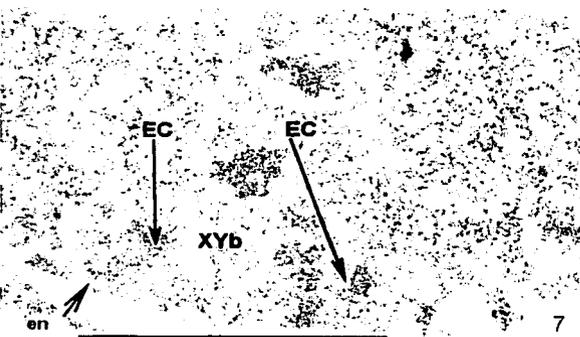
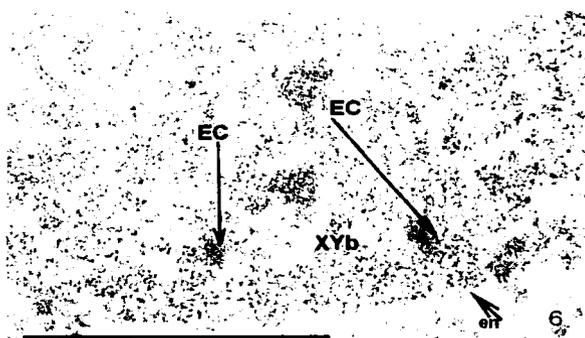
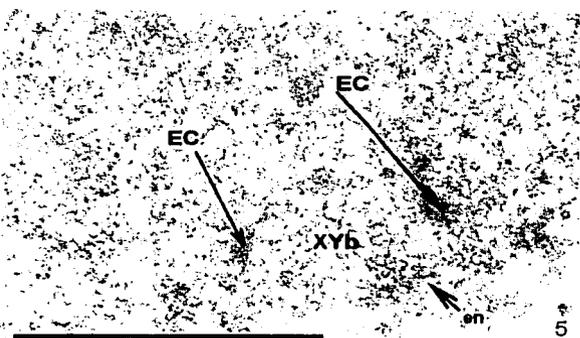
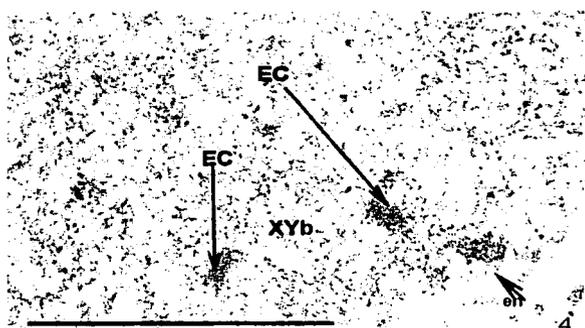
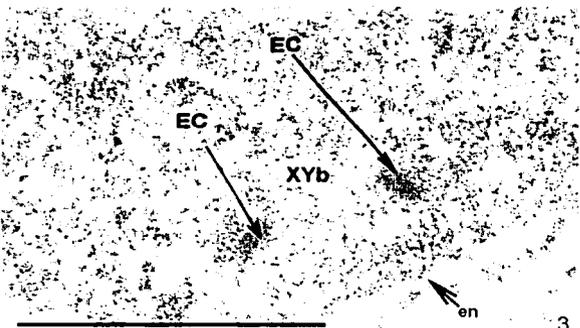
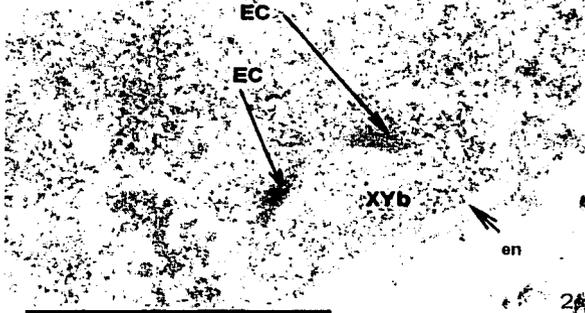
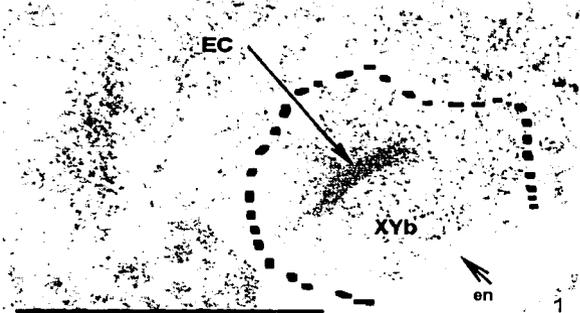
Cortes 2 y 3: Se observa como el eje cromosómico (EC) comienza a dirigirse por sus extremos hacia la envoltura nuclear (en), mientras que la zona de heterocromatización (XYb) aún es difícil de distinguir.

Corte 4: Un extremo del eje cromosómico (EC) se ancla a la envoltura nuclear (en) y el otro continúa cortado de forma transversal en la misma posición y dirección que en los cortes anteriores.

Cortes 5 y 6: Aún se aprecian estos dos restos de eje cromosómico (EC) dentro de la zona de heterocromatización (XYb).

Corte 7: Un segundo extremo de otro eje cromosómico (EC) se ancla a la envoltura nuclear (en), mientras que el otro resto de eje cromosómico continúa en la misma posición y dirección que en los cortes anteriores.

Corte 8: Comienza a aparecer el segundo eje cromosómico (EC) que se ancló a la envoltura nuclear (en) en el corte anterior y el resto del eje cromosómico primero sigue apareciendo en este corte dentro de la zona de heterocromatización.



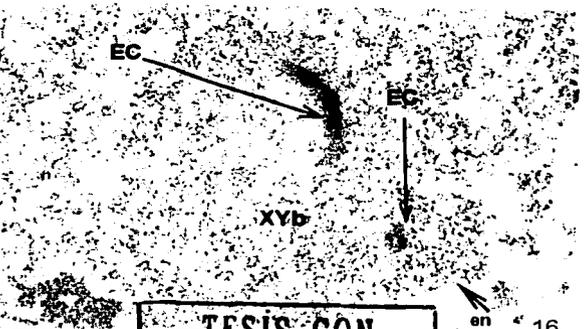
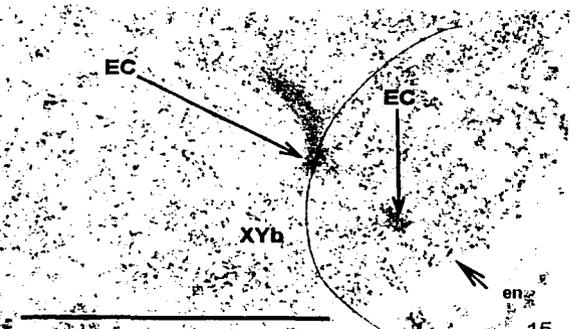
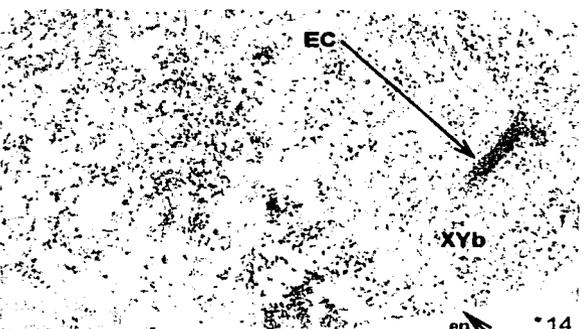
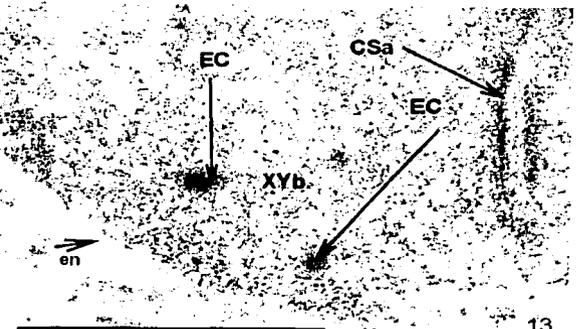
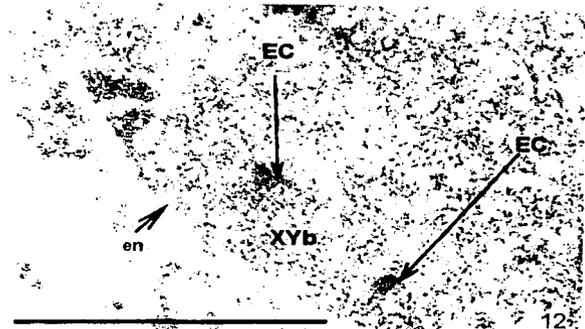
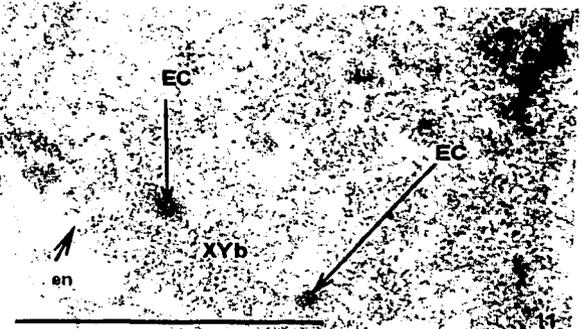
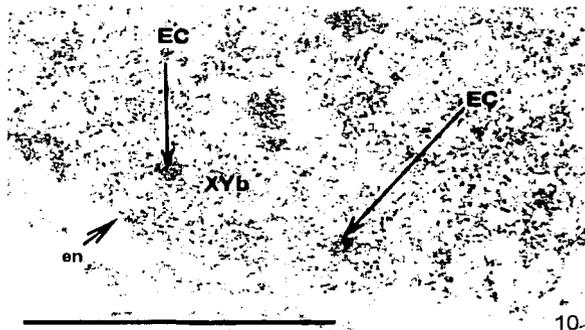
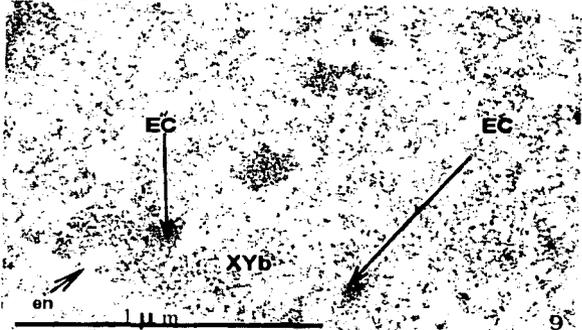
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Plancha 11

Cortes 9 a 13: Se aprecian los dos restos de ejes cromosómicos (EC) casi sin cambios y la zona de heterocromatización (XYb) sigue confusa.

Corte 14: El primer eje cromosómico (EC) comienza a ascender y a girar y se empieza a distinguir con mayor facilidad la zona de heterocromatización (XYb).

Cortes 15 y 16: Ya se distingue la zona de heterocromatización (XYb) y el primer eje cromosómico (EC) sigue girando, mientras que el segundo eje se observa de forma transversal, en la misma posición y dirección que en los cortes anteriores.



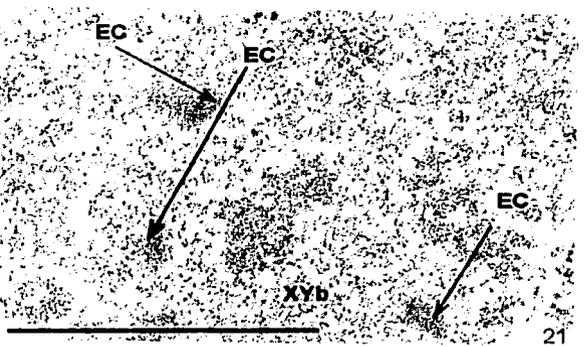
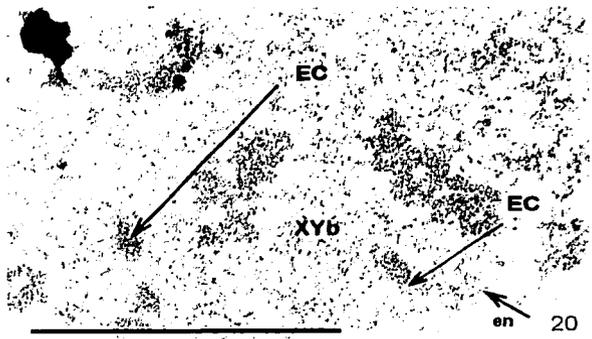
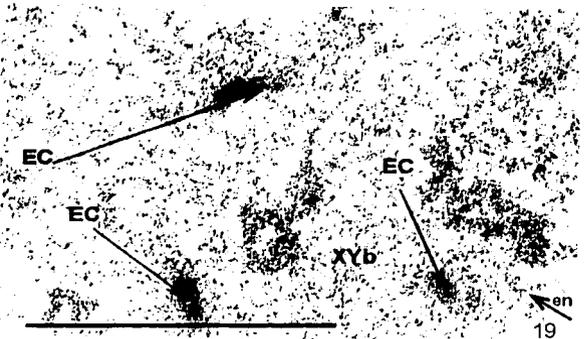
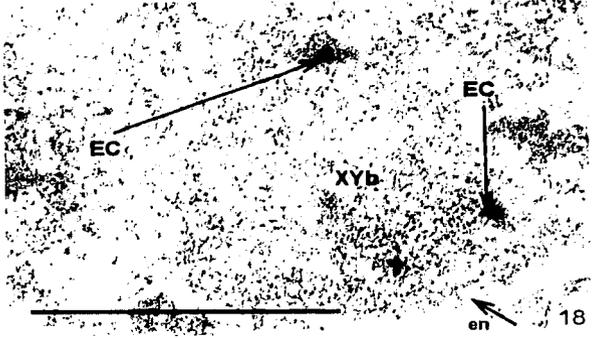
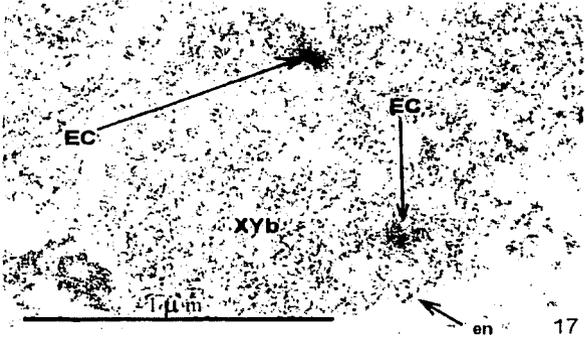
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Plancha 12.

Cortes 17 y 18: El primer eje cromosómico (EC) ha girado por completo y se dirige hacia la envoltura nuclear (en) y el segundo eje cromosómico se aprecia igual.

Corte 19: El primer eje cromosómico (EC) se ancla a la envoltura nuclear (en), mientras que el otro eje cromosómico permanece igual y la zona de heterocromatización (XYb) en este corte es distinguible.

Corte 20 y 21: La zona de heterocromatización (XYb) se vuelve difusa y se observa restos de ejes cromosómicos (EC) dentro de esta.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Discusión.

En el presente trabajo se observan testículos de rata de 20, 21 y 22 días de edad los cuales presentan espermatoцитos primarios en los estadios iniciales de la profase meiótica I (Leblond C. P. y Clermont Y. 1952), pero es en los testículos de 21 días de edad donde se observan espermatoцитos en etapa de leptoteno - zigoteno y se observa una zona inicial de heterocromatización en el núcleo así como "escaleras de doble cuerda" y cromosomas plumulados (Ortiz R. 2002). Mientras que los cortes de testículo de rata adulta presentan toda la onda espermatogénica con espermatoцитos primarios en etapas avanzadas de la profase meiótica I (paquiteno, diploteno y diacinesis), pero las etapas iniciales de esta profase son muy difíciles de localizar, por esta razón el material que se utiliza es el de testículo de rata de 21 días de edad fijado en glutaraldehído al 2.5% y en paraformaldehído al 1% más photo flo (detergente) al 0.4% obteniendo cortes seriados y aislados.

Los resultados de la serie 1 presentan un núcleo de espermatoцитo en etapa de leptoteno con presencia de cromatina laxa, escaleras de doble cuerda y cromosomas plumulados (Ortiz R. 2002), la cromatina compacta es escasa (Echeverría O.M. et al. 2003) y no se observa el cuerpo XY condensado (Solari A. 1974), sin embargo se observa una zona inicial de heterocromatización que corresponde a las etapas iniciales de la formación del cuerpo XY (XYb). Este cuerpo XY en formación se encuentra en contacto con la cromatina laxa por medio de continuidades (plancha, serie y grandes aumentos) lo que representa la transformación de la cromatina laxa en heterocromatina del cuerpo XY, algunas de éstas continuidades permanecen hasta la maduración del cuerpo XY en forma de cuerdas de collar (Echeverría O.M. et al. 2003) así como otras continuidades estarán transcribiendo fuera del cuerpo sexual (Echeverría O.M. et al. 2003).

En esta etapa de formación del cuerpo XY los ejes de los cromosomas sexuales se encuentran anclados por sus extremos finales a la envoltura nuclear al igual

que en cuerpo XY maduro (Woollam 1966 citado por Solari A. 1974). Sin embargo, en esta etapa de leptoteno, la disposición de los ejes cromosómicos sexuales no es la misma que en paquiteno, ya que en la primera el extremo de homología de los ejes se encuentra a una distancia de 240 nm, que es la distancia a la que se encuentran los ejes cromosómicos homólogos en leptoteno (Ortiz R. 2002), y los extremos no homólogos a una distancia de 960 nm orientados en sentidos opuestos, lo cual indica que la condensación de la cromatina de los cromosomas sexuales se da de forma individual, en etapa de paquiteno el extremo de homología se une para recombinar (Alberts B. Et al. 1996, Solari A. 1974) y formar el pequeño complejo sinaptonémico del cuerpo XY maduro (Solari A. 1974), así mismo los extremos no homólogos se orientan en el mismo sentido (Solari A. 1974).

La condensación individual de la cromatina de los cromosomas sexuales en etapa de leptoteno y su futura unión en paquiteno es apoyada por los resultados de las series 2 y 3. En la serie 2 se aprecia un núcleo en etapa de transición leptoteno – zigoteno, la heterocromatina del cuerpo XY es más evidente que en leptoteno, además se observa el cuerpo XY dividido en dos regiones comunicadas entre sí, estas regiones corresponden a la heterocromatina de cada uno de los cromosomas sexuales que se están condensando por separado y durante el paquiteno se unen para formar el cuerpo XY. En la serie 3 se aprecia a los dos ejes cromosómicos orientados en sentidos opuestos pero se han acercado uno al otro por medio de desplazamientos cromosómicos (Solari A. 1999) para formar el cuerpo XY maduro en paquiteno.

Durante la formación del cuerpo XY puede presentarse una relación con el nucleolo de la misma forma que cuando está maduro (Onho 1957 citado por Solari A. 1974), cuando existe la relación el cuerpo XY en formación está separado del nucleolo por un espacio estrecho y a veces se observan continuidades atravesando dicho espacio pero no en relación directa con el nucleolo, por lo que

la relación del cuerpo XY en formación y el nucleolo es una yuxtaposición al igual que ocurre cuando el cuerpo XY está maduro (Echeverría O.M. et al. 2003).

Conclusión.

El cuerpo XY se forma como consecuencia de la inactivación y condensación de la cromatina. Durante la etapa de leptoteno de la profase meiótica I se comienza a condensar la cromatina de los cromosomas sexuales de forma individual, la condensación de la cromatina laxa en heterocromatina se aprecia en forma de continuidades que parecen cuerdas de collar, los ejes cromosómicos se encuentran separados, orientados en sentidos opuestos, en forma de arco anclados a la envoltura nuclear por sus extremos y rodeados cada uno de su propia heterocromatina. Los ejes cromosómicos se unen a medida que avanza la profase meiótica I y en la etapa de paquiteno se aparean la zona de homología, los extremos no homólogos se orientan en el mismo sentido y la cromatina de ambos ejes cromosómicos se concentra en un área delimitada por la misma para formar el cuerpo XY.

Referencias.

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 1996. *Molecular Biology of the Cell*. Third edition. Gerten Science USA.
- Alsheimer M., Imamichi Y., Heid H., Benavente R. 1997. Molecular characterization and expression pattern of XY body-associated protein XY40 of the rat. *Chromosoma* 106: 308–314.
- Austin C.R. y Short R.V. 1982. *Células germinales y fertilización*. Ediciones científicas. La prensa médica mexicana, S.A. México, DF.
- Ayoub N., Richler C., Wahrman J. 1997. Xist RNA is associated with the transcriptionally inactive XY body in mammalian meiosis. *Chromosoma* 106: 1–10.
- Bauer U.M., Schneider – Hirsch S., Reinhardt S., Benavente R. 1998. The murine nuclear orphan receptor GCNF is expressed in the XY body of primary spermatocytes. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 208: 208–214.
- Calenda A., Allenet B., Escalier D., Bach J.F., Garchon H.J. 1994. The meiosis-specific Xmr gene product is homologous to the lymphocyte Xlr protein and is a component of the XY body. *EMBO. J.* 13: 100–109.
- Csankovszki G., Panning B., Bates B., Pehrson J.R., Jaenisch R. 1999. Conditional deletion of Xist disrupts histone macroH2A localization but not maintenance of X inactivation. *Nat. Genet.* 22: 323–324.
- Constanzi C. y Pehrson J.R. 1998. MacroH2A1 is concentrated in the inactive x chromosome of the female mammals. *Nature* 393: 599–601.
- Cooper G.M. 2000. *The Cell a molecular approach*. ASM Press. USA.
- Echeverría O.M., Benavente R., Ortiz R., Vázquez - Nin G.H. 2003. Ultrastructural and inmunocytochemical analysis of the XY body in rat and guinea pig. *Eur. J. Histochem.* 47: 45-54.
- Escalier D. y Garchon H.-J. 2000. XMR is associated with the asynapsed segments of sex chromosomes in the XY body of the mouse primary spermatocytes. *Chromosoma* 109: 256 – 265.

- Esponda P. y Jiménez-Martin C. 1973. The attachment of synaptonemal complex to the nuclear envelope. A structural and cytochemical analysis. *Chromosoma* 30: 405-417.
- Gilbert S.L., Pehrson J.R., Sharp P.A. 2000. Xist RNA associates with specific regions of the inactive x chromatin. *J. Biol. Chem.* 275: 36491–36494.
- Hickman C.P., Roberts L.S., Larson A. 1995. *Integrated principles of zoology* 10 Ed.
- Hoyer-Fender S., Singh P.B., Motzkus D. 2000 a. The murine heterochromatic protein M31 is associated with the chromocenter in round spermatids and is a component of mature spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 254: 72–79.
- Hoyer-Fender S., Costanzi C., Pehrson J.R. 2000 b. Histone macroH2A1.2 is concentrated in the XY body by the early pachytene stage of spermatogenesis. *Exp. Cell Res.* 258: 254–260.
- Jablonka E. y Lamb M.J. 1988. Meiotic pairing constraints and the activity of sex chromosomes. *J. Theor. Biol.* 133: 23-36.
- Jablonka E. y Lamb M.J. 1990. The evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 65: 249–276.
- Kralewski M., Novello A., Benavente R. 1997. A novel Mr 77,000 protein of the XY body of mammalian spermatocytes: its localization in normal animals and Searle's translocation carriers. *Chromosoma* 106: 160-167.
- Kralewski M. y Benavente R. 1997. XY body formation during rat spermatogenesis: an immunocytochemical study using antibodies against XY body-associated proteins. *Chromosoma* 106: 304–307.
- Leblond C.P. y 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.
- Marahrens Y., Panning B., Dausman J., Strauss W., Jaenisch R. 1997. Xist-deficient mice are defective in dosage compensation but not in spermatogenesis. *Genes Dev.* 11: 156 – 166.

- McKee B.D. y Handel, M.A. 1993. Sex chromosomes, recombination, and chromatin conformation. *Chromosoma* 102: 71–80.
- Moens P.B., Pearlman R.E., Traut W., Heng H.H.Q. 1998. Chromosome cores and chromatin at meiotic prophase. *Curr. Top. Dev. Biol.* 37: 241-262.
- Moses M.J. 1977. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). II. Morphology of the XY pair in spread preparations. *Chromosoma* 60: 127–137.
- Motzkus D., Singh P.B., Hoyer-Fender S. 1999. M31, a murine homolog of *Drosophila* HP1, is concentrated in the XY body during spermatogenesis. *Cytogenet. Cell Genet.* 86: 83–88.
- Ortiz R. 2002. Tesis de Doctorado. Participación del ARN y ADN en el apareamiento de los cromosomas homólogos durante la profase meiótica.
- Ortiz R., Echeverría O.M., Ubaldo E., Carlos A., Scassellati C., Vázquez – Nin G.H. 2002. Cytochemical study of the distribution of the RNA and DNA in the synaptonemal complex of guinea-pig and rat spermatocytes. *Eur. J. Histochem.* 46: 133–142.
- Párraga M. y del Mazo J. 2000. XYbp, a novel RING – finger, is a component of the XY body of spermatocytes and centrosomes. *Mechan. Develop.* 90: 95–101.
- Perche P.Y., Vourc'h C., Konecny L., Souchier C., Robert–Nicoud M., Dimitrov S., Khochbin S. 2000. Higher concentrations of histone macroH2A in the Barr body are correlated with higher nucleosome density. *Cuur. Biol.* 10: 1531–1534.
- Peters A.H., Plug A.W., de Boer P. 1997. Meiosis in carriers of heteromorphic bivalents: sex differences and implications for male fertility. *Chromosoma Res.* 5: 313–324.
- Plath K., Mlynarczyk–Evans S., Nusinow D.A., Panning B. 2002. Xist RNA and the mechanism of x chromosoma inactivation. *Annu. Rev. Genet.* 36: 233–278.
- Rasmussen T.P., Mastrangelo M.A., Eden A., Pehrson J.R., Jaenisch R. 2000. Dynamic relocalization of the histone macroH2A1 from centrosomes

- to inactive X chromosomes during X inactivation. *J. Cell Biol.* 150 1189–1198.
- Richler C., Dhara S.K., Wahrman J. 2000. Histone macroH2A1.2 is concentrated in the XY compartment of mammalian male meiotic nuclei. *Cytogenet Cell Genet.* 89: 118–120.
 - Schmekel K. y Daneholt B. 1995. The region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions. *Trends Cell Biol.* 5: 239-242.
 - Smith A. y Benavente R. 1992. Meiosis-specific protein selectively associated with sex chromosomes of rat pachytene spermatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 6938-6942.
 - Solari A.J. 1974. The behavior of the XY pair in mammals. *Intern. Rev. Cytol.* 38: 273–317.
 - Solari A.J. 1999. *Genética humana. Fundamento y aplicaciones en medicina.* 2ª Ed. Panamericana. Argentina.
 - Turner J.M.A., Mahadevaiah S.K., Benavente R., Offenberg H.H., Heyting C., Burgoyne P.S. 2000. Analysis of male meiotic “sex body” proteins during XY female meiosis provides new insights into their functions. *Chromosoma* 109: 426–432.
 - Turner J.M.A., Burgoyne P.S., Singh P.B. 2001. M31 and MacroH2A1.2 colocalise at the pseudoautosomal region during mouse meiosis. *Journal of Cell Science* 114: 3367–3375.
 - Turner J.M.A., Mahadevaiah S.K., Elliott D.J., Garchon H.-J., Pehrson J.R., Jaenisch R. Burgoyne P.S. 2002. Meiotic sex chromosome inactivation in male mice with targeted disruptions of Xist. *J. Cell Science* 115: 4097–4105.
 - Wolfe S.L. 1972. *Biology of the cell.* Belmont Cal. Wadsworth Publishing Company.
 - Vázquez-Nin G.H. y Echeverría O.M. 1976. Ultrastructural study on the meiotic prophase nucleus of rat oocytes. *Acta Anatómica* 96: 218–231.
 - Vázquez-Nin G.H., Ortiz A., López A., Echeverría O.M: 1989. Electron microscope study of ribonucleoprotein polyparticles and they relation to perichromatin granules. *Biol. Cell* 65: 133-138.

- Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M., Mínguez A., Moreno D. de la E., Fakan S., Martin T.E. 1992. Ribonucleoprotein components of root meristematic cell nuclei of the tomato characterized by application of mild loosening and immunocytochemistry. *Exp. Cell Res.* 200: 431-438.
- Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M., Fakan S., Leser G., Martin T.E. 1994. Immunocytochemical characterization of nuclear ribonucleoprotein polyparticles in cell of the central nervous system of the rat. *Eur. J. Cell Biol.* 65: 291-297.
- Vázquez-Nin G.H. y Echeverría O.M. 2000. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Fac. Ciencias. UNAM. México.

Agradecimientos.

Al Dr. Gerardo Hebert Vázquez-Nin, por su apoyo y dirección en este trabajo de tesis, así como a su excelente apoyo académico y científico que me brindó durante el tiempo que me inicié en el laboratorio.

A la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, quien me apoyó en todos los aspectos durante la realización de este trabajo y por sus valiosos consejos para la correcta elaboración del escrito.

A la Dra. Sandra Gómez Arroyo y a la Dra. Patricia Ostroski Shejet, por aceptar ser parte de mi jurado y por las correcciones pertinentes para la elaboración del escrito.

A la Dra. Rosario Ortiz Hernández, por su gran ayuda incondicional y por todo el tiempo que dedicó a enseñarme lo suficiente para realizar mi proyecto de investigación, desde el inicio de mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Guadalupe Trinidad Zavala, a la M. en C. Ernestina Ubaldo y a la Bióloga Silvia Juárez, por la disponibilidad ofrecida durante todo este tiempo y el apoyo académico y técnico ofrecido.

Al Sistema Nacional de Investigadores por el apoyo económico durante el tiempo en que se realizó el trabajo de investigación.

A mis compañeros del laboratorio: Rodrigo, Citlali y Roberto, por que con ellos compartí el tiempo y espacio a lo largo del desarrollo del trabajo.

A Carlos, Fernando, amigos y familiares por todo el apoyo recibido.

Dedicatoria.

Está tesis la dedico a la memoria de mi Madre Romana, Abuelo Pedro y a Dios por permitirme vivir.

A mi Papá por su enorme esfuerzo para verme titulado a mi familia que siempre confió en mí a pesar de todos los imprevistos: a Gloria que siempre me quiso y cuidó como su hijo; a mis hermanos: Carlo, Annel, Shantal y Ana por estar a mi lado; a mi abuelita Esperanza por todo lo que significa y a mi tío Martín.

Pero especialmente la dedico a mí querida esposa Liseth y a mis chaparros Esmeralda y Enrique por que son el estímulo y las fuerzas para seguir adelante pase lo que pase, con todo cariño para ustedes.

A mis suegros Enrique y Lucero por su apoyo y confianza.

Cogito Ergo Sun.