



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ESTUDIO ESTRUCTURAL Y CITOQUÍMICO DE LA
PROFASE MEIÓTICA I EN ESPERMATOCITOS DEL
ESCARABAJO *Tenebrio molitor*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

GUSTAVO CHRISTIAN VALDES QUEZADA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. GERARDO HEBERT VÁZQUEZ NIN

2006





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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del Alumno.

Valdes
Quezada
Gustavo Christian
54-21-12-65
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología

2. Datos del Tutor.

Doctor
Gerardo Hebert
Vázquez
Nin

Datos del Sinodal 1

Doctora
Sandra Luz
Gómez
Arroyo

Datos del Sinodal 2

Doctora
Maricela
Villagrán
Santa Cruz

Datos del Sinodal 3

Doctora
Olga Margarita
Echeverría
Martínez

Datos del Sinodal 4

Doctora
Patricia
Rivas
Manzano

Datos del trabajo escrito.

“Estudio estructural y citoquímico de la profase meiótica I en espermatoцитos del
escarabajo *Tenebrio molitor*”
74 páginas
2006

Este trabajo se llevó a cabo 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.

Y con el apoyo económico que brinda el Sistema Nacional de investigadores como ayudante de investigador SNI nivel III. De igual manera esta tesis estuvo soportada dentro de los proyectos PAPIME-UNAM (EN201804), PAPIIT-UNAM (IN211905) y CONACyT (36450-N).

Agradecimientos

- ◆ Al Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin, por su disposición para la dirección del presente trabajo, así como a su invaluable apoyo académico y científico en esta fase de mi formación.
- ◆ A la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez, por toda la experiencia que me ha transmitido para la realización de esta tesis y por la revisión de la misma.
- ◆ A la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, a la Dra. Patricia Rivas Manzano y a la Dra. Maricela Billagran por aceptar ser parte de mi jurado y por las correcciones del escrito.
- ◆ A la Dra. Guadalupe Trinidad Zavala, a la M. en C. Ernestina Ubaldo Pérez y a la Dra. Rosario Ortiz Hernández por todo el apoyo técnico y académico en el desarrollo de esta investigación pero sobre todo por sus acertados consejos que hicieron que este trabajo pudiera salir adelante.
- ◆ Al Dr. Luis Felipe Jiménez García y a la Dra. María de Lourdes Segura Váldez por las facilidades otorgadas para la captura de las micrografías ópticas.
- ◆ A la Dra. Silvia Santiago por el apoyo proporcionado para la adquisición de material bibliográfico.
- ◆ Al biólogo Abraham Hernández Hernández por todos los consejos y enseñanzas académicas que entusiastamente me brindó y sobre todo por su amistad.
- ◆ A la M. en C. Marta Salcedo por todos los consejos y apoyos que me brindó para el desarrollo de la Tesis.
- ◆ Al Sistema Nacional de Investigadores del CONACyT por el apoyo económico proporcionado durante la realización de la tesis, así como a los proyectos PAPIIME-UNAM (EN201804), PAPIIT-UNAM (IN211905) y CONACyT (36450-N).
- ◆ Al biólogo y amigo Jorge Antonio Valdivia Anistro por ser una fuente de motivación para salir siempre adelante.
- ◆ A mis amigos y amigas: Paulina C., Dulce A., Fabiola R., Fabiola V., Fabiola H., Angélica C., Iriliana L., Perla G., Mónica B., Jesús V., Jorge P., Javier P., Cesar N., Rodrigo V., Alan V., Miguel L., Tomas V., Aurelio H. y Yaser C., quienes me escucharon y apoyaron durante el desarrollo de este trabajo.

Quiero dedicar este trabajo a mis padres, Gustavo y María del Carmen. Gracias por todo el apoyo y la confianza que siempre han depositado en mi.

De igual manera a mis hermanos: Juan Luis, Jessie, Jazmin y Abraham, a mis sobrinos Emilio y Luis Esteban, y a mi cuñada Areli.

ESTUDIO ESTRUCTURAL Y CITOQUÍMICO DE LA PROFASE MEIÓTICA I EN ESPERMATOCITOS DEL ESCARABAJO *Tenebrio molitor*.

Índice.

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. La reproducción de los seres vivos	2
2.2. La espermatogénesis en los insectos	3
2.3. Generalidades de la meiosis	9
2.4. Etapas de la profase meiótica I	11
Preprofase	
Profase inicial – tardía	
Profase tardía	
2.5. Complejo Sinaptonémico	16
Ácidos nucleicos y proteínas del Complejo Sinaptonémico	
Los policomplejos	
2.6. Alineamiento homólogo y recombinación genética	20
Búsqueda de homología	
Recombinación genética	
3. Justificación	25
4. Objetivos	25
5. Material y Métodos	26

6. Resultados	30
6.1. Constitución de los folículos testiculares de <i>T. molitor</i>	30
6.2. Análisis ultraestructural de la profase meiótica en <i>T. molitor</i>	43
7. Discusión	59
8. Conclusiones	66
9. Referencias	68

1. Resumen

La meiosis es el mecanismo por el cual los organismos que se reproducen sexualmente, reducen su carga genética y generan variación. Durante la meiosis los cromosomas homólogos se aparean con el fin de promover la recombinación genética y la segregación. El mecanismo mediante el cual los cromosomas homólogos se reconocen es todavía desconocido y se han propuesto varios modelos. En todos éstos, se admite ampliamente que secuencias de ADN de los pares homólogos deben estar participando en el reconocimiento por homología. Sin embargo, sólo uno de los modelos propuestos ha explicado, en cobayo y en rata, la manera por la cual se lleva a cabo este reconocimiento a micrómetros de distancia, donde se involucran estructuras *micro-plumuladas* de cromatina que experimentan transcripción sin procesamiento (Vázquez Nin et al., 2003).

En el presente trabajo se investiga la participación de estructuras *micro-plumuladas* en el apareamiento y formación del complejo sinaptonémico entre cromosomas homólogos en un organismo distinto a los ya estudiados, en este caso un artrópodo. Para ello se analizaron espermatoцитos primarios en testículos de *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) con el microscopio óptico y electrónico de transmisión mediante técnicas citoquímicas y reconstrucciones tridimensionales.

Bajo el microscopio de campo claro se observa que los testículos se encuentran organizados en folículos y que dentro de cada uno de estos existen diversas poblaciones de quistes. La población de quistes con treinta y dos células de la línea germinal constituye la de espermatoцитos primarios. Dadas sus características nucleares y posición dentro del folículo testicular se reconocen tres sub-poblaciones de quistes de espermatoцитos primarios; todas las etapas de la profase meiótica I están contenidas en estas sub-poblaciones. La primera de éstas posee núcleos con la cromatina hacia la periferia nuclear; la segunda tiene cuerpos irregulares de cromatina que se distribuyen a través del nucleoplasma; y la tercera presenta cuerpos de cromatina de forma más regular adosados a la envoltura nuclear y que poseen una zona de exclusión alargada en el centro.

Cuando las sub-poblaciones de quistes de espermatoцитos primarios fueron analizadas con el microscopio electrónico de transmisión se observó que el nucleoplasma presenta numerosas estructuras filamentosas del tipo de las *micro-plumuladas* que están compuestas tanto por ADN como por ribonucleoproteínas (RNPs). Para la etapa de leptoteno se encontró que algunas de las estructuras *micro-plumuladas* están constituyendo alineamientos que asemejan *escaleras de doble cuerda* y se observó que éstas se extienden por longitudes mayores a la del radio nuclear. La conformación de 'bouquet' en la transición de la etapa del leptoteno al cigoteno no fue evidente. Para el cigoteno avanzado e inicio del paquiteno la formación del complejo sinaptonémico se observa en continuidad con estructuras *micro-plumuladas*, sin embargo, no se halló formación de complejo sinaptonémico a partir de ejes cromosómicos alineados. En el paquiteno los complejos sinaptonémicos despliegan una organización tripartita clásica. Cuando se aplicó la técnica de EDTA se nota que los tres elementos del complejo sinaptonémico poseen ribonucleoproteínas, en la región central se distingue una banda más de RNPs que corre longitudinalmente entre cada elemento lateral y el elemento central.

Estos resultados demuestran la existencia de estructuras *micro-plumuladas* en *T. molitor* que están involucradas en el apareamiento entre cromosomas homólogos y muy probablemente en el reconocimiento previo por homología. La abundancia de RNPs en los *micro-plumulados* y en las *escaleras de doble cuerda* resalta la noción de que la transcripción puede estar teniendo un papel importante en los procesos de búsqueda y apareamiento entre cromosomas homólogos.

2. Introducción

2.1 La Reproducción de los Seres Vivos

La mayoría de los animales y plantas se reproducen sexualmente, mientras que en los organismos que normalmente se multiplican asexualmente, tal como los procariontes y algunos grupos de hongos, el proceso sexual es raro o está completamente ausente (Hoekstra, 2005). Por tanto, la reproducción sexual es el mecanismo habitual de mantenimiento de la especie. Esto implica la producción de gametos masculinos (espermatozoides) y femeninos (óvulos) con dotación cromosómica haploide (con una carga sencilla de cromosomas) que al unirse en la fecundación, constituyen la primera célula del nuevo individuo. En cambio, los organismos que se reproducen asexualmente generan su descendencia mediante una división mitótica, la cual es simple y directa y la progenie es genéticamente idéntica al organismo progenitor (Paniagua, 1983).

El hecho de que la reproducción sexual se encuentre tan ampliamente distribuida podría deberse a que ésta tenga una función esencial en la biología de los organismos. La reproducción sexual involucra la mezcla de material genético de ambos progenitores para producir la progenie que transmita las nuevas combinaciones de los genes tanto paternos como maternos a su descendencia, esto se traduce en una transmisión más pronta de variación genética, la cual tiene importancia evolutiva (Alberts *et al.*, 2002; Solari, 2002).

Este proceso sexual puede ser subdividido en dos categorías: *simétrica* y *asimétrica*. En la reproducción sexual asimétrica, un fragmento del genoma de los organismos es transferido de un individuo dador a uno receptor. En la reproducción sexual simétrica, dos genomas se fusionan (singamia) y subsecuentemente se separan por el proceso especial de división llamado **meiosis** y cada vez las células producidas contienen diferentes combinaciones de genes como resultado de la segregación cromosómica y eventos de recombinación genética. Por tanto la reproducción sexual simétrica resulta en una alternancia de fases haploides y diploides, en un ciclo de vida que es un fenómeno exclusivo de los eucariontes (Solari, 1999). Existen excepciones en la manera en que se reproducen los organismos, como la *partenogénesis* de algunos

insectos, que implica el desarrollo de un nuevo individuo únicamente a partir del óvulo, sin intervención del espermatozoide (Nation, 2002).

La meiosis es el proceso de división celular de los organismos con reproducción sexual para la generación de sus gametos. Dicho proceso tiene lugar en las células que constituyen la *línea germinal*, su diferenciación se da cuando las células germinales primordiales (CGPs) inician el proceso de meiosis. Este hecho marca el inicio del ciclo de vida de las células de la línea germinal en todas las especies (Zhao y Garbers, 2002), y tanto en vertebrados como en invertebrados este proceso se lleva a cabo durante el desarrollo embrionario de los organismos, en un lugar distinto al de la diferenciación hacia la línea germinal. Por tanto existe una migración de las CGPs hacia el lugar de diferenciación a línea germinal (la gónada). Una vez allí se dividen mitóticamente para generar precursores potenciales de gametos, y mediante mecanismos de comunicación celular y transducción de señales, encienden la maquinaria de división meiótica (McLaren, 1999).

2.2 La espermatogénesis en los insectos

Los insectos presentan gran diversidad de modos de reproducción. La mayoría se reproducen en el estado adulto poniendo huevos, pero sólo algunos pocos producen gametos y se reproducen durante estados inmaduros, un proceso conocido como paedogénesis. Aunque la reproducción sexual por la unión de los gametos masculino y el femenino es la típica, algunos lo hacen en ocasiones o todas las veces por la puesta de huevos no fertilizados, o partenogénesis (Borror, 1982).

Los órganos reproductores masculinos típicamente consisten de un par de testículos conectados con vesículas seminales pareadas y un conducto eyaculador medio. En la mayoría de los insectos existe también un número de glándulas accesorias las cuales se vacían hacia el vaso deferente o conducto eyaculador (Gullan, 1994). Los testículos se pueden encontrar cerca o por debajo del tubo digestivo en el abdomen. Usualmente cada uno de ellos consiste de una serie de tubos o folículos testiculares que pueden variar en número desde uno en Adepfaga (Coleoptera) hasta 100 en los chapulines (Acrididae). Algunas veces, como en Lepidoptera, los folículos están parcialmente

separados uno del otro, y en los Diptera éstos consisten de sacos simples sin división (Chapman, 1998).

La pared de cada folículo consta de un epitelio delgado, que algunas veces es de dos capas celulares sobre una membrana basal. Los folículos están rodeados por una envoltura peritoneal y si los testículos se encuentran muy cercanos uno del otro, esta envoltura puede juntarlos (Valdez, 2001). En algunos Lepidoptera los dos testículos se fusionan completamente para formar una estructura media sencilla (Chapman, 1998).

Los folículos testiculares contienen a las células germinales las cuales experimentarán divisiones meióticas para la producción de los espermatozoides, el proceso entero es conocido como espermatogénesis, este proceso usualmente ocurre durante el último estadio larvario o en estado de pupa y en algunas especies se continúa hasta el estado adulto. En el extremo distal de cada folículo se encuentra el *germarium*, en el cual las células germinales entran en divisiones para producir las espermatogonias. En Orthoptera, Blattodea, Homoptera y Lepidoptera, las espermatogonias probablemente obtienen sus nutrientes de unas grandes células apicales con las cuales tienen conexiones citoplasmáticas, mientras que en Heteroptera un *syncytium* lleva a cabo estas funciones. Las conexiones con este tejido apical parecen perderse y las espermatogonias se agrupan con otras células las cuales se asocian para formar un quiste en torno a las gonias (Nation, 2002).

Las primeras etapas de la espermatogénesis en insectos ocurren en el *centro de proliferación germinal* en el extremo apical de cada folículo. En los centros de proliferación germinal, se encuentran tres tipos celulares: un 'botón' de *células apicales*, enseguida de este se encuentran las CGPs, las cuales mantienen estrecho contacto con las células del botón. Cada célula de la línea germinal es envuelta por un par de *células progenitoras del quiste* que representan el tercer tipo celular nombradas como intersticiales (Fuller, 1993). Los quistes así formados constituyen la entidad estructural donde se llevarán a cabo los eventos de espermatogénesis y ovogénesis en las gónadas de insectos machos y hembras, respectivamente.

El momento en el que se presenta la señal para la formación de los quistes difiere entre los sexos: en machos, la constitución de éstos se inicia en los estadios larvarios, mientras que la formación de los quistes femeninos no comienza sino hasta al menos dos días después que el desarrollo de la pupa ha comenzado (De Cuevas y Spradling, 1997).

Casi todos los quistes presentes en los machos y hembras de insectos tienen propiedades características. Primero, el número de células por quiste usualmente es de dos elevado a alguna potencia (2^n), donde n puede adquirir el valor de 1 (dos células) en Trichoptera y hasta 8 (256 células) en Estresiptera. Esta regla de 2^n , en las especies estudiadas, se debe a que los ciclos mitóticos y meióticos de las células de los quistes se encuentran sincronizados. Los quistes, tanto de machos como de las hembras en la misma especie, a menudo difieren en tamaño; por ejemplo, en muchos lepidópteros las hembras forman quistes de 8 células mientras que los quistes de los machos contienen 64 células antes de la meiosis. En machos de *Drosophila melanogaster*, los quistes de 16 células que han experimentado la fase S pre-meiótica, constituyen los de espermatocitos primarios. Además, otra característica a los quistes de los insectos, es la existencia de un organelo inter-conector de las células del quiste, denominado *fusoma*, que es el resultado de la división incompleta de cada célula (De Cuevas y Spradling, 1997).

Como más de un quiste se produce en el ápice del folículo, éstos se desplazan en sentido céfalo-caudal conforme avanzan en su desarrollo, así el folículo testicular se presenta con una zona de etapas muy tempranas cercana al *germarium* y las etapas más avanzadas en la parte proximal del folículo adyacente al vaso deferente. Por tanto, a partir del *germarium*, tres zonas de desarrollo se reconocen comúnmente (Fig. 1): *de crecimiento (I)*, en la cual las primeras espermatogonias se integran en quistes, se dividen e incrementan en tamaño para constituir espermatocitos; *de maduración y reducción (II)*, donde cada espermatocito experimenta las dos divisiones meióticas para producir las espermátidas; una *de transformación (III)*, en la cual las espermátidas se desarrollan en espermatozoides, un proceso conocido como espermiogénesis (Chapman, 1998; Valdez, 2001; Nation, 2002).

Los espermatozoides maduros de la mayoría de los insectos son filamentosos, a menudo de unos 300 μm de largo y menos de un micrómetro de diámetro tanto en la región de la cabeza como en la cola. El espermatozoide tiene una típica membrana celular de unos 10nm de espesor, cubierta en la parte externa por una capa de glucoproteínas conocida como glucocaliz. La mayor parte de la cabeza se encuentra ocupada por el núcleo. El DNA aparentemente está arreglado en hebras paralelas al eje mayor del espermatozoide. En la porción anterior al núcleo se presenta el acrosoma. (Chapman, 1998; Nation, 2002).

Las polillas y mariposas (Lepidoptera) producen dos tipos distintos de espermatozoides, *apirene* y *eupirene*. Desde que éstos se descubrieron, la dicotomía en la espermatogénesis se ha reportado en todos los Lepidoptera estudiados con la excepción de los más primitivos, Micropterigidae. El espermatozoide eupirene contiene un núcleo haploide y participa directamente en la fertilización. En contraste, el espermatozoide apirene es anucleado y no participa directamente en la fertilización. Sin embargo, el espermatozoide apirene se ha encontrado en un 50—90% del total de espermatozoide hallado en el tracto reproductor de la hembra después de la copulación.

La función del espermatozoide apirene es desconocida, pero se han propuesto varias hipótesis, incluyendo una posible función en la competencia entre espermatozoides o en el transporte de espermias eupirenes (Chapman, 1998; Nation, 2002).

Estudios inmunocitoquímicos realizados en espermatoцитos apirenes y eupirenes revelaron que en los primeros, no existe una etapa de bouquet, ni fusión de regiones organizadoras nucleolares, mientras que en los segundos sí, además muy tempranamente la cromatina se condensa de manera muy extrema en los espermatoцитos apirenes comparados con los eupirenes. Esto ha llevado a proponer que los eventos que inducen la pérdida del núcleo en los espermatozoides apirenes suceden en la profase meiótica I (Reinholdt *et al.*, 2002).

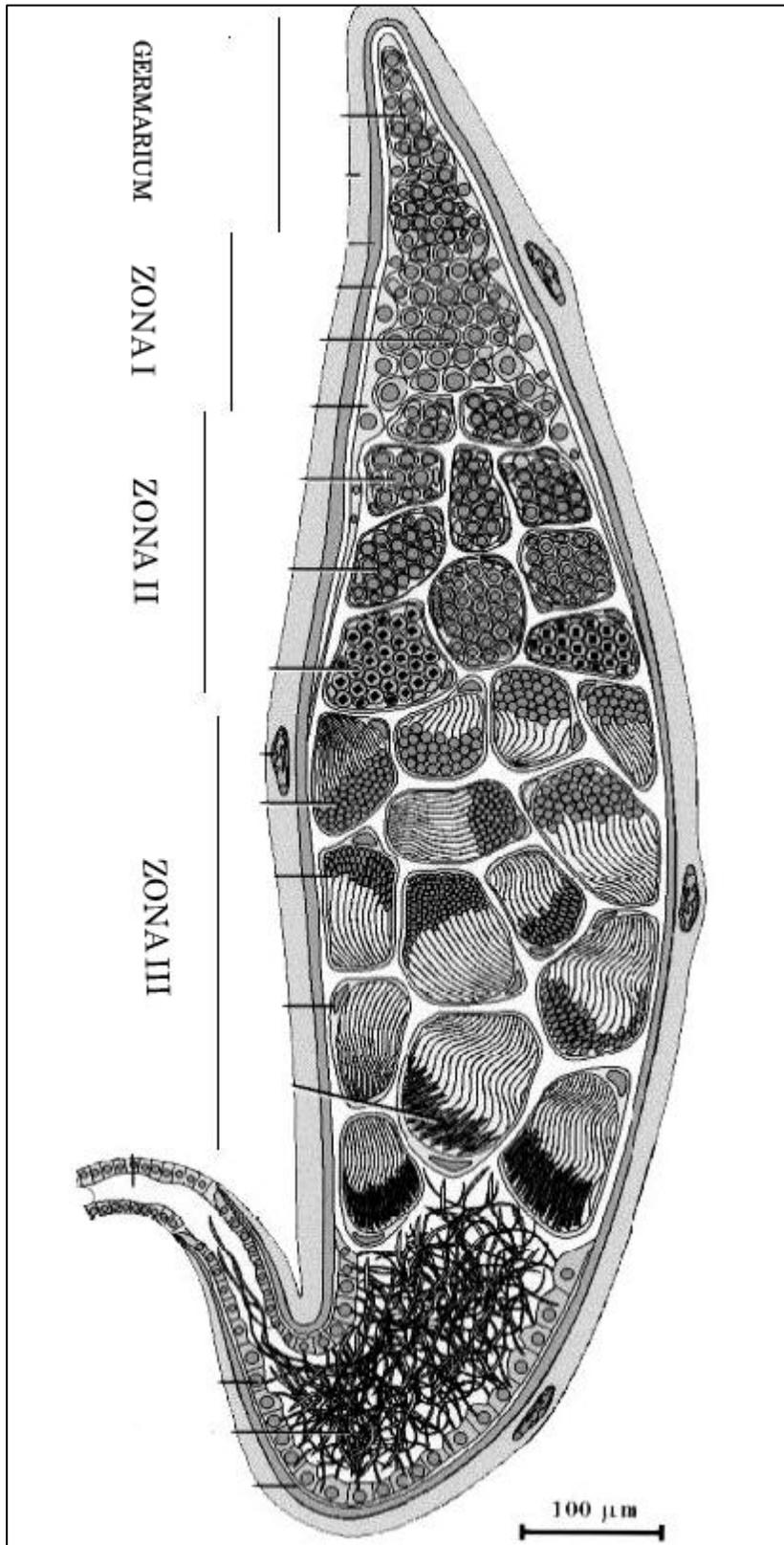


Figura 1. Esquema general de un folículo testicular de insecto. Dado que la espermatogénesis en insectos es longitudinal, los quistes que contienen a las células de la línea germinal, se van desplazando del *germarium* hacia el conducto deferente. El *germarium* contiene células germinales indiferenciadas en división mitótica, células progenitoras del quiste y a las células ápicales. En la zona I se encuentran los quistes de espermatogonias en crecimiento. En la zona II los espermatocitos experimentan las dos divisiones meióticas. Por último, la zona III contiene a las espermatidas en proceso de espermiogénesis que generara los espermatozoides que serán liberados por el vaso deferente (tomado de Valdez, 2001).

De cada folículo testicular un vaso eferente (fino y usualmente corto) se conecta con el vaso deferente que es un tubo limitado por un epitelio espeso, una lámina basal y una capa circular de músculo hacia fuera. El vaso deferente se vacía en el conducto eyaculador. Al menos algunas de las células del vaso deferente son glandulares, secretando su producto hacia el lumen. Las vesículas seminales en las cuales los espermatozoides son almacenados antes de la transferencia a la hembra, son dilataciones del vaso deferente en muchos insectos, pero en algunos Himenóptera y Díptera éstas son dilataciones del conducto eyaculador. Los Lepidoptera presentan ambas estructuras. Las capas celulares de las vesículas seminales son glandulares y probablemente provean de nutrientes a los espermatozoides (Chapman, 1998; Nation, 2002).

El vaso deferente se conecta con un conducto de tamaño mediano, llamado el conducto eyaculador, el cual usualmente se abre posteriormente en la membrana de entre el noveno y décimo segmento abdominal. Los Ephemeroptera no tienen conducto eyaculador y el vaso deferente lleva directamente el producto hasta la abertura del genital pareado. Dermaptera, por otra parte, tiene conductos eyaculadores pareados, aunque en algunas especies uno de ellos es vestigial. Partes de la pared del conducto eyaculador son glandulares, contribuyendo a la formación de los espermatóforos. Y en los organismos que producen un complejo de espermatóforos, el conducto eyaculador presenta gran complejidad en su constitución. Tanto los vasos deferentes como el conducto eyaculador se encuentran revestidos por una capa de músculo, la cual está involucrada en la propulsión del semen (Chapman, 1998; Nation, 2002).

Varias estructuras glandulares están típicamente asociadas con los vasos deferentes o con el conducto eyaculador, aunque en algunos insectos (Apterygota y algunos Diptera) se pierden las glándulas accesorias. Estas glándulas accesorias como sus conductos, pueden tener un origen mesodérmico (evaginaciones de los vasos deferentes) o ectodérmico (evaginaciones del conducto eyaculador). Éstas usualmente se presentan como un simple par (en *Tenebrio molitor* se presentan dos pares), o pueden llegar a formar hasta un cúmulo (cucarachas). Algunas veces las glándulas accesorias no pueden ser distinguidas como es el caso en los Apterygota, Ephemeroptera y Odonata, y Diptera moscoides (Chapman, 1998; Nation, 2002).

Entre las funciones conocidas de las glándulas accesorias masculinas se encuentra la secreción de fluido seminal, el cual puede contener productos químicos involucrados en la activación de espermatozoides y también la producción de espermátóforos. Además, las secreciones de estas glándulas pueden influir en la inseminación de la hembra en una variedad de formas, incluidas: la estimulación de la ovoposición, la aceleración de la maduración del ovocito, la estimulación de las contracciones del conducto genital que produce el movimiento del esperma, y la inhibición de la inseminación subsiguiente por la formación del tapón vaginal o ejerciendo un efecto en la conducta de la hembra (Chapman, 1998; Nation, 2002).

El método primitivo de inseminación en insectos involucra la producción por el macho de espermátóforos, una cápsula en la cual el esperma junto con secreciones proteicas de las glándulas accesorias es transportada a la hembra. Las glándulas accesorias secretan espermatoforinas, proteínas que forman los espermátóforos. Adultos del gusano de la harina (*T. molitor*) contienen más de ocho tipos celulares en la pared de las glándulas accesorias que secretan diferentes proteínas de manera secuencial que son específicas para cada capa del espermátóforo en formación (Nation, 2002).

2.3 Generalidades de la Meiosis

La meiosis es el proceso de división celular de los organismos con reproducción sexual para la generación de sus gametos. Durante la meiosis suceden dos eventos principales: 1) se reduce el número cromosómico (conocido como división reduccional) y 2) se tiene un alto grado de recombinación genética entre los cromosomas homólogos (Moens 1994). El primer evento permite que los gametos producidos puedan tener una carga genética adecuada y se puedan fusionar para la formación de un individuo con la ploidía propia de la especie. Por su parte la recombinación genética genera variación en la descendencia que puede ser ventajosa ante las presiones de selección.

La meiosis consiste en dos divisiones denominadas división meiótica I y división meiótica II. Cada una de ellas posee estadios denominados: profase, metafase, anafase y telofase. De todos los estadios, el más largo y complejo es la profase I. La importancia de la profase meiótica I radica en que en esta se lleva a cabo el reconocimiento,

apareamiento, sinapsis y recombinación genética de los cromosomas homólogos. Mientras que en la anafase I se reduce la ploidía o carga genética a la mitad por la segregación de los cromosomas homólogos (denominada reduccional, Fig. 2), en la anafase II cada cromosoma que se duplicó en la fase S pre-meiótica se separa por una segregación denominada ecuacional (Alberts *et al.*, 2002).

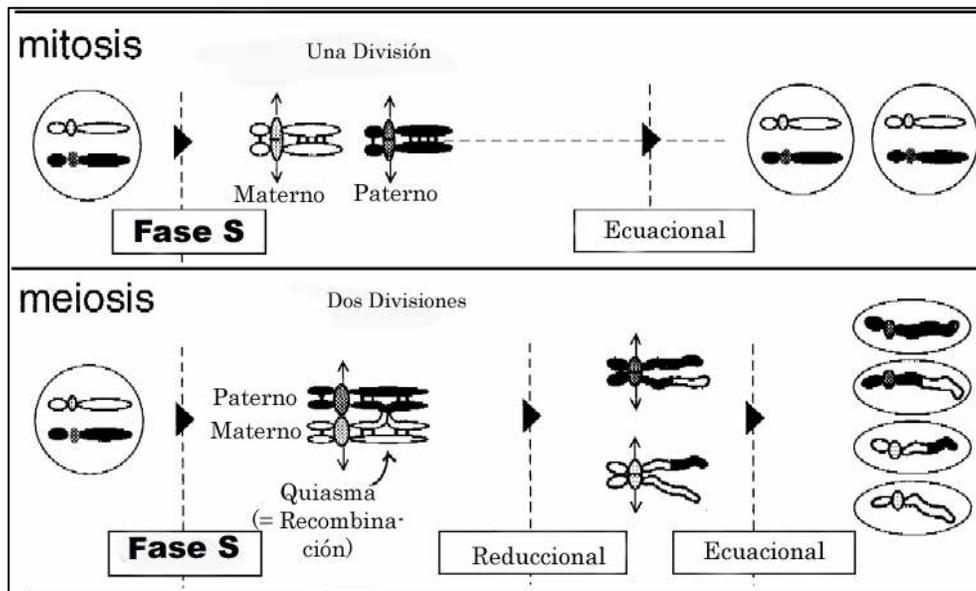


Figura 2. Diferencias entre la segregación de los cromosomas mitóticos (arriba) con los meióticos (abajo). En la meiosis, además del evento de recombinación genética entre cromosomas homólogos, existen dos eventos de segregación de los cromosomas: el reduccional (se segregan los homólogos) y el ecuacional (se segregan las cromátidas hermanas; tomado y modificado de Zickler y Kleckner, 1998).

Previamente a la meiosis se lleva a cabo un evento de duplicación del material genético (fase S del ciclo celular) seguido por dos eventos de segregación de cromosomas. Una célula meiótica diploide entonces, genera cuatro productos meióticos haploides. En contraste, durante el ciclo celular mitótico, la replicación del material genético es seguida por sólo un evento de segregación de cromosomas (Fig. 2; Zickler y Kleckner, 1998). En la mayoría de los animales, los productos meióticos son transformados directamente en gametos. Mientras que en las plantas las células haploides producidas crecen por divisiones mitóticas hacia gametófitos, los cuales ahora producirán el polen y los óvulos. En muchos hongos, briofitas y pteridofitas, estos productos constituyen la fase haploide del ciclo de vida (Zickler y Kleckner, 1998).

2.4 Etapas de la Profase Meiótica I

Si bien el proceso de meiosis comprende una serie de eventos continuos que llevan a la reducción de la ploidía y a la variación genética, la profase meiótica I se ha dividido en, al menos, cinco etapas en términos de una serie de cambios en la morfología de los cromosomas que se observó a nivel de la microscopía óptica (Whitehouse, 1973; citado en Zickler y Kleckner, 1998). Estas cinco etapas fueron nombradas de la siguiente forma: leptoteno (del griego *leptos*, hilo delgado), cigoteno (*cigos*, hilos juntos), paquiteno (*pakhus*, hilo grueso), diploteno (*diplos*, doble hilo) y diacinesis (*cinesis*, separación) (Gilbert, 2000). Algunos autores consideran al periodo G2 del ciclo celular como una etapa de pre- leptoteno donde se observan las características de un núcleo en interfase, donde los cromosomas no son visibles ya que son aún muy delgados (Solari 1999). De manera general, el reconocimiento entre cromosomas homólogos, sinapsis y apareamiento, formación de Complejo Sinaptonémico (CS) y recombinación homóloga, comprenden los eventos primordiales a desarrollarse en estas cinco etapas.

El inicio de la meiosis (leptoteno) está marcado por una organización en dominios discretos de los cromosomas, producto de su acomodo en la última anafase mitótica y que se ha encontrado ampliamente distribuida en el reino de las plantas y en huevos de *Ascaris* (Spector, 2003). Esto ha sugerido que los cromosomas ocupan ciertos dominios en el núcleo celular, así como los telómeros de los cromosomas se encuentran anclados en un lado de la envoltura nuclear y los centrómeros de los mismos en el lado opuesto, a lo cual se le nombró como Organización Rabl (por el nombre de quien la describió) (Cowan *et al.*, 2001; Spector, 2003). Sin embargo, esta orientación no existe en células de mamífero (Scherthan *et al.*, 1998).

Pre- profase

El ciclo meiótico comienza con células en condición pre-meiótica G1/G0 caracterizada por un marcado crecimiento del núcleo. La fase S pre-meiótica morfológicamente se ha caracterizado por presentar cromatina laxa y algunos cuantos grumos de cromatina compacta. Los eventos moleculares de la fase S meiótica son análogos a los de la fase S mitótica, aunque con una diferencia muy notable en cuanto a su duración (Ortiz,

2002a). Como resultado de esta fase de duplicación tenemos que cada cromosoma posee una copia idéntica de sí mismo, cada par de cromosomas ahora recibe el nombre de cromátidas hermanas. En *Saccharomyces cerevisiae* mediante el bloqueo de esta fase S en células pre- meióticas se ha detenido el evento del rompimiento de doble hebra (DSB, por sus siglas en inglés), que marca el inicio de la recombinación, lo que indica que en la levadura existe una conexión entre ambos eventos, y que además pueden existir preparativos de la recombinación que se inician antes de la profase meiótica (Borde et al., 2000). En algunos organismos, los cromosomas homólogos se encuentran apareados en la fase G1/G0, en cuyo caso el apareamiento se pierde durante la fase S y posteriormente se restablece (Zickler y Kleckner, 1998).

Profase inicial—media

Para la etapa de pre- leptoteno, los cromosomas de muchos organismos experimentan un ciclo de compactación, el cual puede ser más o menos pronunciado. En general, durante esta etapa los cromosomas son todavía muy delgados y difíciles de observar. Para **leptoteno**, los cromosomas pueden ser ya discerniblemente individualizados como hilos delgados, que inclusive son más largos que en la mitosis (Zickler y Kleckner, 1998). Las cromátidas hermanas se encuentran estrechamente empaquetadas, y parte del ADN de éstas, se distribuye sobre la longitud de un elemento axial (EA) por cada cromosoma homólogo.

La cohesión entre cromátidas hermanas es esencial para asegurar el correcto anclaje de los cromosomas a los microtúbulos del huso, con lo cual se garantiza su apropiada segregación durante la meiosis o mitosis (Miyazaki y Orr-Weaver, 1994). Sin embargo, las proteínas que constituyen los EAs son específicas de la meiosis, y se les conoce como 'cohesinas' (Roeder, 1997). Además, los cúmulos de cohesinas que se forman durante la meiosis parecen proveer un andamiaje para la asociación de los EAs y proteínas de recombinación (Pelttari *et al.*, 2001).

También en la etapa de leptoteno los extremos de elementos axiales relacionados con los telómeros se unen a la envoltura nuclear, constituyendo una estructura denominada placa de adhesión, que está acompañada por la redistribución de los poros nucleares,

que pierden su distribución homogénea, tendiendo a acumularse junto a los sitios de fijación de los telómeros (Schuls- Schaefer, 1980; Swanson *et al.*, 1981; citados en Ortiz, 2002a).

La transición de la etapa de leptoteno a la de cigoteno está enmarcada por importantes cambios en la configuración tridimensional de los cromosomas. El núcleo, en esta subfase meiótica, exhibe una acumulación de los telómeros altamente polarizado, llamado '*bouquet*' (Bass, 2003). A esta particular distribución se le ha atribuido la función de reducir el espacio de búsqueda entre los cromosomas homólogos para su apareamiento, sinapsis y posterior recombinación genética (Scherthan *et al.*, 1996; Zickler y Kleckner, 1998; Trelles- Sticken *et al.*, 2000; Bass, 2003) La organización en bouquet de los telómeros se encuentra conservada evolutivamente entre hongos, plantas y animales (Bass, 2003).

La organización nuclear del **cigoteno** está caracterizada por un mayor grado de compactación de la cromatina con relación al leptoteno y la presencia de segmentos cortos de elementos axiales apareados. Es muy frecuente encontrar sitios de apareamiento en los telómeros de los cromosomas homólogos, puesto que la configuración previa de bouquet así lo promovió (Solari, 1999). La sinapsis entre cromosomas homólogos (interconexiones entre EAs alineados) puede comenzar en esta etapa, puesto que se ha observado la presencia de proteínas que median esta interacción: la recombinasa homóloga a RecA (bacterial), RAD51; SPO11 y DMC1 que tienen actividad en el DSB (Tarsounas *et al.*, 1999). Como consecuencia de esta interacción molecular, se pueden observar *nódulos de recombinación* (NR) tempranos los cuales corresponden a los DSBs y/ o interacciones de apareamiento (Richardson *et al.*, 2002).

Una vez que los elementos axiales de los cromosomas homólogos se encuentran cercanamente yuxtapuestos en toda su longitud, el resultado es la formación del *complejo sinaptonémico* (CS), una prominente y universal característica de la meiosis (Zickler y Kleckner, 1998). El CS es una estructura proteica tripartita, que medía la íntima asociación de dos homólogos a través de su longitud completa. El CS podría ser requerido para promover la recombinación en la mayoría de las especies estudiadas,

estabilizar interacciones recombinacionales, y mantener los entrecruzamientos (puntos de recombinación genética; Zickler y Kleckner, 1998). Todo el periodo en que el complejo sinaptonémico permanece corresponde a la etapa de **paquiteno**. Además, durante el paquiteno los cromosomas progresivamente se van acortando ya que continúa la condensación de éstos.

Profase tardía

En el **diploteno** los CSs constituidos entre los pares homólogos se disocian, como consecuencia, el espacio central se agranda y sus componentes desaparecen; por lo que la tendencia de los homólogos es alejarse excepto en la posición de los quiasmas avanzados (o nódulos de recombinación). Estos nódulos de recombinación avanzados están constituidos por ADN de cada homólogo y proteínas. Estas estructuras corresponden al lugar donde la recombinación genética entre cromátidas homólogas ha ocurrido (Carpenter 1975). Los eventos de recombinación entre pares homólogos varían incluso a nivel de especie, por lo que se han encontrado diferencias en los números de quiasmas entre los taxa (Zacaro *et al.*, 2003).

El CS después de su degradación durante la transición paquiteno—diploteno, es remplazado por los quiasmas, los cuales, además de ser la consecuencia morfológica de la recombinación genética, mantienen a los bivalentes juntos hasta la metafase I. Sin embargo y sobre todo en insectos, existe un tipo de meiosis donde los quiasmas se han perdido, a la cual se le ha nombrado meiosis aquiasmática (Santos, 1999). En muchas especies de los ordenes Diptera, Lepidoptera y Trichoptera alguno de los sexos no presentan CS ni nódulos de recombinación. En los machos de *Drosophila melanogaster*, que no forman CS, los homólogos se encuentran apareados en su longitud al inicio de la profase meiótica y así permanecen hasta su segregación en la anafase (Marec, 1996). En algunos insectos del Orden Coleoptera, los cromosomas sexuales en profase meiótica I forman un cuerpo conocido como Xyp ($p = \text{parachute}$), el cual permanece inclusive después de la metafase I (Wolf, 1997). Entre estos dos cromosomas asimétricos del escarabajo *Tenebrio molitor*, no se encontró ADN estabilizando su asociación, pero es muy probable que algún tipo de ARN tenga participación para mantener esta asociación tal como en *D. melanogaster* (Wolf, 1997).

Schizosaccharomyces pombe, es otro organismo cuya meiosis no experimenta la formación de complejo sinaptonémico y los cromosomas homólogos se aparean constituyendo una serie de estructuras discontinuas llamadas elementos lineares. Sin embargo, los elementos lineares poseen proteínas estructurales de CSs de *S. cerevisiae*, lo cual ha indicado una relación evolutiva entre estos elementos lineares con los elementos laterales del complejo sinaptonémico (Lorenz *et al.*, 2004)

En muchas especies animales, desde hidras hasta vertebrados “superiores”, en la etapa de diploteno, como consecuencia de la inactivación de los cromosomas en los ovocitos, existe la formación de una estructura nuclear llamada *cariosfera* (Gruzova y Parfenov, 1993). La cariosfera está constituida por la condensación de todos los cromosomas en un área nuclear delimitada. Se ha observado, en la mayoría de los organismos que presentan cariosfera, que esta se encuentra rodeada por factores de “splicing” (snRNPs y SC35) en una especie de cuerpos nucleares y no hay presencia de nucleolo (Gruzova, 1982; Bogolyubov *et al.*, 2000).

El estadio final de la profase meiótica I es la **diacinesis** y la pro- metafase I tiene lugar al término de ésta. En la diacinesis los cromosomas homólogos se vuelven a compactar hasta un nivel que, para la metafase I, los cromosomas son casi tan cortos como lo son en la metafase mitótica (Zickler y Kleckner, 1998).

2.5 Complejo Sinaptonémico

El Complejo Sinaptonémico (CS) fue descrito por primera vez por Moses en 1956 en espermatozoides de cangrejo (citado en Ortiz, 2002a). El CS está asociado con el apareamiento de cromosomas homólogos durante la meiosis. Además de ser una estructura altamente conservada en la escala evolutiva, el CS posee una estructura general que se mantiene en todos los organismos que lo presentan. El complejo sinaptonémico asemeja un listón que se localiza entre dos cromosomas homólogos apareados a lo largo de su longitud total y despliega una estructura tripartita típica (Fig. 3): un elemento central (EC) que se encuentra flanqueado por un elemento lateral (EL) a cada lado. También, un gran número de filamentos transversos conectan a cada uno de los elementos laterales al elemento central (Zickler y Kleckner, 1999).

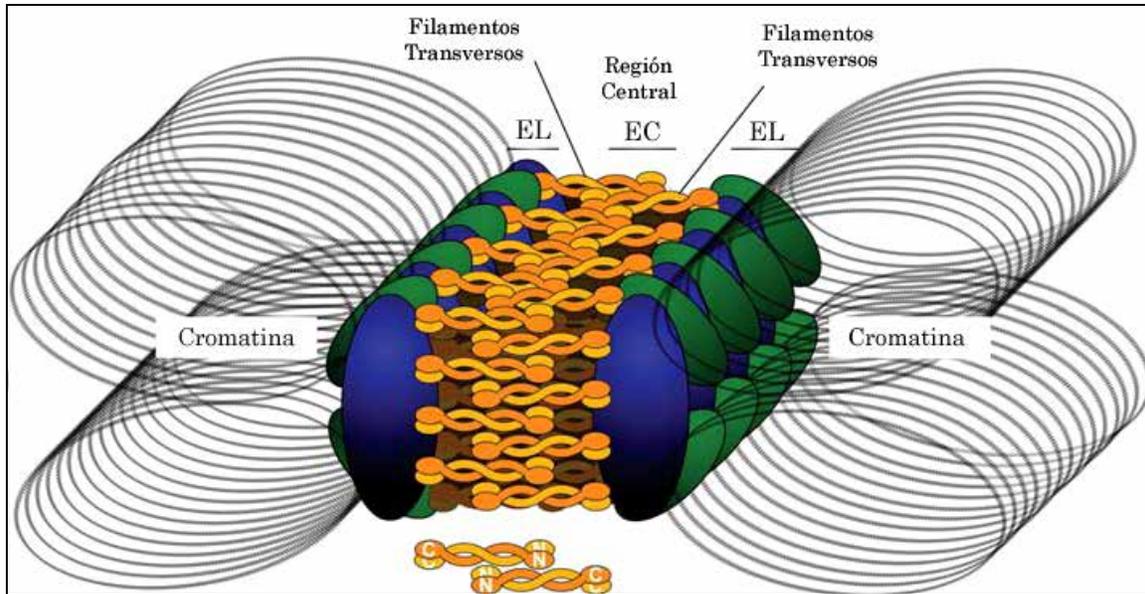


Figura 3. Esquema general del Complejo Sinaptonémico. Cada elemento lateral (EL) del CS se encuentra constituido por la cromatina de cada homólogo además de proteínas; en la región central se localiza el elemento central (EC) conformado por los filamentos transversos que van de un EL al otro (tomado y modificado de Page y Hawley, 2004).

Ácidos Nucleicos

En los ELs se ha observado gran cantidad de ADN asociado y no en la región central, excepto en algunos sitios escasos que presumiblemente corresponden a los nódulos de recombinación genética (Vázquez Nin *et al.*, 1993). Además los ELs del CS en la etapa de paquiteno se encuentran estriados longitudinalmente con una periodicidad de unos 20 nm (Ortiz *et al.*, 2002b). Mediante técnicas histoquímicas y de hibridación *in situ* ultraestructural, se ha observado que una serie de asas cromatinianas se incorporan a cada Ello que ha llevado a pensar que en estas asas se incluyen las secuencias de anclaje del ADN a las proteínas de los ELs del complejo sinaptonémico (Ortiz *et al.*, 2002b). Se ha demostrado que el ADN asociado al CS está enriquecido en secuencias GT/CA y en secuencias repetidas interespaciadoras génicas largas y cortas (LINE y SINE, por sus siglas en inglés) (Pearlman *et al.*, 1992).

En lo que respecta al ARN, se ha reportado la presencia de ribonucleoproteínas (RNPs; macro-moléculas constituidas por ARN más proteínas) en los elementos laterales del CS así como en los ejes cromosómicos en etapas de leptoteno y cigoteno (Vázquez Nin

y Echeverría, 1976; Ortiz *et al.*, 2002b). Inclusive, se ha encontrado que digestiones con RNAsa provocan severas alteraciones de los ELs (Vázquez Nin y Echeverría, 1976).

Proteínas

Además de los ácidos nucleicos que conforman el CS existen otros componentes que participan en la estructura y formación de éste. Éstos son los complejos de *condensinas* y *cohesinas* que fueron así nombrados por sus funciones mitóticas en la condensación de los cromosomas y cohesión de cromátidas hermanas, respectivamente. En células mitóticas las cohesinas son requeridas para establecer cohesión entre cromátidas hermanas durante la replicación del ADN. Los complejos de cohesinas mitóticos constan de dos proteínas de mantenimiento estructural del cromosoma (SMC), SMC1 y SMC3, y dos componentes no-SMC llamados SCC1 y SCC3 (Page y Hawley, 2004).

Las cohesinas también se encuentran presentes en células meióticas, pero ciertos miembros de los complejos han sido reemplazados por parálogos específicos de la meiosis. SCC1 se ha sustituido por una proteína a la cual se le han dado diferentes nombres dependiendo la especie, REC8 (*S. cerevisiae*), C(2)M (*D. melanogaster*) o SYN1 (*Arabidopsis thaliana*). De hecho REC8 ha sido inmunolocalizada en los ejes cromosómicos de insectos Hemípteros (Pigozzi y Solari, 2003). Adicionalmente, SCC3 se ha suplido por STAG3 en mamíferos y por Rec11p en levadura, y SMC1 β ha reemplazado al complejo mitótico SMC1 en muchos sistemas meióticos de mamíferos (tomado de Page y Hawley, 2004).

En las fases iniciales de la profase meiótica las cohesinas se ensamblan en los elementos axiales y por tanto, para el paquiteno, éstas forman parte del CS. De hecho se ha observado que este tipo de proteínas participan en la constitución de los ELs formando un patrón en el eje cromosómico en el cual, las demás proteínas de los ELs se unen y ensamblan. En mutantes de *S. cerevisiae*, *rec8* y *smc3*, la formación de los ELs o fragmentos de elementos axiales fue interrumpida (Klein *et al.*, 1999). La proteína ORD (disruptora de la orientación) tiene un papel en la cohesión entre cromátidas hermanas, pero también en mutantes *ord* de *Drosophila*, se ha encontrado que la estructura tripartita del CS no se conserva para el paquiteno, resultando en una

segregación azarosa de las cromátidas hermanas en ambas divisiones de la meiosis (Webber *et al.*, 2004).

Otro grupo de proteínas, cuya presencia se ha observado necesaria para la formación del complejo sinaptonémico, es el grupo de las condensinas. Estas proteínas se encuentran participando en la compactación axial e individualización de los cromosomas durante la profase meiótica.

Las proteínas del complejo sinaptonémico (SCP, por sus siglas en inglés) SCP2 y SCP3 fueron las primeras identificadas en CSs de rata (Page y Hawley, 2004). SCP3 (conocida como COR1 en hámster) es una proteína de 30-kDa con una posible secuencia de aminoácidos de unión a nucleótidos y regiones predichas como un dominio espiralado (coiled coil) en su carboxilo terminal. SCP2 es una proteína de 173-kDa que se une al ADN (Page y Hawley, 2004). Schmekel y colaboradores (1996) encuentran que otra proteína del CS, SCP1 (mamíferos) Syn1 (*Caenorhabditis elegans*), ZIP1 (levaduras) (Sym *et al.*, 1993) y C(3)G (*D. melanogaster*) (Hawley, 2002), se localiza en la región central del CS, en los filamentos transversos.

SCP2 y SCP3 temporalmente se localizan primero en los elementos axiales durante el leptoteno y permanecen asociadas con los elementos laterales del CS y los brazos cromosómicos en la metafase I (Zickler y Kleckner, 1999). En espermatoцитos de insectos heterópteros, el inmunomarcaje de SCP3/ COR1 sólo fue positivo en los CSs de los cromosomas autosómicos pero no en los sexuales (Suja *et al.*, 2000), indicando que en este grupo de insectos existe una proteína de los elementos laterales probablemente homóloga a SCP3.

Hop1p y red1p son proteínas específicas de la meiosis que son constituyentes de los ELs en *S. cerevisiae*, como lo son SCP3 y SCP2 en mamíferos. Estas proteínas juegan un papel muy importante en la formación de los elementos axiales/ laterales. Hop1p es un miembro de una familia de proteínas que todas localizan a lo largo de los ejes cromosómicos durante la profase I. Esta familia incluye Hop1p en levadura, HIM-3 en *C. elegans* y Asy1 en plantas tal como *Arabidopsis* (Page y Hawley, 2004).

Los policomplejos

Los policomplejos son elementos que suelen existir en células post-paquiténicas primeramente observadas en insectos por Sotelo y Trujillo—Cenoz, y posteriormente en muchos otros organismos, incluyendo protistas, hongos, plantas y animales (Marec, 1996; Zickler y Kleckner, 1999). La estructura de los policomplejos corresponde a la de los CSs, pero estos contienen alternando ELs y regiones centrales, además pueden ocurrir libres o con cromatina asociada así como otros componentes.

Los policomplejos se han interpretado como productos auto-ensamblados de fragmentos de CSs desechados de los bivalentes en paquiteno (Marec, 1996). El núcleo de las células meióticas no es el único lugar donde se pueden presentar estas estructuras ya que se han descrito en el citoplasma y/ o en asociación con el huso meiótico de insectos del orden Orthoptera (Marec, 1996).

Los policomplejos también fueron observados particularmente en situaciones donde el metabolismo de los cromosomas meióticos es anormal, por ejemplo, levaduras mutantes para la proteína de los filamentos transversos del CS, *zip1*, presentan un aumento en la probabilidad de aparición de los policomplejos (Sym y Roeder, 1995). El hecho de que un elemento de la maquinaria de recombinación sea aberrante, no significa el único motivo de formación de los policomplejos, ya que también se inducen con el bloqueo de otros componentes de la profase como son las ciclinas (Zickler y Kleckner, 1999). Finalmente, la formación de policomplejos también puede ser inducida por un aumento en la temperatura o tratamiento con colchicina (Zickler y Kleckner, 1999).

2.6 Alineamiento homólogo y recombinación genética

Búsqueda de homología

En los párrafos anteriores hemos estado describiendo los mayores eventos morfológicos y moleculares que llevan a cabo los principales objetivos de la meiosis en la reproducción sexual: la variación, reducción y segregación del material genético. Para

ello, los cromosomas homólogos experimentan un reacomodo en el núcleo que los lleva a una íntima asociación a lo largo de sus ejes y así construir la estructura que, en general, promueve estos eventos, el complejo sinaptonémico. Sin embargo, el mecanismo por el cual un cromosoma “elige” alinearse y posteriormente **aparearse** sólo con su homólogo permanece todavía oculto y han surgido diversas teorías.

Es preciso mencionar que el término ‘apareamiento’ no sólo incluye al proceso por el cual los cromosomas homólogos se asocian para realizar el intercambio genético. Cook en 1997, llega a la distinción de cuatro tipos de apareamiento de cromosomas involucrados en la meiosis: 1) durante la fase S meiótica, una duplicación inicial de la doble hélice genera dos copias (las cromátidas hermanas) que permanecen juntas a través de la primera división meiótica. Tal apareamiento es explicado simplemente por la cohesión de las proteínas que sostiene a los dos cromosomas juntos durante el periodo relevante; 2) durante el leptoteno, cada par duplicado hace la búsqueda por su homólogo (duplicado), para que a principios del cigoteno se encuentre paralelo a su pareja, usualmente a una distancia de unos 300 a 1000 nm entre ellos. El término ‘alineamiento’ será usado para describir el remarcado mecanismo que crea ésta distancia de asociación (búsqueda del homólogo hasta quedar de entre 300 y 1,000 nm de distancia); 3) durante el cigoteno, la construcción del complejo sinaptonémico deja todavía más juntos a los dos homólogos, para que en paquiteno los homólogos (duplicados) queden aproximadamente a unos 100 nm entre ellos. El término ‘sinapsis’ se usará para esta asociación más cercana; 4) la recombinación toma lugar entre dos duplex de ADN que deben quedar pareados muy estrechamente a nanómetros de distancia el uno del otro. Únicamente cuando estos cuatro diferentes tipos de asociaciones se llevan a cabo, los cromosomas quedan alineados en el huso meiótico y entonces son segregados por las dos metafases meióticas en las células germinales haploides. El apareamiento preciso entre homólogos depende de la complementariedad (homología) que existe entre las bases en las hebras de ADN individuales (Cook, 1997).

Para el proceso de búsqueda de homología se han propuesto modelos que involucran la participación de moléculas tales como ADN, ARN y proteínas. Lo más aceptado es que el ADN es la macromolécula involucrada en el reconocimiento homólogo (Moens, 1994; revisado por Cook, 1997). Sin embargo, el ADN de doble hebra es ineficiente en

la búsqueda de homología puesto que el enrollamiento de la hélice impide contactos de base—apareamiento con la otra hélice. Además, no se tiene registro de ADN de una sola hebra con suficiente longitud para una búsqueda por homología, ya que la presencia de endonucleasas impide su existencia. El ADN de una sola hebra sólo está presente cuando el DSB tiene lugar, lo cual sucede hasta la fase de apareamiento de cromosomas homólogos (revisado por Sybenga, 1999) cuando la búsqueda por homología ya ha sucedido.

Otro hecho muy importante para el surgimiento de teorías de búsqueda de homología es que existe una estrecha relación entre apareamiento y transcripción (Cook, 1997; McKee 1998; Sybenga, 1999; Ortiz *et al.*, 2002b; Vázquez-Nin *et al.*, 2003). Sybenga en 1999, propone que factores de transcripción (que son proteínas) quedan anclados al ADN de una de las cromátidas durante la fase S de replicación, creando una estructura terciaria del ADN que bien podría ser reconocida por proteínas de apareamiento, semejantes a priones que ligarían al homólogo en su cromátida que posee estos factores de transcripción.

Peter Cook (1997) propone un modelo muy similar al anterior; donde los factores de transcripción se acoplan a las fibras de cromatina en promotores específicos y por tanto generarán patrones moleculares propios de cada cromosoma y mediante movimientos de los cromosomas en las fases iniciales de la profase meiótica, podrían estos patrones llegar a tener contacto con su homólogo (que tendría el patrón idéntico de factores de transcripción) y los factores de transcripción y nucleosomas estabilizar estas interacciones mediante el inicio de la transcripción al encontrarse patrones idénticos.

Muy recientemente, Vázquez Nin *et al.* (2003) encuentran en espermatoцитos de cobayo que filamentos radiales de estructuras micro- plumuladas se asocian en la interfase meiótica—leptoteno, provocando el alineamiento paralelo de ejes relacionados por numerosas asas transversas de cromatina laxa en transcripción sin procesamiento post-transcripcional (Fig. 4). Estos alineamientos son descritos como estructuras que asemejan *escaleras de doble cuerda*, cuyos ejes son la base de formación de los ejes cromosómicos y futuros elementos laterales del complejo sinaptonémico (Fig. 3).

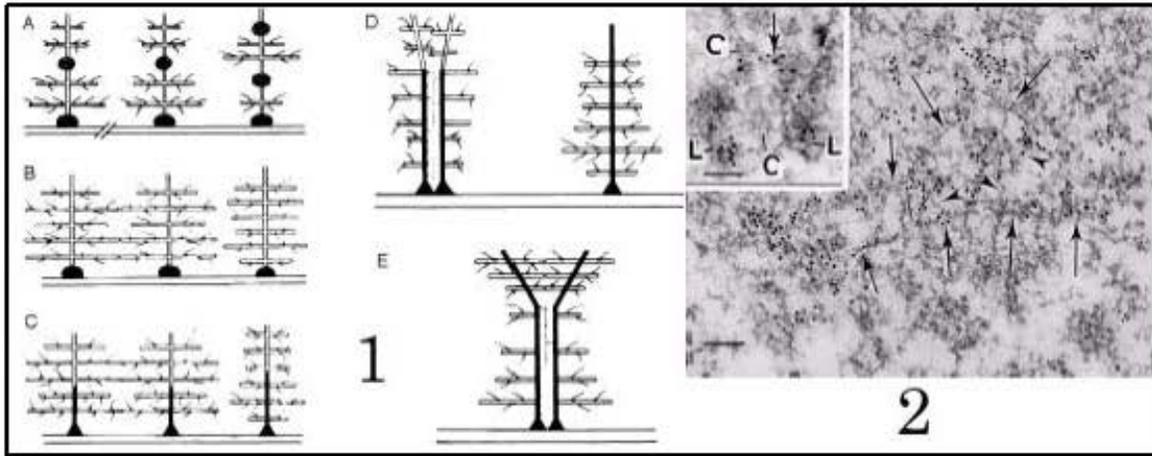


Figura 4. En cobayo los cromosomas homólogos se reconocen y aparean mediante la participación de estructuras filamentosas desde muy temprano en la meiosis. **1.** esquematización dinámica de las estructuras lampbrush o microplumuladas en la profase meiótica I. A) estructuras microplumuladas que asemejan arbolillos inician la búsqueda vía contacto de sus ramas (asas de cromatina), las distancias entre ellos son variables; B) sólo las ramas de estas estructuras que han reconocido homología con otras se asocian más estrechamente; C) en la etapa de lepto-cigoteno, se comienzan a formar los ejes cromosómicos por la deposición de material en los ejes de los microplumulados, al igual los microplumulados no apareados tienen formación de ejes cromosómicos y tal vez su apareamiento sea promovido por el estado de bouquet; D) se inicia la sinapsis y formación de CS, frecuentemente los extremos de estos CSs en crecimiento se continúan aún con estructuras microplumuladas; E) los pares homólogos que no tuvieron reconocimiento de homología temprana, tal vez la realicen después del estado de bouquet y el CS se constituya a partir de sus ejes cromosómicos ya formados. **2.** Micrografía electrónica que muestra dos estructuras lampbrush o microplumuladas en proceso de asociación. Las flechas señalan los ejes de los microplumulados y las puntas de flechas las ramas de estos interactuando en búsqueda de homología; los granos de oro marcan específicamente el ADN de la muestra. En el recuadro se muestra un CS en formación con sus ELs (L) y su región central (C). (tomado y modificado de Vázquez Nin *et al.*, 2003).

Interesantemente Vázquez Nin *et al.* (2003) no encuentra en estos espacios de apareamiento entre homólogos a las proteínas Rad51 y DMC1 de los DSBs y recombinación, las cuales también se han propuesto como enzimas que median el mecanismo de reconocimiento de homología en varios organismos (Tarsounas *et al.*, 1999; Pawlowski *et al.*, 2003; Loidl y Scherthan, 2004). Lo que ha llevado a proponer que es el ARN sintetizado en las estructuras microplumuladas el que se encuentra involucrado en el proceso de búsqueda y reconocimiento de homología y no factores proteicos conocidos (Ortiz *et al.*, 2002b; Vázquez Nin *et al.*, 2003).

Recombinación genética

La recombinación genética es el evento central en la meiosis de la mayoría de los organismos, ya que la segregación apropiada de los cromosomas y la viabilidad dependen de los niveles normales de recombinación. La recombinación involucra una serie de cambios bioquímicos localizados, que comienzan muy temprano en la profase meiótica con el DSB programado. El DSB tiene la misión de exponer una hebra sencilla de ADN con terminación 3' que invade secuencias homólogas de una de las cromátidas hermanas de su homólogo. Esta invasión genera una molécula heteroduplex entre cromosomas homólogos, que promueve el intercambio cruzado de hebras o *uniones Holliday*. En una unión Holliday, las dos hélices de ADN homólogas permanecen juntas por el intercambio recíproco de dos de las cuatro hebras presentes (Alberts *et al.*, 2002).

La recombinación meiótica inicia, de manera altamente conservada, con los DSBs formados por la enzima Spo11, una proteína parecida a la topoisomerasa II. Spo11 se ha encontrado en *S. cerevisiae* y vertebrados y sus homólogos Rec12 en *S. pombe* (Richardson *et al.*, 2004) y Spo11-1, -2 y -3 en *Arabidopsis* (Schuermann *et al.*, 2005). Mei-W68 en *Drosophila* codifica el homólogo de Spo11 (McKim y Hayashi-Hagihara, 1998), lo que podría hacer pensar un papel similar del DSB, recombinación y sinapsis en estos grupos.

Cientos o quizás miles son los DSB que se forman muy temprano en el leptoteno, sin embargo, muy pocos son los DSBs que llegaran a formar nódulos de recombinación avanzados, que son aquellos que han experimentado el intercambio recíproco de secuencias de ADN entre homólogos. La otra gran fracción de DSBs sigue una ruta de reparación del rompimiento de la doble hebra o de entrecruzamientos no recíprocos de conversión génica (Page y Hawley, 2004).

Una vez realizado el DSB, el complejo Rad51/ Dmc1 lleva a cabo la invasión de una hebra para la formación del heteroduplex de ADN entre los cromosomas homólogos, así Rad51 y todos los miembros del grupo de epistasis (la expresión de estos genes se ve regulada por otro) a RAD52, producen el intercambio recíproco de genes entre

cromosomas homólogos y la reparación del rompimiento de doble hebra promovida por Spo11 (Richardson *et al.*, 2004; Schuermann *et al.*, 2005), por tanto se concreta la formación de los nódulos de recombinación avanzados, que son los encargados de mantener unidos, en los sitios de recombinación, a los cromosomas homólogos hasta la primera división meiótica.

El DSB que inicia la recombinación también se ha encontrado involucrado en el apareamiento de cromosomas homólogos (Richardson *et al.*, 2004). Aunque interacciones dependientes de DSB representan el modo de apareamiento entre cromosomas homólogos en el leptoteno de *S. cerevisiae*, al menos algunos tipos de interacciones de apareamiento ocurren en la ausencia del DSB. Similarmente, en *Coprinus cinereus*, una fracción significativa de apareamiento homólogo ocurre inclusive cuando el DSB se ha perdido, lo que rompe la visión generalizada de que el DSB es esencial para la sinapsis. De hecho, el apareamiento homólogo ocurre normalmente en *C. elegans* y en ambos sexos de *D. melanogaster* en ausencia completa del DSB, de hecho el DSB para la recombinación recíproca ocurre hasta una vez que el CSs se ha ensamblado completamente (McKim y Hayashi-Hagihara 1998; Page y Hawley, 2004). Sin embargo, esta independencia entre el DSB y apareamiento homólogo en *D. melanogaster* no necesariamente es la que ocurre en la clase Insecta, ya que Viera *et al.* (2004) observa que en grillos (Orden Orthoptera), la ausencia de histona H2AX fosforilada (γ -H2AX), que es producida en la cromatina por la acción del DSB, interrumpe la sinapsis de homólogos, de manera contraria a *Drosophila* y muy semejante a lo observado en las levaduras.

3. Justificación

La meiosis es el proceso por el cual los organismos que se reproducen sexualmente generan los gametos que son los encargados del mantenimiento de la especie, además durante la meiosis se presentan eventos de recombinación genética entre cromosomas homólogos que generan variación de importancia evolutiva. Dos sucesos se han identificado como necesarios para que exista recombinación genética: 1) reconocimiento y apareamiento entre cromosomas homólogos y 2) formación del complejo sinaptonémico entre los cromosomas homólogos apareados. Sin embargo, los procesos y estructuras que participan en ambos eventos no se han esclarecido todavía y diversas teorías se han propuesto para explicarlos. Se ha observado que existe una estrecha relación entre apareamiento de cromosomas homólogos y transcripción y que, en vertebrados, ambos procesos tienen lugar en estructuras *micro-plumuladas* que se proponen como las encargadas de contener las secuencias genéticas homólogas que participan en el reconocimiento de homología. En el presente trabajo se propuso investigar la posible existencia de estas estructuras *micro-plumuladas* en un organismo invertebrado como lo es *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) a través de observaciones con microscopio electrónico de transmisión.

4. Objetivos

Objetivo general

Localizar las estructuras *micro- plumuladas* en los núcleos de células germinales pre-meióticas y durante la profase meiótica (espermatoцитos I) del escarabajo *Tenebrio molitor*.

Objetivos específicos

1. Identificar dentro de los folículos testiculares de *T. molitor*, al nivel de la microscopía óptica, los quistes de espermatoцитos primarios.
2. Analizar la distribución del ARN y ADN en espermatoцитos primarios pre-meióticos y en profase meiótica I de *T. molitor* mediante técnicas citoquímicas ultraestructurales.
3. Analizar ultraestructuralmente los participantes en el apareamiento y formación de complejo sinaptonémico entre cromosomas homólogos mediante técnicas citoquímicas y reconstrucciones tridimensionales.

5. Material y métodos

Muestras biológicas

Se disecaron testículos de *Tenebrio molitor* para el análisis de microscopía óptica y electrónica de transmisión, para la obtención de los testículos se emplearon tanto larvas como pupas de dicho escarabajo. En estas etapas del desarrollo se han encontrado todas las fases espermatogénicas (Weith, 1985; Wolf 1995).

Fijación

Tanto a las larvas como a las pupas se les inyecta *in vivo* la solución fijadora que contiene glutaraldehído al 2.5 % y paraformaldehído al 4 % en amortiguador PBS. Posteriormente, se extraen los testículos y permanecen enteros en esta solución fijadora durante una hora y media (Vázquez Nin y Echeverría, 2000).

Post fijación

Con la finalidad de obtener una mejor conservación del material biológico, una porción de las muestras fijadas se lavaron con el amortiguador PBS y posteriormente se sometieron a post fijación con tetraóxido de osmio por aproximadamente una hora. La otra porción del material biológico fijado con los aldehídos, estuvo exenta de la post-fijación, ya que el tetraóxido de osmio impide la aplicación de la técnica de contraste con amina de osmio que se realizará posteriormente. El tetraóxido de osmio además de aumentar la permeabilidad de las membranas (lo que impide los daños por los cambios osmóticos durante los tratamientos subsecuentes) también actúa como agente de contraste uniéndose a proteínas, ácidos nucleicos y principalmente a los lípidos polares de las membranas (Vázquez Nin y Echeverría, 2000).

Lavados y deshidratación

Una vez transcurrido el tiempo de fijación y/ o post- fijación las muestras se lavan con el amortiguador PBS tres veces durante 15 minutos. Posteriormente se deshidratan con un gradiente de alcoholes etílicos de diferentes concentraciones, desde el alcohol al 60 % hasta llegar al alcohol absoluto, seguido de dos cambios en óxido de propileno como agente intermediario en la pre-inclusión. La acción de este agente intermediario, que es el solvente de la resina, permite la sustitución del alcohol por la resina de inclusión en los espacios intermoleculares de la muestra (Vázquez Nin y Echeverría, 2000).

Pre-inclusión

Posteriormente las muestras se pasan a una serie de mezclas del agente intermediario con la resina epóxica (epón) de inclusión en diferentes proporciones (2:1, 1:1 y 1:2). Finalmente, se cambian las muestras hacia la resina pura (Vázquez Nin y Echeverría, 2000).

Inclusión

Con la finalidad de dar una consistencia firme y proporcionar un soporte adecuado para el corte, las muestras se colocan en moldes llenos de la resina epóxica y se polimerizan en una estufa a 60 °C durante 24 horas (Vázquez Nin y Echeverría, 2000). A las muestras que se han incluido en la resina, y una vez que ésta última se ha polimerizado, se les llama bloques.

Corte

Con los bloques obtenidos de la polimerización se realizan cortes semifinos de 300 a 600 nm en un ultramicrotomo Leica Ultracut. Estos cortes se pasan a un portaobjetos y se tiñen con azul de toluidina-bórax para su observación en el microscopio óptico con el fin de realizar un estudio de la constitución celular de los testículos de *T. molitor*.

Una vez que se ha reconocido la organización espacial de la espermatogénesis en los testículos de *T. molitor* y que se han identificado los quistes de espermatocitos primarios, se procede a la obtención de cortes ultrafinos para la microscopía electrónica de transmisión. Ya localizada la zona adecuada se retalla el bloque en forma de pirámide con la muestra en la punta para poder realizar cortes ultrafinos de aproximadamente 60 nm de espesor en el ultramicrotomo. Estos cortes se recogen en portamuestras de barrotos o rejillas de cobre previamente cubiertas con membranas de formvar, Además se recogen cortes en portamuestras de oro con barrotos sin cubierta de formvar. Todas las rejillas se llevan al contraste (Vázquez Nin y Echeverría, 2000).

Para las reconstrucciones tridimensionales se obtienen cortes ultrafinos seriados los cuales se recogen en un portamuestras de cobre con una ranura en el centro (Sjöstrand), la cual posteriormente se coloca en una membrana de formvar. Las series podían constar de 10 a 60 cortes consecutivos. Estos portamuestras también son llevados al contraste (Vázquez Nin y Echeverría, 2000).

Métodos de contraste

Para determinar la ultraestructura general de los núcleos de espermatocitos primarios en las distintas etapas de la profase meiótica I se aplica el método de contraste general de acetato de uranilo y citrato de plomo que se unen a proteínas y ácidos nucleicos (Vázquez Nin y Echeverría, 2000). Para teñir específicamente el ADN, los cortes colectados en rejillas de oro sin formvar se someten al método de amina de osmio (Cogliati y Gautier, 1973; Ortiz *et al.*, 2002b). Para evidenciar las ribonucleoproteínas se utiliza el método de EDTA de tinción preferencial de Bernhard (1969).

Todas las observaciones ultraestructurales de las muestras se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1010 operado a 80 kV y se registraron como archivos de imágenes digitales.

Reconstrucción tridimensional

Para las reconstrucciones tridimensionales se copiaron las estructuras de interés colocando papel celofán por encima de las micrografías electrónicas obtenidas de las

series. Una vez que se tiene la secuencia de las estructuras sobre el papel celofán se hicieron coincidir los dibujos trazados para determinar el arreglo y disposición de los elementos copiados (Ortiz 2002; Hernández 2003).

6. Resultados

6.1 Constitución de los folículos testiculares de *T. molitor*

Con la finalidad de reconocer los espermatoцитos primarios dentro de la línea espermatogénica de *T. molitor* se realizó un análisis a nivel de microscopía óptica del material disecado tanto de larvas como de pupas.

A nivel de la microscopía óptica, se observa que los testículos del gusano de la harina (*T. molitor*) presentan una organización folicular, donde cada folículo testicular contiene a las células de la línea germinal en desarrollo (Figura 5). Los folículos testiculares asemejan un saco alargado donde uno de sus extremos se continúa con el conducto deferente y el otro extremo se halla libre y constituye el *germarium*. Dentro de los folículos se pudo notar que las células se organizan en cúmulos que corresponde a los quistes que contienen a las células de la línea germinal. Tanto las larvas de últimos estadios como las pupas machos muestran folículos donde se encuentran procesos de espermatogénesis y de espermiogénesis, ya que es evidente que existen distintas poblaciones de quistes. La distinción entre poblaciones estuvo basada en el número de células germinales que contenía cada quiste y del grado de desarrollo.

La porción más distante al conducto deferente de cada folículo existe un cúmulo de pocas células alargadas que constituyen el *botón de células apicales* (Figura 6a). Adyacente a dicho botón tanto en las larvas como en las pupas hubo un número variable de estas células que no poseen alguna organización entre ellas. También adyacentes al botón de células apicales se encontraron quistes que contenían de dos a cuatro células de la línea germinal (figura 6a). Éstos, con cuatro células, constituyen la primera población de quistes dentro de la espermatogénesis que toma lugar en cada folículo testicular. Los núcleos de estas células son los más grandes de todos los contenidos en el folículo; contienen algunos cuerpos de heterocromatina adosados a la envoltura nuclear y pueden contener más de un nucleolo. El nucleoplasma posee muy poca afinidad al colorante (Azul de Toluidina) y se es casi transparente en el microscopio óptico (figura 6b).



Figura 5. Tinción con azul de Toluidina. Micrografía óptica de un folículo testicular cortado longitudinalmente (f). En cada uno de éstos la espermatogénesis comienza en la su porción apical (punta de flecha) y sus productos son vaciados a un conducto deferente (flecha). Los quistes (q) formados por células germinales son los constituyentes de los folículos. Barra de 35 μm aproximadamente.

Enseguida de los quistes de cuatro células (en la dirección que va de la porción apical al conducto deferente) se encuentra una segunda población de quistes. A diferencia de la primer población, la segunda consta de quistes que poseen ocho células de la línea germinal envueltas por al menos dos células somáticas (figura 6c). Los núcleos de éstas reducen su diámetro con respecto a los de la población anterior, sin embargo, conservan cuerpos de heterocromatina adosados a la envoltura nuclear, nucleolos y el nucleoplasma ya no se nota tan claro.

De manera muy evidente en estas dos primeras poblaciones, el fusoma (estructura que inter-conecta a las células del quiste) se observa en el centro de cada quiste con muy poca afinidad al azul de toluidina. Así, en estos quistes, la disposición de las células de

la línea germinal es en roseta, donde el fusoma está en el centro y el núcleo de cada célula hacia la envoltura del quiste (figuras 6b y 6e). Otra característica común de estas poblaciones es que las divisiones celulares, en específico las anafases y metafases, son muy abundantes en comparación con las que se llegaron a observar en las demás poblaciones quísticas (figura 6d). La abundancia de quistes de 2, 4 y 8 células, muestra una variación entre los folículos extraídos de las larvas de últimos estadios y los de pupas. En las primeras, el área de estas poblaciones representó aproximadamente casi un tercio del folículo; mientras que en las pupas, esta área se observó confinada a una pequeña porción de la zona apical del folículo.

La siguiente población que se distingue es la de quistes que contienen dieciséis células de la línea germinal y se encuentra adyacente a la región con los quistes de ocho células. Cada quiste de esta población aumenta de tamaño y no fue posible que las 16 células estuvieran incluidas en un corte semifino (figura 6e). Sin embargo, para la asignación de un número de 16 células a esta población de quistes se realizaron las siguientes interpretaciones: 1) por su localización adyacente a los quistes de ocho células, 2) se observan más de ocho y 3) los quistes siempre poseen un número de células del orden de 2^n donde en este caso $n = 4$, ya que este es el número de divisiones que han sucedido en la línea germinal para constituir esta población. Los núcleos de estas células han reducido su tamaño con respecto a las anteriores y varios agregados de material compacto se distribuyen en el nucleoplasma. Dentro de los quistes, al menos dos fusomas se pudieron observar asociando a las células en dos rosetas (figura 6e).

Los quistes constituidos por treinta y dos células constituyen la población que se encontró adyacente a los de dieciséis células (figura 6f). En lo que se refiere a las características celulares de esta población, existe una disminución en el tamaño nuclear y cambios en la disposición de los componentes nucleares. De hecho, dependiendo de la disposición de la cromatina dentro de los núcleos se reconocen tres sub-poblaciones de quistes de treinta y dos células. Cada sub-población de quistes ocupa una región propia (figura 7a); por lo que muy probablemente cada sub-población represente una diferente etapa en el desarrollo de esta población de quistes.

La primera sub-población, se localiza más hacia el ápice del folículo, por tanto quizás sea la más inicial en el desarrollo de esta población de quistes de treinta y dos células. La heterocromatina de los núcleos de estas células se encuentra en posición característica hacia la periferia nuclear. Además poseen cromatina laxa distribuida en motas en el nucleoplasma (figura 7b).

De manera adyacente a la sub-población anterior hay una segunda sub-población de quistes con treinta y dos células (ver figura 7a). La heterocromatina en los núcleos de esta sub-población constituye cuerpos irregulares adosados a la envoltura nuclear (figura 8a). Estos cuerpos suelen tener continuidades con heterocromatina de menor compactación que se extiende atravesando el nucleoplasma o puede estar interconectando a los cuerpos de heterocromatina. El nucleoplasma se presenta pobremente teñido salvo en la heterocromatina ya mencionada, inclusive grandes áreas de éste son muy transparentes a la luz del microscopio. En algunas ocasiones el nucleolo se observa muy cercano a alguno de los cuerpos de heterocromatina.

La tercera sub-población de quistes con treinta y dos células se encuentra más alejada de la región apical en comparación con las otras dos. Estas células poseen cuerpos de heterocromatina en sus núcleos que, a diferencia de los de la sub-población anterior, no presentan proyecciones de material hacia el nucleoplasma, es decir, constituyen cuerpos muy bien definidos adosados a la envoltura nuclear (figura 8b). Además, la mayor parte de los cuerpos de heterocromatina contienen en su porción media una zona clara o ausencia de heterocromatina que se extiende en la longitud mayor de los cuerpos (figura 8b, recuadro). El nucleoplasma de estas células se presenta pobremente teñido y se llegaron a observar nucleolos.

Si continuamos en el sentido del ápice del folículo hacia el conducto deferente, la siguiente población que se evidencia es la de quistes que superan en tamaño a los quistes de la población anterior y posee un patrón distinto de menor coloración celular cuando se tiñen con azul de toluidina. Este aumento en tamaño de los quistes se está dado por el incremento en el número de células germinales contenidas y no por un aumento del tamaño celular de éstas. Entonces, si la cantidad de células ha aumentado y con base en la regla de 2^n para la constitución de los quistes, los de esta población

contienen sesenta y cuatro células de la línea germinal (figura 9a). De hecho, a nivel óptico, se pudo identificar a esta población como la de los espermatoцитos secundarios, ya que 1) la mayor parte de los quistes de esta población se observaron en fases de división celular avanzadas (metafase y anafase) y 2) en las divisiones celulares, el número de cromosomas contenidos en las placas metafásicas fue menor (figura 9a) que el que contenían las placas de los quistes de 4, 8 y 16 células (figuras 6d y 6f), es decir, la ploidía se ha reducido.

Una vez que se reconoció la población quística de espermatoцитos secundarios fue posible, a nivel de la microscopia óptica, hacer la distinción entre tipos celulares de la línea espermatogénica a las poblaciones de quistes anteriormente descritas. De esta manera, las poblaciones de quistes de dos, cuatro, ocho y dieciséis células germinales pueden ser distinguidas como las de espermatogonias y en lo que respecta a las subpoblaciones de quistes con treinta y dos células que corresponden a las de espermatoцитos primarios. Las poblaciones de espermatoцитos secundarios corresponden a aquellas que se observan con la ploidía reducida, anteriormente descritas. Y las poblaciones de quistes que claramente se observaron en fases de espermiogénesis, resulta fácil reconocerlas como las poblaciones de espermátidas y espermatozoides.

En la porción cercana al conducto deferente se encontró una última población de quistes que constituyen la de espermátidas y espermatozoides, en la cual se determinó que poseen 128 células espermáticas (figura 9b). En las espermátidas iniciales, el núcleo presentó una gran disminución en su tamaño y compactación de su cromatina. Los quistes de esta misma población que se encontraron más cercanos al conducto deferente, contenían células espermáticas muy alargadas y delgadas que reflejan una espermiogénesis muy avanzada o bien pudieran ya constituir los espermatozoides maduros. Cabe mencionar que la abundancia de esta población fue mayor en los folículos de testículos extraídos de pupas que en los de las larvas.

Figura 6

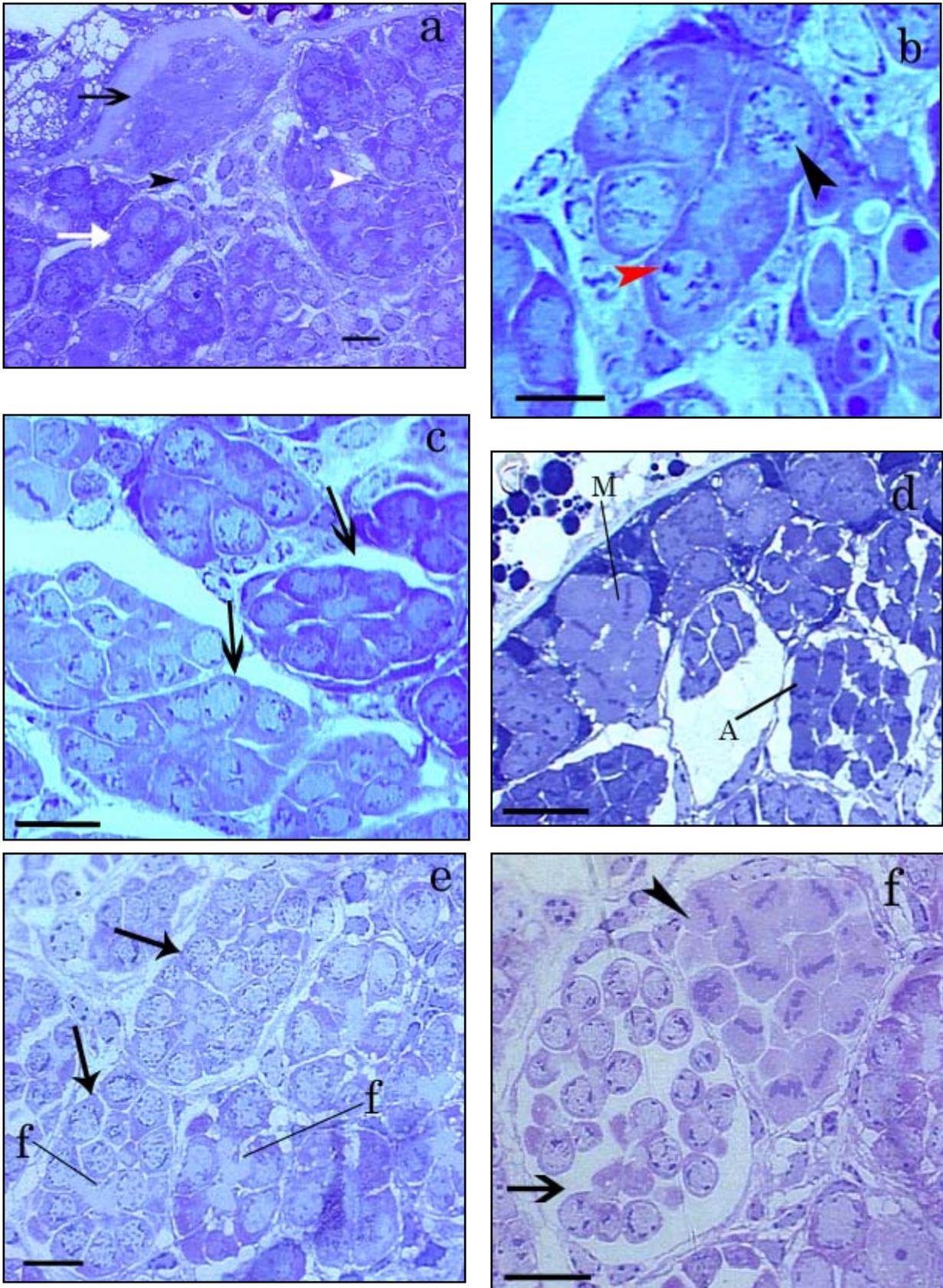


Figura 6

- a. Micrografía óptica de la porción apical de un folículo testicular del gusano de la harina. Todos los folículos testiculares presentaban un botón de células apicales alargadas (flecha negra) por debajo de éste se muestran células somáticas y células germinales primordiales (punta de flecha negra). Las células de la línea germinal se encuentran envueltas por células somáticas alargadas para constituir los quistes (punta de flecha blanca). Se asignó como primera población de quistes a los que contenían dos o cuatro células germinales (flecha blanca). Tinción con azul de toluidina; la barra de calibración representa 18 μm .
- b. Micrografía óptica de un quiste de cuatro células. Los núcleos de estas células fueron los más grandes de la serie espermatogénica (entre 7 y 8 μm aproximadamente) y presentaban cuerpos de heterocromatina (punta de flecha roja) y nucleolos (punta de flecha negra). Típicamente el nucleoplasma se observó muy poco teñido con el colorante azul de toluidina. La barra de calibración representa 8 μm .
- c. Micrografía óptica donde se observan quistes de la población que posee ocho células germinales (flechas). La disposición que muestran las células germinales dentro del folículo es en roseta y sus núcleos presentan características muy parecidas a los de la población de cuatro células. Tinción con azul de toluidina; barra de calibración que representa 10 μm .
- d. Micrografía óptica donde se observan fases de división celular como son la metafase (M) y anafase (A). De manera recurrente, la región apical de los folículos presentó fases de división celular. Tinción con azul de toluidina; barra de calibración que representa 10 μm .
- e. Micrografía óptica de la población de quistes con dieciséis células germinales (flechas). El corte semifino no contiene a las dieciséis células germinales, sin embargo, dada su posición en el folículo resulta fácil reconocerlas como una población de quistes con este número de células. (f) fusoma. Tinción con azul de toluidina; la barra de calibración representa 10 μm .
- f. En esta micrografía óptica se observa que los quistes de treinta y dos células (flecha) están localizados de manera adyacente a los de la población de dieciséis células (punta de flecha) que inclusive se encuentran en fases de división para generar los quistes de treinta y dos células. Tinción con azul de toluidina; barra de calibración que representa 12 μm .

Figura 7

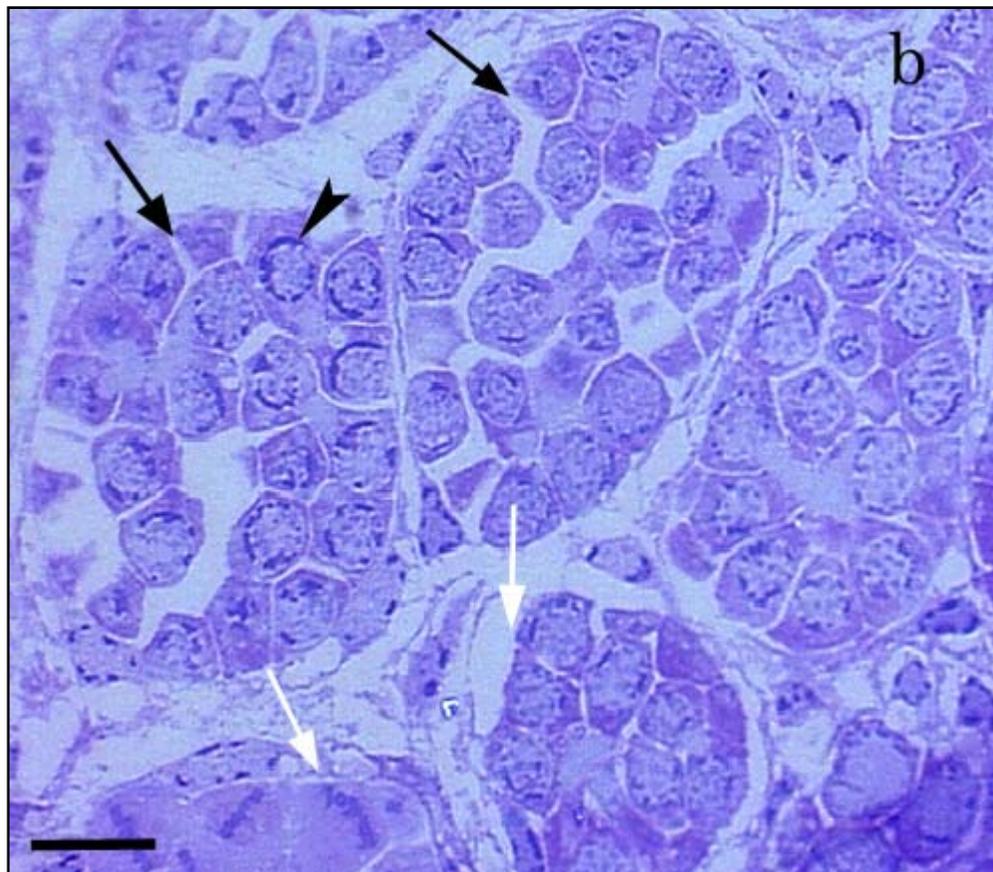
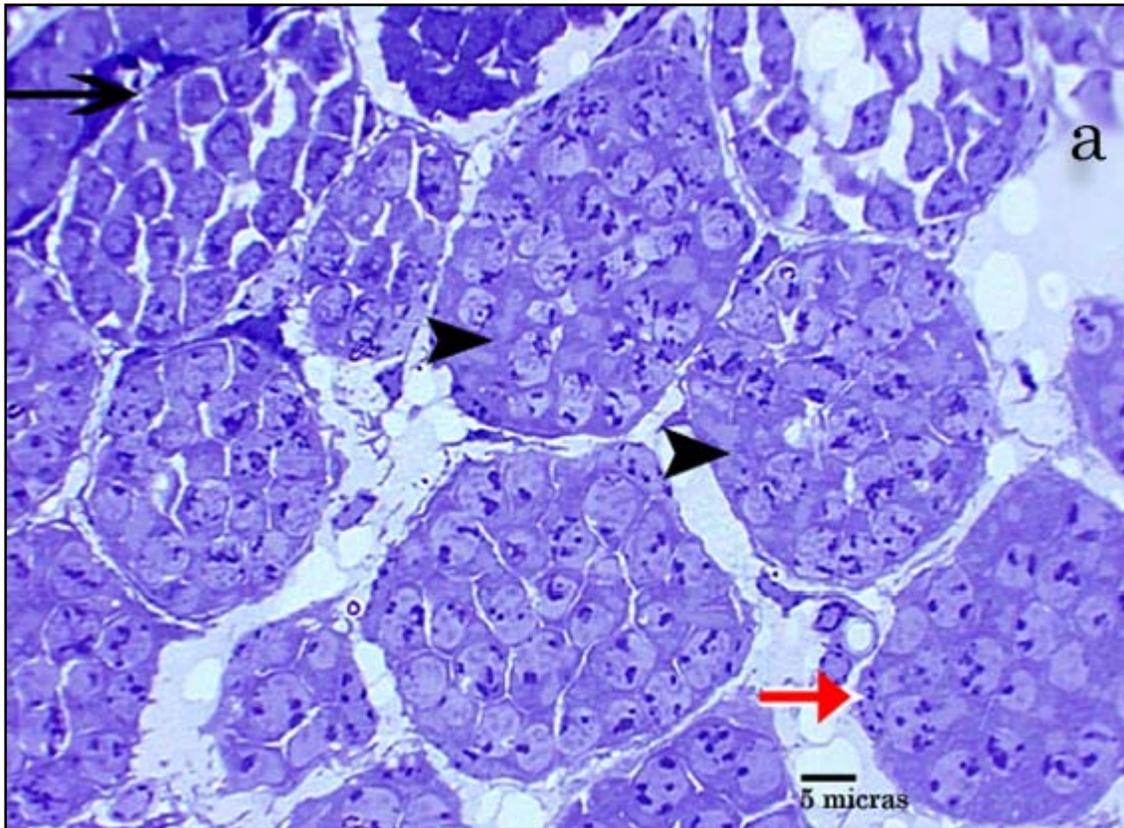


Figura 7

- a. Micrografía óptica donde se observan, de manera contigua, las tres sub- poblaciones de quistes de treinta y dos células. El ángulo superior izquierdo de la micrografía se encuentra más cercano al extremo apical del folículo, mientras que el ángulo inferior derecho están más hacia el tubo deferente. La sub- población de quistes que se encuentra hacia el ápice representa la más inicial en el desarrollo (flecha negra). Cercana a ésta, se evidencia una segunda sub- población de quistes (puntas de flechas); y por último, la tercera sub- población (flecha roja) se ubica relativamente más cercana al tubo deferente en comparación con la primera sub- población. Tinción con azul de Toluidina. La barra de calibración representa 5 μm .

- b. Micrografía óptica de quistes de la primera sub- población de 32 células (flechas negras). La heterocromatina de sus núcleos típicamente posee una distribución en la envoltura nuclear (punta de flecha) y motas de heterocromatina de menor compactación en el nucleoplasma. Abajo se observa la contigüidad de esta sub- población con la población de quistes de dieciséis células (región más hacia el ápice; flechas blancas). La barra de calibración representa 10 μm .

Figura 8

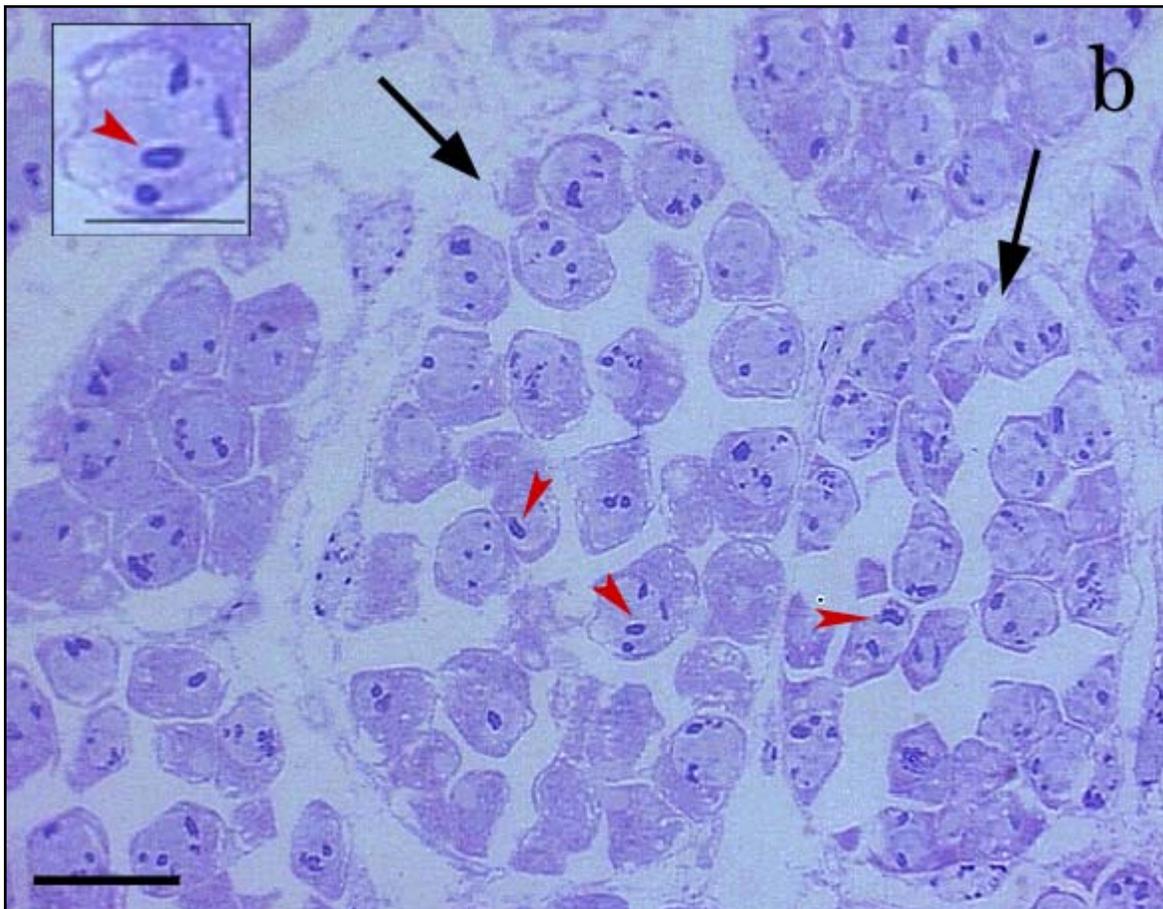
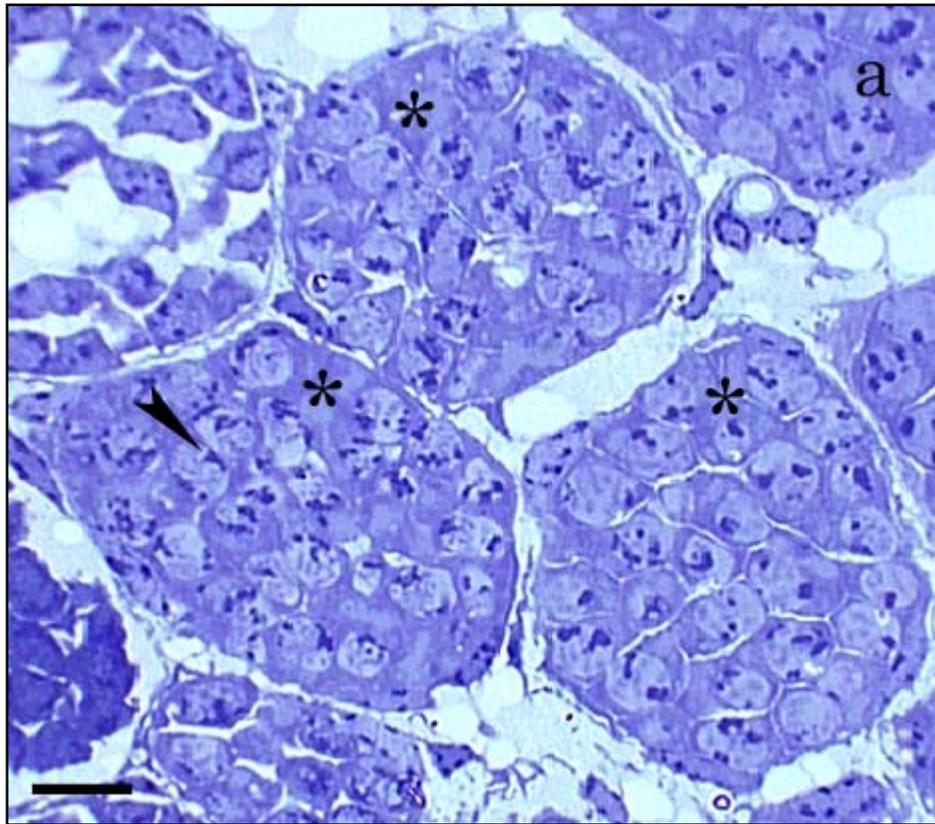
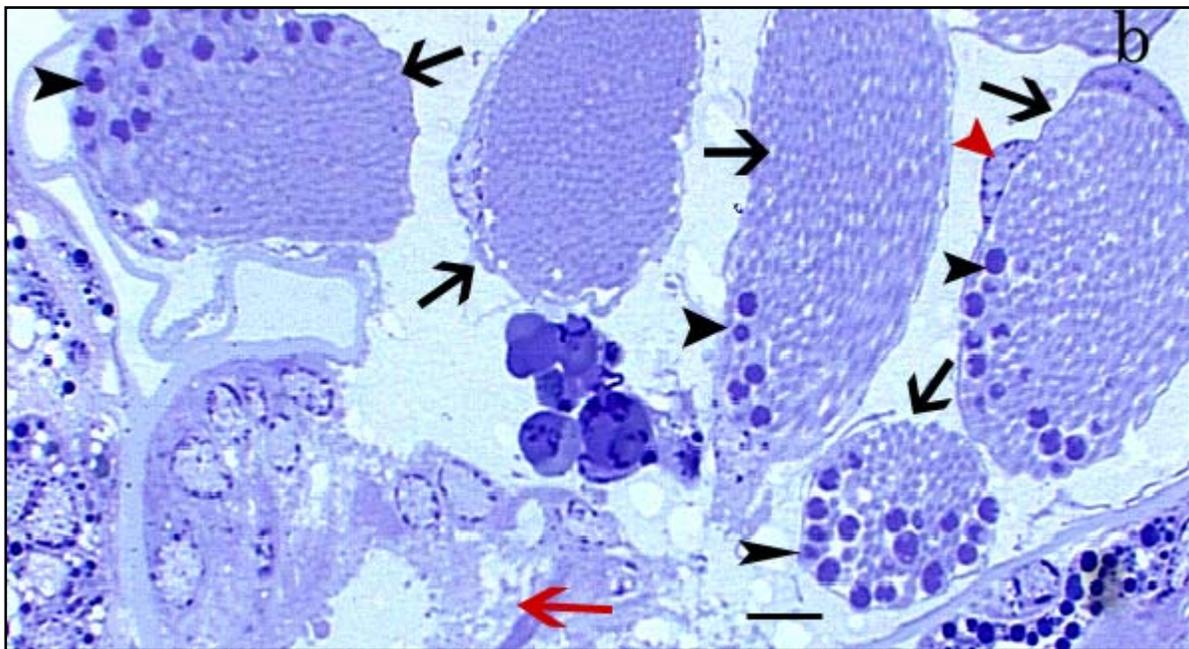
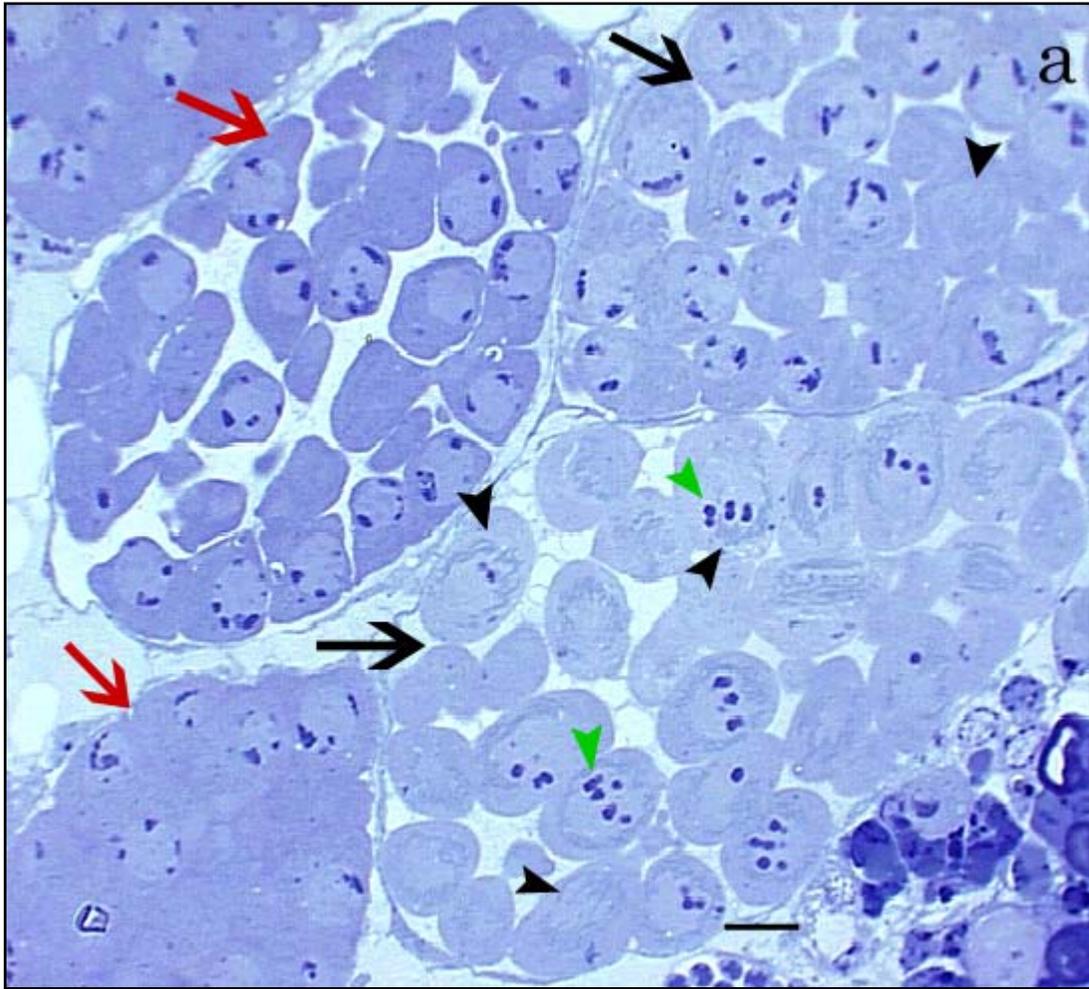


Figura 9



6.2 Análisis ultraestructural de la profase meiótica en *T. molitor*

Una vez que, al nivel de la microscopia óptica, se identificaron los quistes de espermatocitos primarios, se procedió al análisis ultraestructural de éstos. Para ello, se disecaron solamente testículos de larvas y se procesaron para su análisis al nivel de la microscopia electrónica de transmisión (ver material y métodos).

Los espermatocitos primarios de la primera sub- población (con la cromatina periférica) presentan un núcleo que, cuando se observa con el contraste general de acetato de uranilo y citrato de plomo (Ur- Pb), contienen cuerpos de heterocromatina adosados a la envoltura nuclear y cromatina laxa esparcida a través del nucleoplasma (figura 10). Los núcleos de espermatocitos de la primera sub- población presentan la mayor cantidad de cromatina laxa a diferencia de las demás sub- poblaciones. La cromatina laxa en estos núcleos posee un arreglo tal que se observan numerosos filamentos extendiéndose a través del nucleoplasma y algunos salen de los cuerpos de heterocromatina. Esta constitución del núcleo muy probablemente corresponde a una etapa muy inicial de la profase meiótica I, tal como el *pre- leptoteno*.

En el nucleoplasma de estos espermatocitos pre- leptoténicos, de manera característica, se observan estructuras filamentosas del tipo micro-plumuladas constituidas por un delgado eje o filamento axial del cual se proyectan perpendicularmente pequeños filamentos que podrían corresponder a asas de cromatina (figura 11). Los extremos de estas estructuras micro-plumuladas pueden llegar a presentar un anclaje a la envoltura nuclear o bien extenderse a partir de los cuerpos de heterocromatina.

Para corroborar si la constitución de las estructuras micro- plumuladas corresponde a cromatina laxa, núcleos de etapas meióticas iniciales se contrastaron con la técnica de amina de osmio específica para ADN. Cuando se analizaron en el microscopio electrónico, las estructuras micro- plumuladas mostraron afinidad por la amina de osmio tanto en su filamento axial como en sus asas radiales (figura 12a)

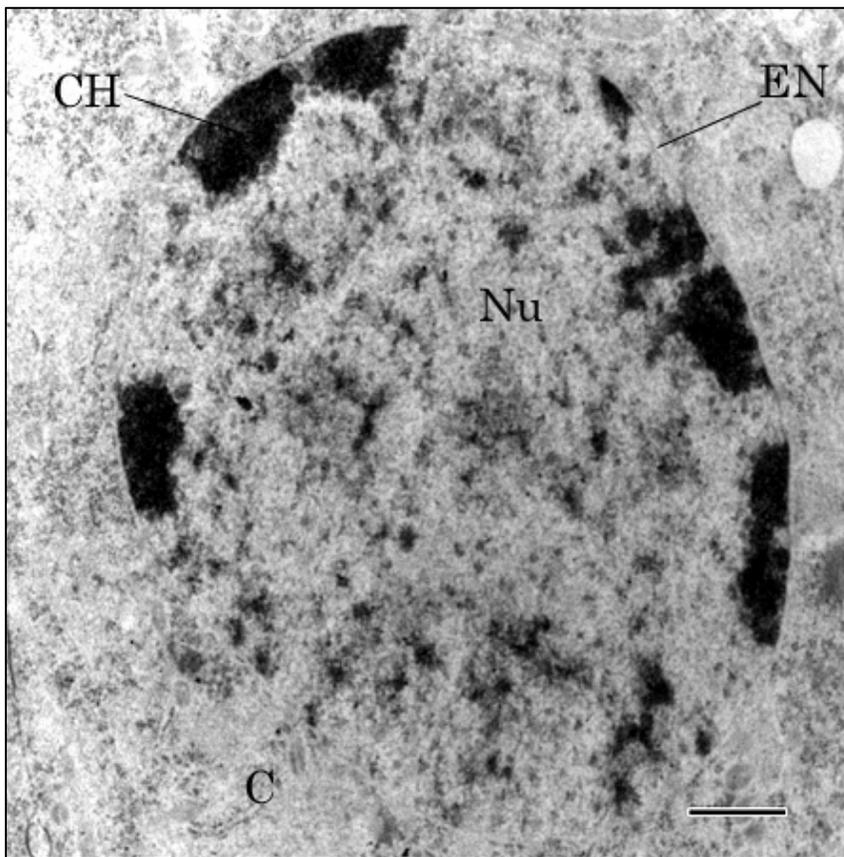


Figura 10. Contraste de Ur-Pb. Micrografía electrónica de espermatocito primario en pre-leptoteno. Los cuerpos de heterocromatina (CH) se encuentran adosados a la envoltura nuclear (EN). El nucleoplasma está ocupado por cromatina laxa que puede constituir filamentos que se extienden a lo largo del núcleo (Nu). (C) citoplasma. Barra 500 nanómetros (nm).

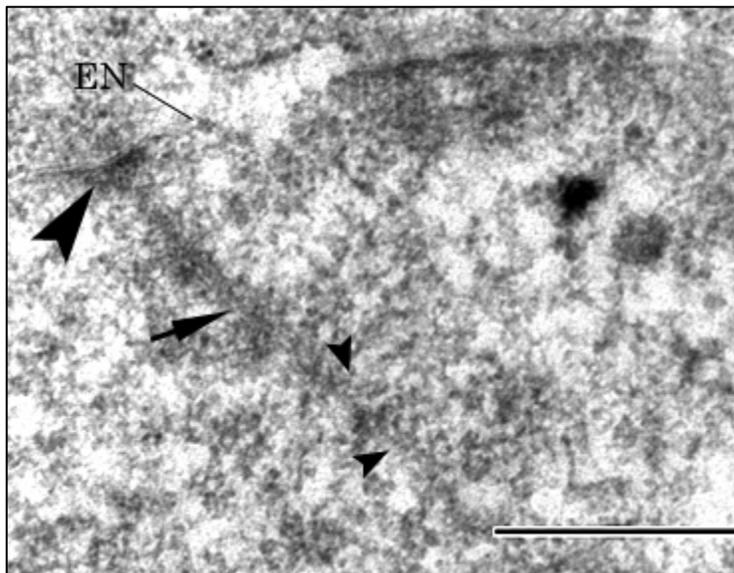


Figura 11. Contraste de Ur-Pb. Porción de un núcleo en pre-leptoteno. Estructuras filamentosas del tipo micro-plumuladas. Estas estructuras están constituidas por un eje principal o filamento axial (flecha) del cual se extienden varios filamentos o posiblemente asas de cromatina (puntas de flechas); la punta de flecha grande señala el adosamiento a la envoltura nuclear (EN) de esta estructura. Barra 500 nm.

Cuando los cortes ultrafinos de núcleos que contienen estructuras micro-plumuladas se contrastan con la técnica de EDTA para evidenciar preferencialmente las ribonucleoproteínas (RNPs), los cuerpos de heterocromatina se observan tenuemente teñidos, así como el resto de la cromatina. Por el contrario, las estructuras micro-plumuladas presentan un refuerzo de RNPs principalmente en su delgado eje; las asas

de cromatina con ligera marca de RNPs (figura 12b). Por tanto, los espermaticitos primarios en posible etapa pre-leptotónica presentan, además de cuerpos de heterocromatina y nucleolo, estructuras del tipo micro-plumuladas. El eje de dichas estructuras se encuentra constituido por cromatina y ribonucleoproteínas así como las asas de cromatina radiales.

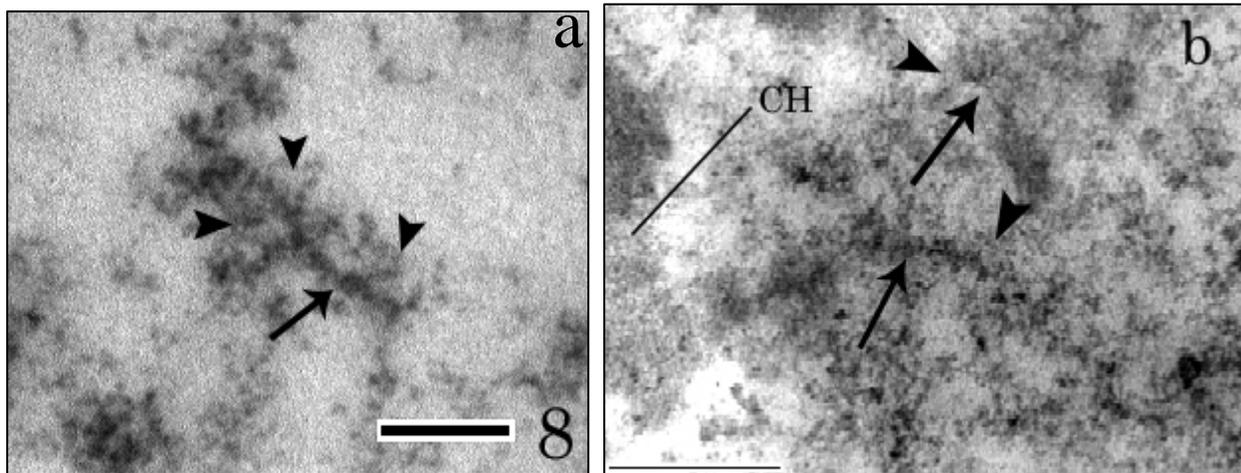


Figura 12. Las estructuras micro- plumuladas que aparecen desde los núcleos pre-leptotónicos se encuentran constituidas por ADN y ARN. **a)** Tanto el filamento axial de éstas (flecha) como las asas perpendiculares (puntas de flechas) se encuentran contrastadas con la **amina de osmio** específica para ADN. Barra **100 nm**. **b)** Contraste de **EDTA**. Porción de núcleos pre-leptotónicos con tinción preferencial para RNPs. En los ejes y asas radiales de las estructuras micro-plumuladas se observa presencia de RNPs (flechas); cuerpo de heterocromatina (CH). Barra de **500 nm**.

Los cuerpos de heterocromatina de núcleos en posible etapa de leptoteno presentaron un aumento de tamaño y un grado mayor de compactación de la heterocromatina con respecto a los núcleos pre-leptotónicos anteriores. En el nucleoplasma, la cromatina laxa comienza a organizarse en grumos pequeños de heterocromatina. Ninguna estructura de la profase meiótica I fue observada, tal como ejes cromosómicos o complejos sinaptonémicos. Para esta etapa, las estructuras micro-plumuladas se encontraron alineadas. Dicho alineamiento conserva una relación simétrica entre el par de micro-plumulados, por ejemplo, donde un micro-plumulado presenta una estructuración filamentosa el otro micro-plumulado también la tiene y ambas regiones similares se encuentran enfrentadas una con la otra (figura. 13).

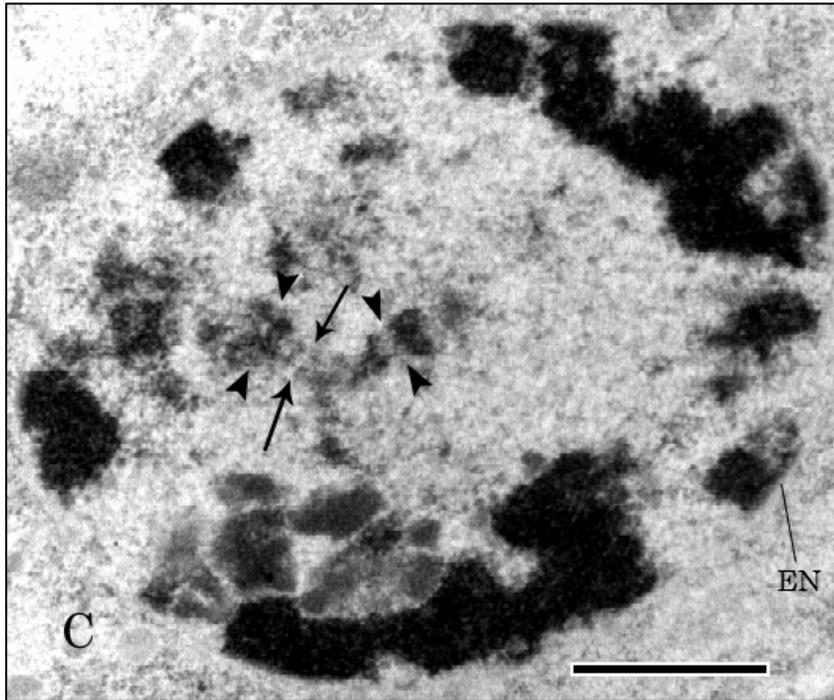


Figura 13. Contraste de Ur- Pb. Espermatocito en leptoteno donde se observan las estructuras microplumuladas alineadas. En su longitud, las estructuras microplumuladas (flechas) se enfrentan una con otra en regiones estructurales muy semejantes a las dos (puntas de flechas). Existen aproximadamente unos 80 nm de separación entre éstas. Citoplasma (C); Envoltura nuclear (EN). Barra de 500 nm.

Para esta etapa de leptoteno, se observan alineamientos de unos 80 nm entre microplumulados (Figura 13) y en otros casos cerca de 200 nm o más de distancia entre ellos (Figura 14). Cuando estructuras microplumuladas alineadas se encuentran separadas por unos 100 nm de distancia, este alineamiento constituye una estructura que asemeja una escalerilla de mano de doble cuerda (figura 14) similares a las anteriormente descritas en cobayo por Vázquez Nin y colaboradores (2003).

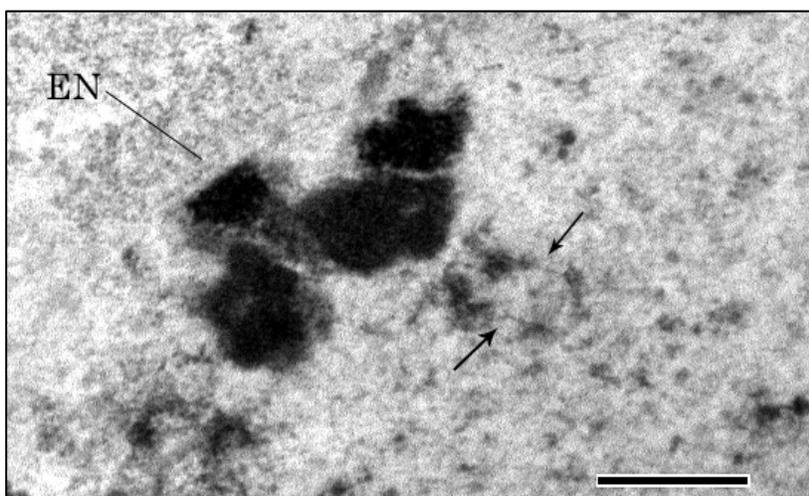


Figura 14. Contraste de Ur- Pb. Micrografía electrónica de espermatocito primario en leptoteno. En ésta se observa el alineamiento entre estructuras microplumuladas (flechas), nótese que la distancia entre éstas es de aproximadamente unos 250 nm. Envoltura nuclear (EN). Barra de 500 nm.

Cuando se contrastó específicamente el ADN, los microplumulados en alineamientos estrechos (100 nm aproximadamente) contenían a este ácido nucleico en la longitud de

sus ejes. En el espacio de alineamiento se presentaron finas asas constituidas de igual manera por el ADN (figura 15). En lo que respecta a las ribonucleoproteínas, éstas se encontraron distribuidas tanto en los ejes de los micro-plumulados como el espacio de alineamiento (figura 16).

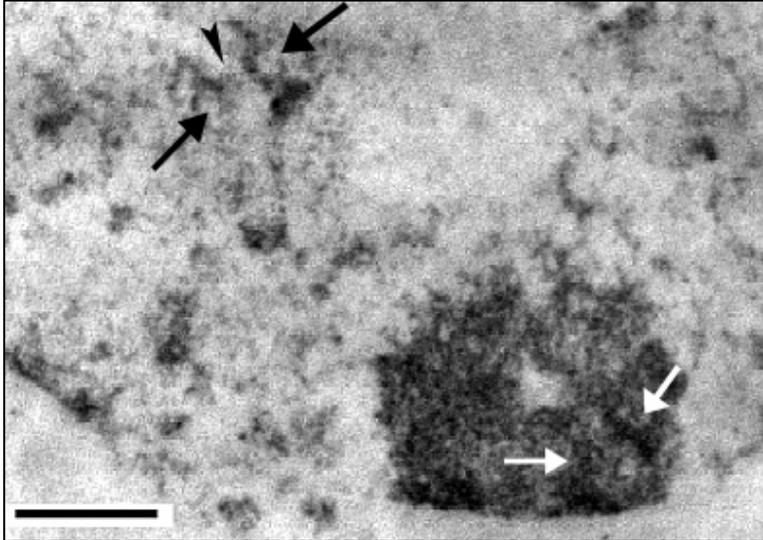


Figura 15. Contraste con amina de osmio. Micrografía electrónica que muestra la porción de un núcleo de espermatocito primario en leptoteno. Los micro-plumulados alienados a unos 100 nm de distancia (flechas negras y blancas) presentan finas asas de cromatina hacia el espacio de alineamiento (punta de flecha negra). Barra de 500 nm.

Como ya se ha mencionado, los alineamientos entre estructuras micro-plumuladas, se observan como escalerillas de mano de doble cuerda, que en cortes ultrafinos aislados difícilmente rebasaban una un micrómetro de longitud. Para conocer la distribución espacial y la longitud de estas estructuras micro-plumuladas a través de los núcleos, se realizaron cortes seriados de espermatocitos primarios en etapa de leptoteno.

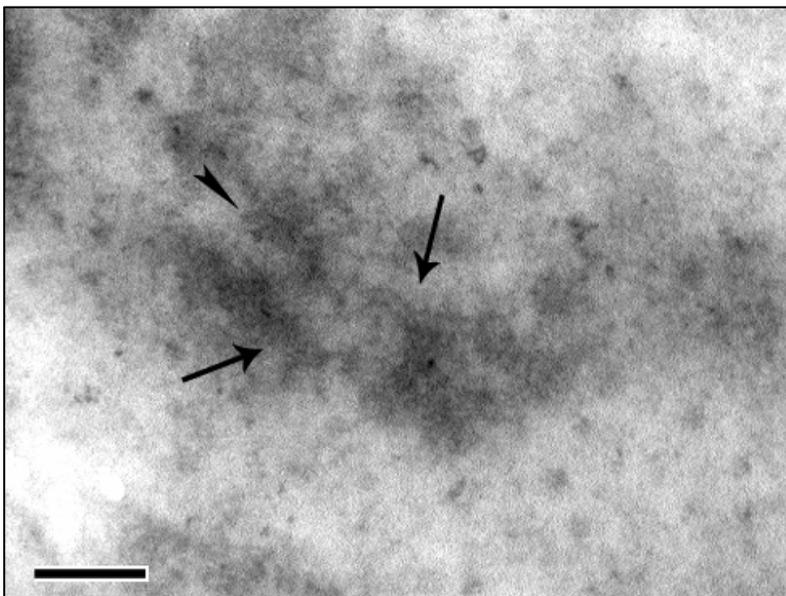


Figura 16. Contraste de EDTA. En los alineamientos estrechos, las RNPs tuvieron una distribución tanto en los ejes de los micro-plumulados (flechas) como en el espacio entre los micro-plumulados (punta de flecha), posiblemente en las asas de éstos. Barra de 500 nm.

Gracias a los 17 cortes seriados, se pudo distinguir un alineamiento en escalerilla de doble cuerda en cinco cortes consecutivos (serie 1, figuras 17 y 18). En el corte 1, el alineamiento se observa entre dos pequeños cúmulos de heterocromatina en el nucleoplasma (figura 17a). Para el corte 2, se nota que estas porciones de heterocromatina se continúan con dos aparentes estructuras micro-plumuladas que poseen algo de material compacto (figura 17 b). El alineamiento es muy evidente en el corte 3, ya que los micro-plumulados que participan en éste se distinguen de mayor longitud, además de que presentan cierto nivel de simetría en su arreglo macromolecular (figura 17c). En el corte 4 no se detectó ninguna continuidad discernible de éste alineamiento (figura 18a) y para el corte 5, se presentó un alineamiento entre estructuras plumuladas y ambas poseen un anclaje a la envoltura nuclear (figura 18b). Sin embargo, no se observó alguna continuidad clara entre el alineamiento en el nucleoplasma de los primeros cortes y el adosado a la envoltura nuclear del corte 5. Esto último muy probablemente indique que alineamientos entre estructuras micro-plumuladas pueden iniciarse tanto en los extremos de los micro-plumulados como en las porciones medias de éstos. Además el alineamiento puede extenderse por longitudes mayores al radio nuclear (figuras 17 y 18).

Figura 17

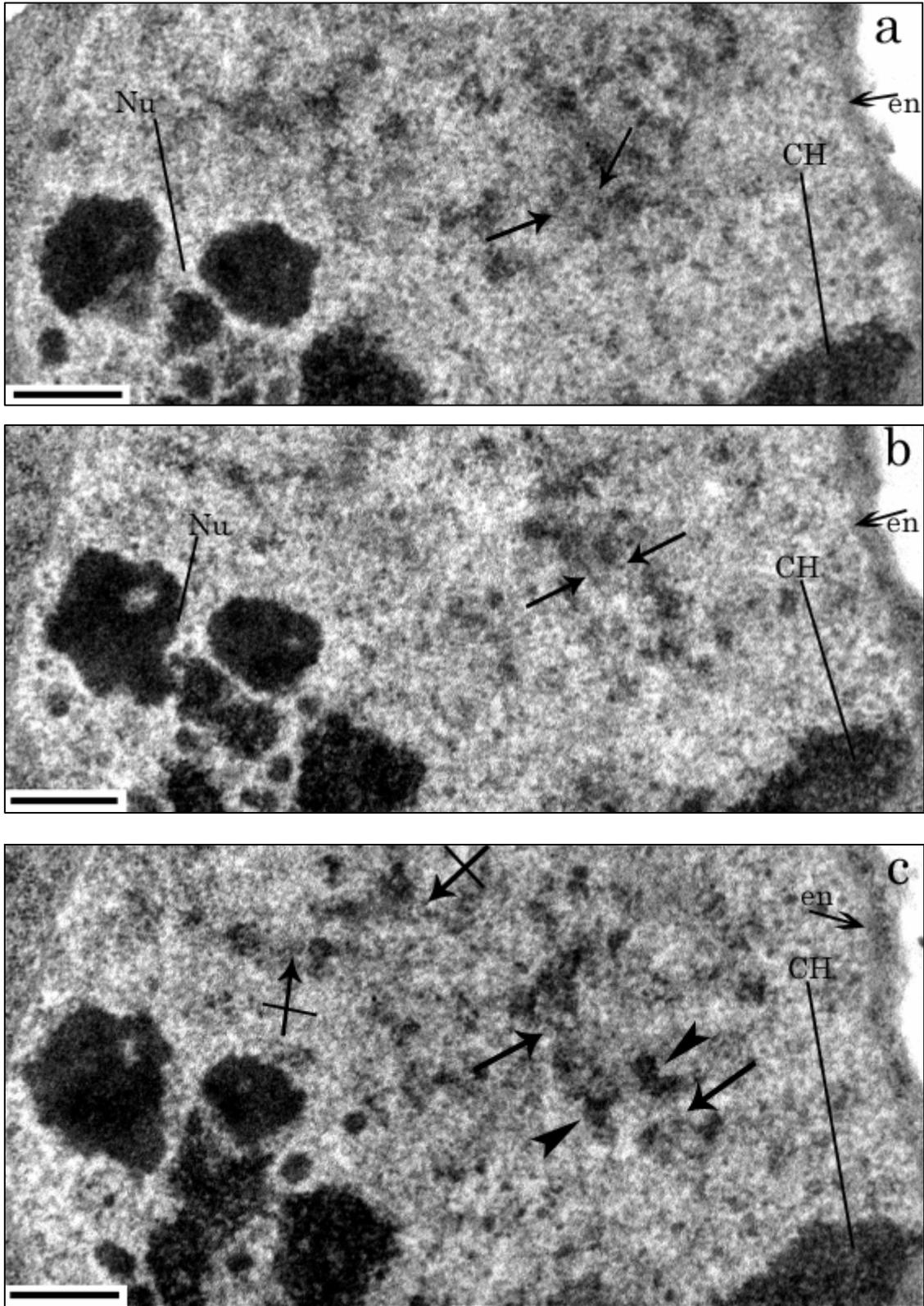


Figura 17

Serie 1: Micrografías electrónicas de los cortes 1 a 6. Núcleo de espermatocito en posible etapa de leptoteno. Contraste de Ur—Pb, aumento de 20,000x, barra de 500 nm en todos los cortes.

- a. En el nucleoplasma se observan varios cúmulos pequeños de heterocromatina que inclusive pueden encontrarse alineados (flechas). Cuerpo de heterocromatina (CH); envoltura nuclear (en); nucleolo (nu).

- b. Los pequeños cúmulos de heterocromatina del corte anterior ahora se observan como delgados filamentos alineados (flechas). Entre ambos filamentos hay unos 100 nm de distancia. Cuerpo de heterocromatina (CH); envoltura nuclear (en); nucleolo (nu).

- c. Los filamentos de cromatina se extienden por más de un micrómetro en alineamiento a través del nucleoplasma (flechas) constituyendo una escalerilla de doble cuerda. Se observa una correspondencia estructural simétrica entre un filamento y el otro, sobre todo en las zonas donde éstos poseen cúmulos de heterocromatina (puntas de flechas). En posible continuación con este alineamiento se encuentra otro par de estructuras filamentosas alineadas (flechas cruzadas), sin embargo, la continuidad entre los alineamientos no es muy conspicua. Cuerpo de heterocromatina (CH); envoltura nuclear (en).

Figura 18

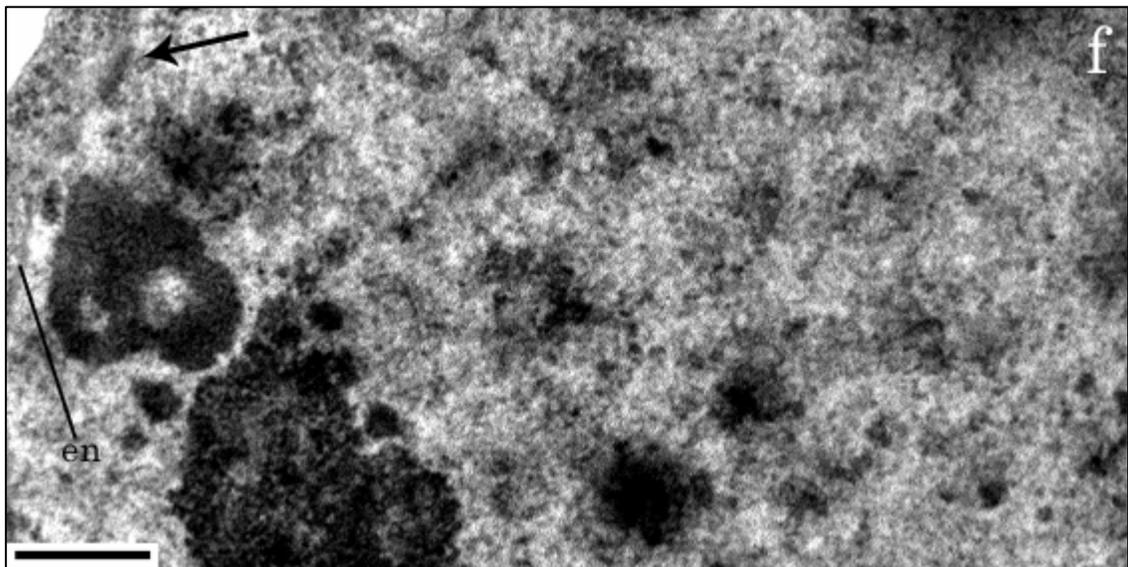
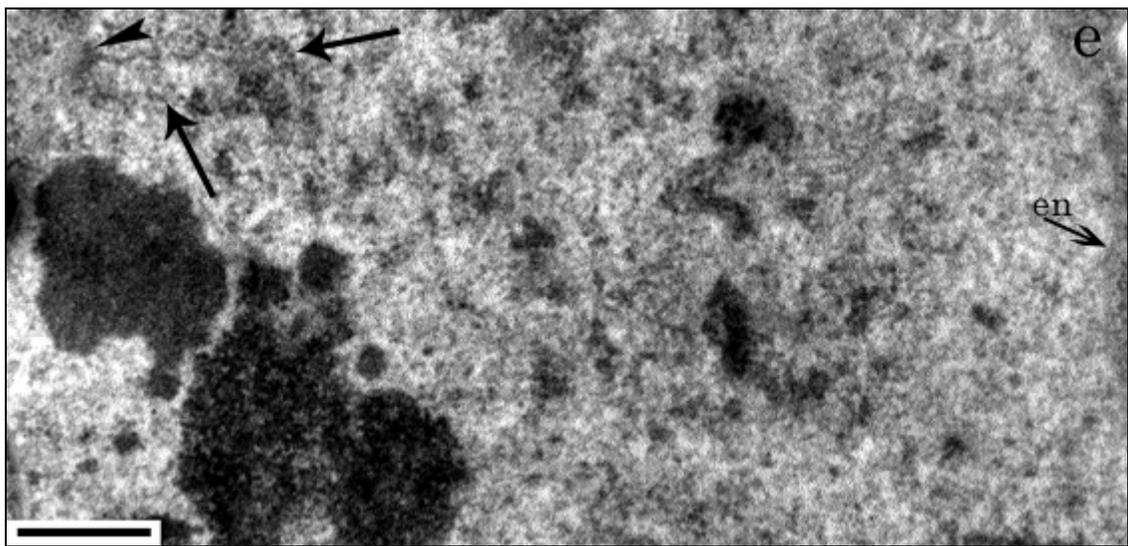
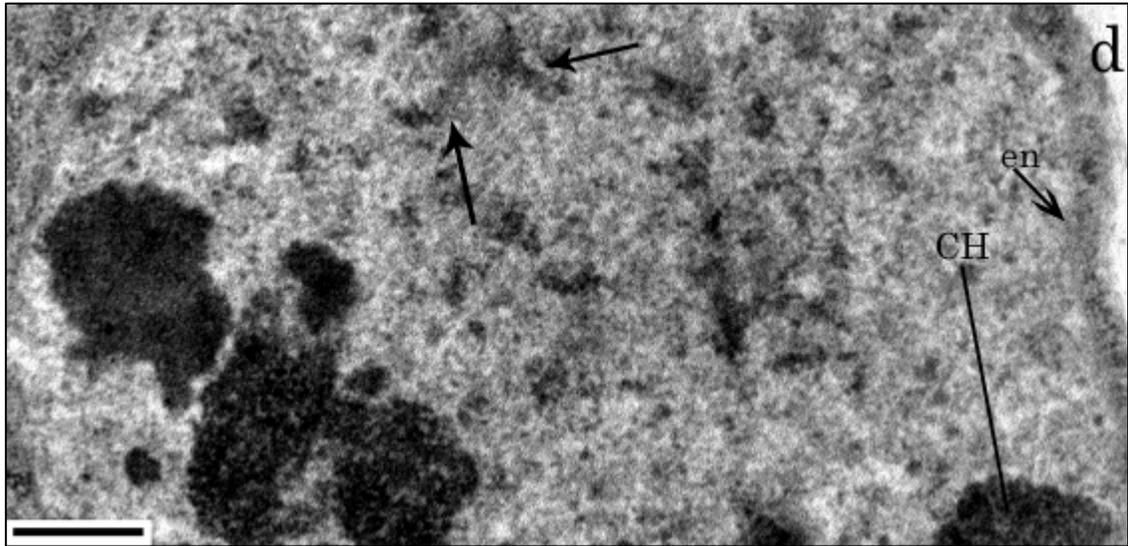


Figura 18

- a. No se observa alguna estructura que pudiera tener relación con el alineamiento mostrado en los cortes anteriores, salvo algunos cúmulos de heterocromatina (flechas) presentes en la región donde se esperaría que continuara el alineamiento. Cuerpo de heterocromatina (CH); envoltura nuclear (en).

- b. Un par de estructuras filamentosas (flechas) se encuentran alineadas y presentan cierto adosamiento de heterocromatina (punta de flecha) a la envoltura nuclear (en). Existe poco más de 100 nm entre un filamento y otro.

- c. Del alineamiento presente en el corte anterior solo se observa la placa de adhesión (flecha) a la envoltura nuclear (en) de las estructuras micro- plumuladas.

La transición de la etapa de leptoteno hacia la de cigoteno se observa cuando las estructuras micro-plumuladas, ya sea en escalerilla de doble cuerda o aisladas, presentar continuidad con estructuras alargadas con mayor orden de estructuración de su cromatina (figura 19a). Dichas estructuras muy probablemente corresponden a los ejes cromosómicos en formación y futuros elementos laterales del complejo sinaptonémico (figura 19b). Ningún arreglo espacial de estos ejes cromosómicos, tal como el de bouquet, típico de la transición del leptoteno al cigoteno (Zickler y Klecner, 1998), fue evidente en los núcleos de espermatocitos en esta transición de leptoteno a cigoteno, aunque no se descarta su presencia.

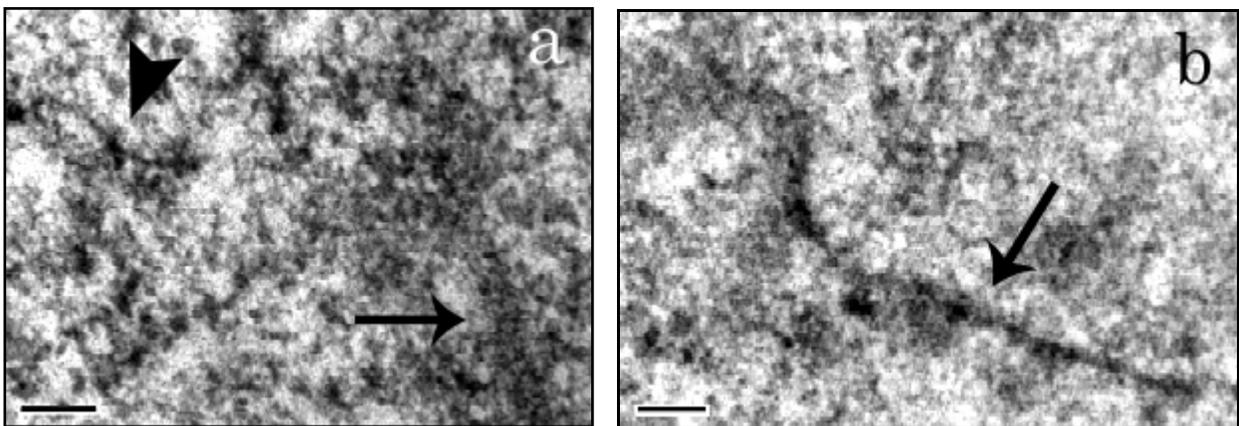


Figura 19. Contraste de Ur—Pb. Los ejes cromosómicos de espermatocitos primarios se presentan como estructuras alargadas de mayor densidad que los micro-plumulados. a) Porción de un núcleo cigoténico donde se observa la continuidad de una estructura micro-plumulada (punta de flecha) con un eje cromosómico (flecha). b) la flecha señala un eje cromosómico que se extiende a través del nucleoplasma. Barra de 100 nm.

En los espermatocitos cigoténicos, los ejes cromosómicos se observan como estructuras alargadas de cromatina pero de mayor densidad y volumen que los filamentos micro-plumulados. Los cuerpos de heterocromatina incrementan su tamaño (producto de la compactación continua que ocurre a través de la profase meiótica), además, tanto filamentos como ejes cromosómicos se observan proyectándose de los cuerpos de heterocromatina hacia el nucleoplasma (figura 20). Otra característica de la etapa de cigoteno es que los cuerpos de heterocromatina presentan zonas claras o de exclusión de la heterocromatina. Dichas zonas no alcanzan a atravesar a estos cuerpos de heterocromatina por completo (figura 21).

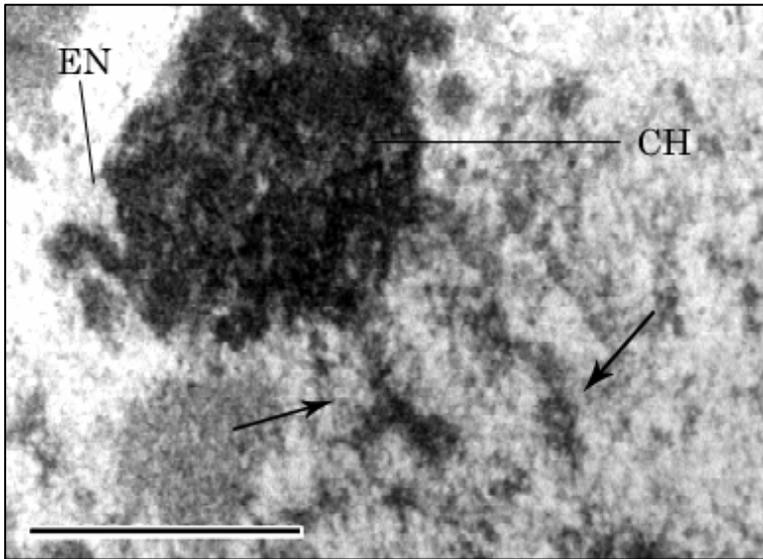


Figura 20. Contraste de Ur—Pb. Porción de un núcleo de espermatocito cigoténico donde se observa que los ejes cromosómicos (flechas) se extienden a partir de los cuerpos de heterocromatina (CH). EN envoltura nuclear. Barra de 500 nm.

Cuando los cortes ultrafinos de espermatocitos en aparente etapa de cigoteno se contrastan específicamente para ver el ADN, se observa que en los bordes de estos espacios de exclusión se extienden filamentos de cromatina que asemejan listones (figura 21). Dichos listones se encuentran compuestos por dos filamentos de cromatina que bien cada uno de éstos puede corresponder a una fracción de ADN de cada cromátida hermana por homólogo.

La sinapsis entre ejes cromosómicos, no se logró observar en alguna de las reconstrucciones tridimensionales, por tanto, la formación de CSs a partir de ejes cromosómicos en sinapsis no se llegó a observar. Sin embargo, en cortes ultrafinos aislados se llegan a evidenciar fragmentos de posibles ejes cromosómicos alineados y que tienen continuidad con aparentes estructuras micro- plumuladas (figura 22).

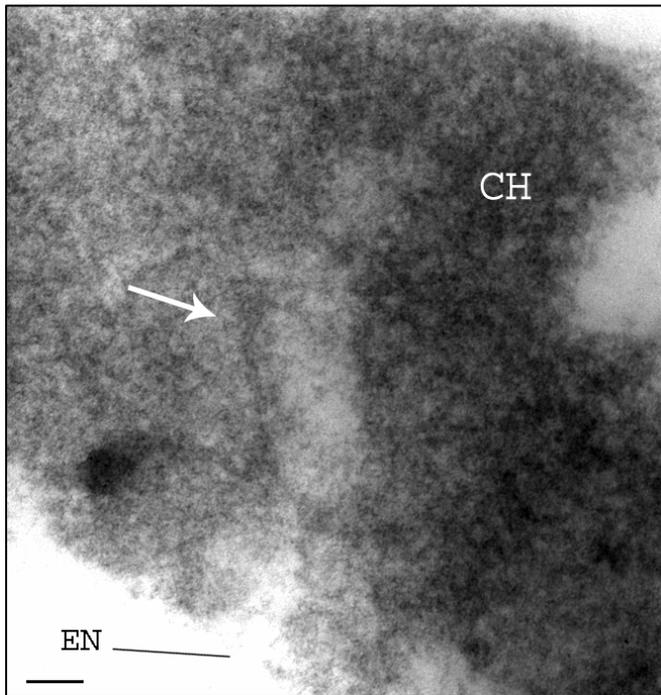


Figura 21. Amina de osmio. El espacio de exclusión de los cuerpos de heterocromatina (CH) en cigoteno presenta un listón de cromatina (flecha) a cada lado. Envoltura Nuclear (EN). Barra de 100 nm.

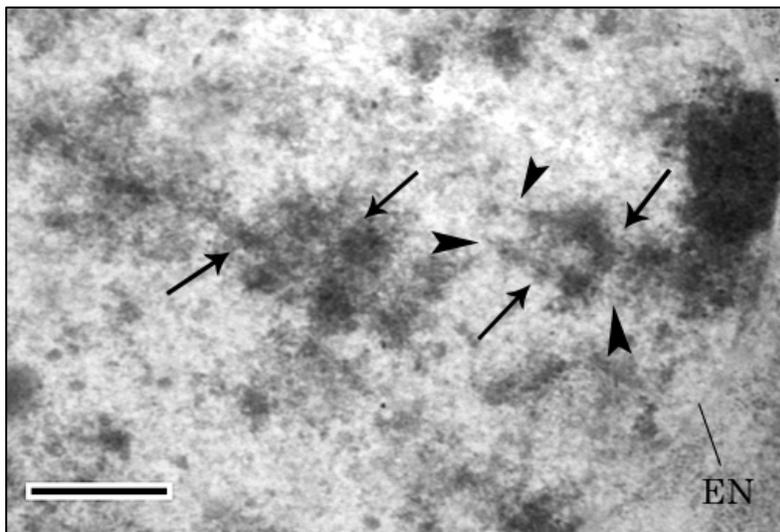


Figura 22. Ur—Pb. Alineamientos entre pares de ejes cromosómicos (flechas) en etapa de cigoteno. En las puntas de estos ejes cromosómicos se observa la continuidad que poseen éstos con estructuras filamentosas del tipo micro- plumuladas (puntas de flechas). EN envoltura nuclear; barra de 500 nm.

El análisis de las reconstrucciones tridimensionales de núcleos de espermatocitos en etapa de cigoteno avanzado revela que la formación del complejo sinaptonémico se inicia en, al menos, dos sitios diferentes. 1) En cortes consecutivos un fragmento de CS se presenta a través del nucleoplasma, es decir, la formación de éste es intersticial (figura 23 a-b). 2) O bien, el CS se comienza a constituir a partir de las regiones teloméricas ancladas a la envoltura nuclear. Ningún CS en formación presentó continuidad con ejes cromosómicos, pero en algunos casos los fragmentos de CS en

formación presentaron continuidad con estructuras delgadas del tipo micro- plumuladas (figura 23c).

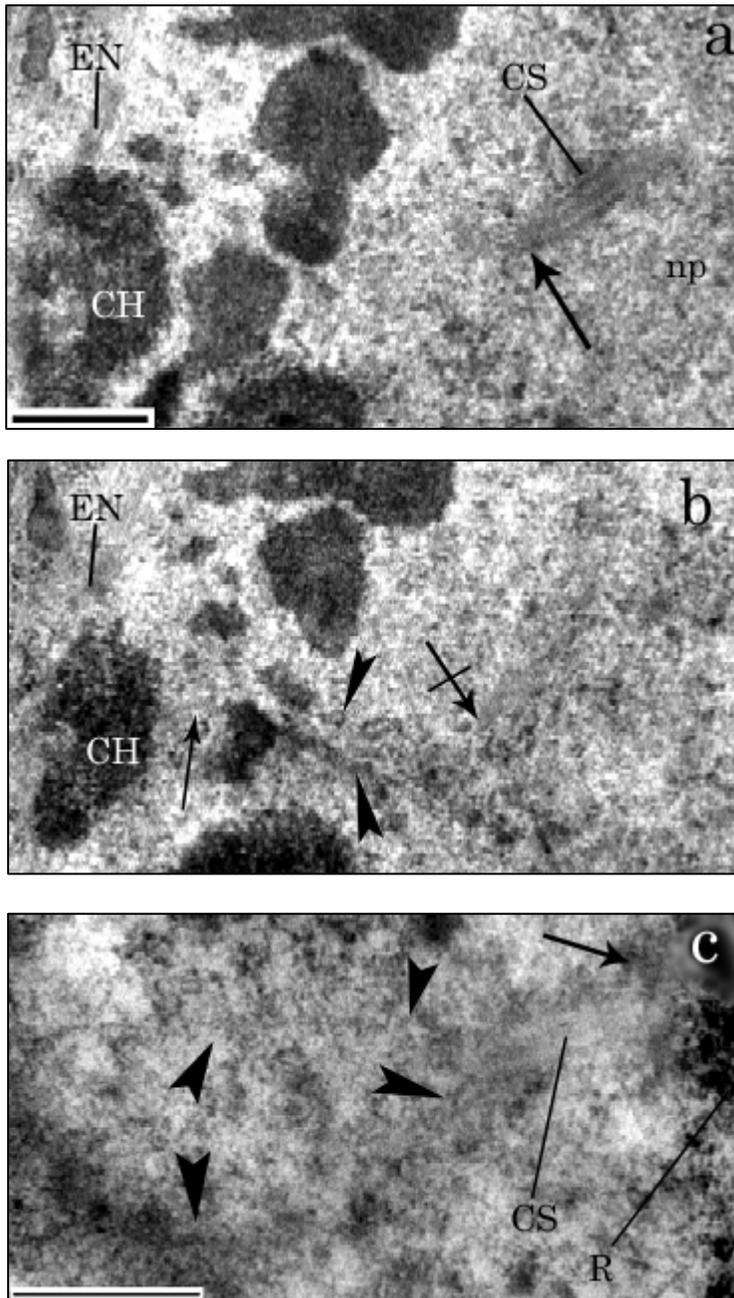


Figura 23. La formación del complejo sinaptonémico (CS) se observa a partir de estructuras micro- plumuladas. a y b son imágenes de cortes contiguos y con contraste de Ur—Pb. **a)** Un fragmento de CS menor a un micrómetro se observa en el nucleoplasma (NP), y en uno de sus extremos se observa la continuidad del elemento lateral con una estructura micro- plumulada (flecha). **b)** En continuidad con el CS del corte anterior se nota una zona de material fibrilar (flecha cruzada) que llega a constituir una escalerilla de doble cuerda (puntas de flecha) de estructuras micro- plumuladas (flecha), las cuales se continúan hacia un cuerpo de heterocromatina (CH). Envoltura nuclear (EN). **c)** Contraste de EDTA. Anclado a la envoltura nuclear (flecha) un CS en formación presenta continuidad con estructuras micro- plumuladas (puntas de flechas) que se extienden a través del nucleoplasma. Barras de 500 nm.

En la etapa de paquiteno, los complejos sinaptonémicos ya se encuentran constituidos en su totalidad y poseen una estructura tripartita bien definida, con dos elementos laterales flanqueando a un elemento central altamente organizado y de doble banda (figura 24). Filamentos transversos con una periodicidad constante están conectando a un elemento lateral con el otro (figura 24a). Los CSs poseen anclaje telomérico a la

envoltura nuclear en cada extremo y se extienden a través del nucleoplasma e inclusive atraviesan los cuerpos de heterocromatina a partir del espacio de exclusión formado en las etapas previas (figura 24b). En ciertas ocasiones se logró observar más de un complejo sinaptonémico atravesando un cuerpo de heterocromatina, lo que muy probablemente indique que algunos cuerpos de heterocromatina se encuentran constituidos por más de un par de homólogos.

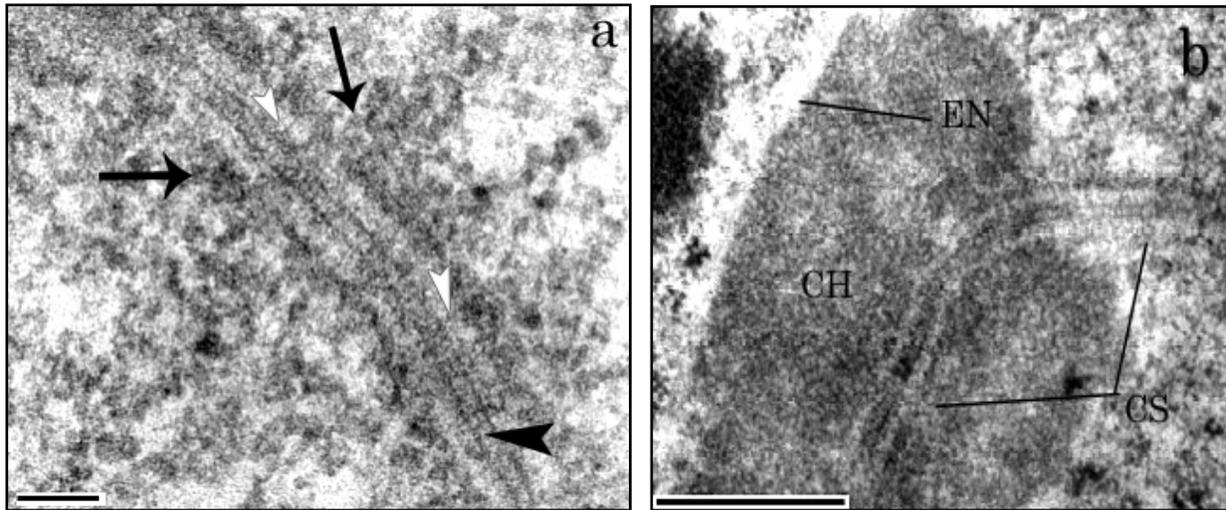


Figura 24. Contraste de Ur—Pb. El complejo sinaptonémico (CS) constituye universalmente en la naturaleza la etapa de paquiteno y de igual manera en *T. molitor*. **a)** el CS se está constituido por dos elementos laterales (flechas) y un elemento central (punta de flecha negra), además numerosos filamentos transversos conectan a un elemento lateral con el otro (puntas de flechas blancas). **b)** los CSs se extienden tanto en el nucleoplasma como atravesando los cuerpos de heterocromatina (CH); envoltura nuclear (EN).; barra de 500 nm.

Las técnicas citoquímicas revelan que la estructura del CS se encuentra constituida por ADN así como ARN. El ADN que participa en el CS se encuentra distribuido y acumulado en los elementos laterales e inclusive algunas asas pequeñas de éste se extienden hacia la región central del CS (figura 25a). En lo que respecta al ARN, con la técnica de EDTA, se ve que éste se distribuye en ambos elementos laterales (figura 25 b y c). En el elemento central, ambas bandas longitudinales poseen marca positiva de RNPs, más aún, se llega a observar una tercera banda con contenido de RNPs entre cada EL y el elemento central (figura 25 b y c).

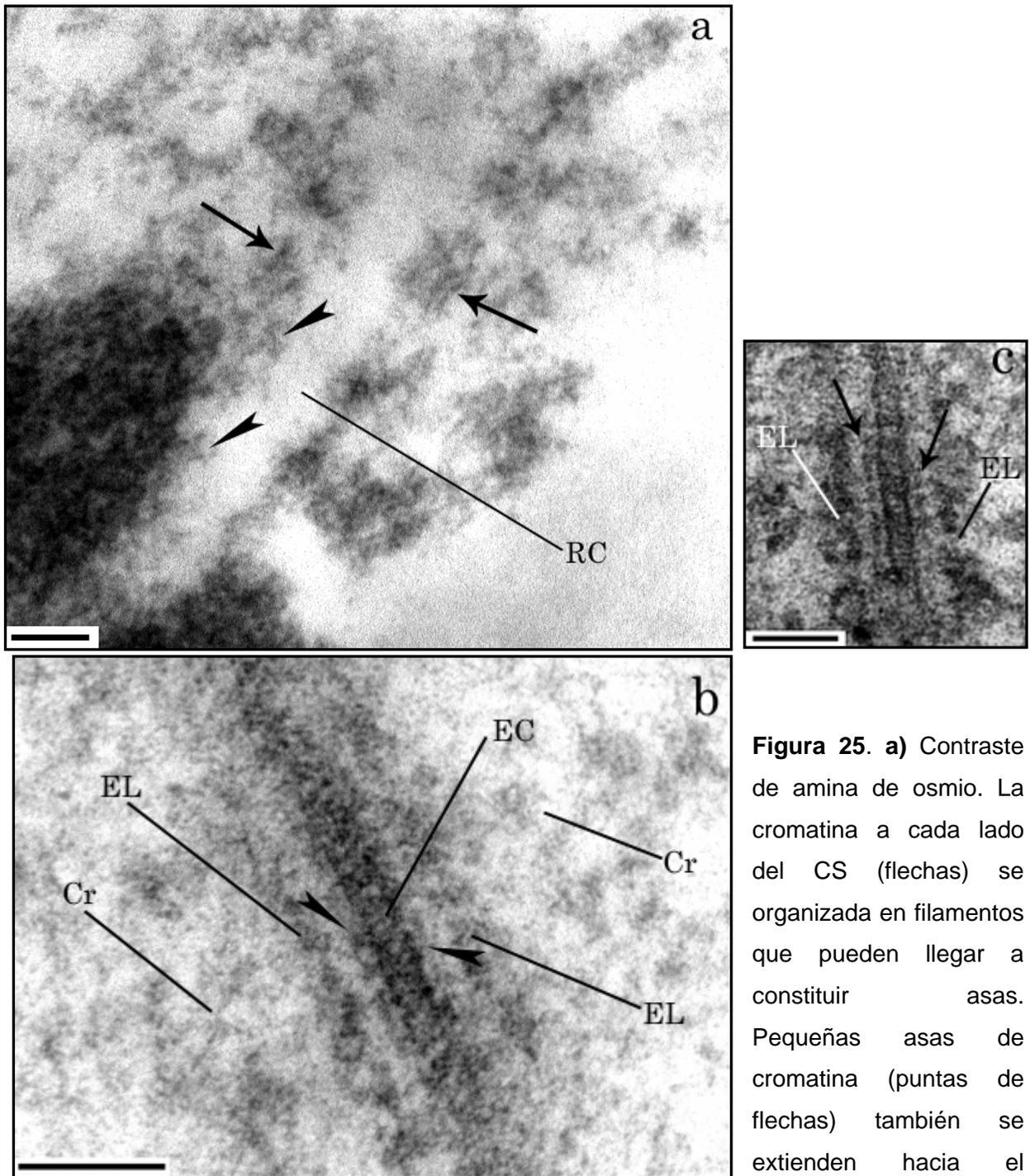


Figura 25. a) Contraste de amina de osmio. La cromatina a cada lado del CS (flechas) se organiza en filamentos que pueden llegar a constituir asas. Pequeñas asas de cromatina (puntas de flechas) también se extienden hacia el espacio central (EC) del CS. Barra de 100 nm. **b) y c)** Contraste de EDTA. Cada elemento lateral (EL) así como el elemento central (EC) poseen una marca positiva de RNP, además la región central del CS presenta una tercera banda positiva a RNPs entre cada EL y el EC (puntas de flechas en b y flechas en c); cromatina blanqueada (Cr). Barra de 100 nm.

7. Discusión

La espermatogénesis en T. molitor

Para conocer la distribución espacial de los espermatoцитos primarios en los testículos del gusano de la harina, *Tenebrio molitor*, en el presente trabajo de tesis se realizó un estudio de microscopía óptica y electrónica de transmisión. Se obtuvo que desde los últimos estadios larvales y en el de pupación, cada testículo está constituido por siete folículos testiculares, dentro de los cuales se observan espermatoquistes de todas las fases espermatogénicas. Esto concuerda con estudios previos en testículos de *T. molitor* (Menon, 1969; Wolf 1995, 1997, 1999), donde se han descrito características del tejido apical y contenido de microtúbulos de ambas generaciones de espermatoцитos. No obstante, nunca se han descrito las características estructurales y espaciales de cada una de las fases o generaciones espermatogénicas dentro del folículo testicular, es decir, se han observado diferencias entre los quistes pero, salvo en los de clara transformación espermiogénica, no se conocía la etapa de la espermatogénesis en la que se encontraba cada uno de ellos. En esta investigación se logró distinguir así como describir algunas características estructurales y ultraestructurales que posee cada una de las poblaciones de la serie espermatogénica.

Las células germinales que inician el proceso de formación de gametos lo hacen por medio de una serie de divisiones mitóticas para luego entrar a la meiosis y por último experimentar una transformación celular o espermiogénesis (Gilbert, 2000). Desde la primera división éstas son envueltas por células somáticas para en conjunto constituir el quiste o *espermatoquiste* (Nation, 2002), dentro del cual todas las células germinales contenidas se encuentran en la misma etapa espermatogénica. Tomando como unidad espermatogénica al quiste, se lograron distinguir cuatro diferentes poblaciones donde: 1) los quistes con dos, cuatro, ocho y dieciséis células constituyen la población de espermatogonias; 2) quistes con treinta y dos células de la línea germinal corresponden a la población de espermatoцитos primarios; 3) los quistes con sesenta y cuatro células germinales constituyen la población de espermatoцитos secundarios; y 4) los quistes en espermiogénesis constituyen las poblaciones de espermátidas o espermatozoides (dependiendo el grado de diferenciación). La abundancia de quistes con células pre-

meióticas fue menor en los testículos extraídos de las pupas en comparación con los de las larvas, lo que muy probablemente indique que en pupas existe una renovación reducida de poblaciones de quistes iniciales.

En *D. melanogaster*, una vez que se ha desarrollado el primer quiste de espermatogonias (con una célula) suceden cuatro divisiones mitóticas subsecuentes de estas y se constituyen los quistes de espermatocitos primarios (de dieciséis células; Fuller, 1993). En cambio, en *T. molitor* se encontró que las espermatogonias se dividen mitóticamente cinco veces para constituir quistes con treinta y dos espermatocitos primarios. Estos números también son distintos entre especies de diferentes órdenes de insectos (De Almeida y Cruz- Landim, 2000; Moreira *et al.*, 2003). Inclusive varían entre las especies al nivel de Familia como es el caso de la Drosophilidae (Fuller, 1993).

Los núcleos de los espermatocitos primarios, despliegan una serie de características estructurales exclusivas por el hecho de que en estas células los eventos centrales de la meiosis; la reducción y recombinación genética tienen lugar. En mamíferos, por ejemplo, la cromatina del núcleo de espermatocitos primarios despliega una morfología cambiante a través de las etapas de la profase meiótica y son observables con técnicas histológicas clásicas y sencillas (Solari, 1999). En el caso de los insectos se han descrito las características de algunos de los componentes meióticos pero con técnicas más finas como las de inmunofluorescencia y microscopía electrónica (Fuller, 1993; Wolf, 1995, 1997; Suja *et al.*, 2000; Viera *et al.*, 2004). Con la técnica de tinción general con azul de toluidina, en el presente estudio se logra describir tres sub- poblaciones de quistes de espermatocitos primarios en *T. molitor* a través de las cuales se despliegan las distintas etapas de la profase meiótica.

Estructuras de la profase meiótica I

Los resultados ultraestructurales de esta investigación demuestran que: **1)** los quistes de espermatocitos primarios más cercanos a la porción apical de cada folículo (primera sub-población), presentan estructuras filamentosas del tipo micro- plumuladas constituidas por ADN y RNPs, y que éstas se proyectan de los cuerpos de heterocromatina o bien presentan anclaje telomérico a la envoltura nuclear. Esta

constitución muy probablemente corresponda a la que se localiza en espermatogonias B pre-leptotónicas en mamíferos (Vázquez Nin et al., 2003). **2)** existen alineamientos entre estructuras micro-plumuladas que se asocian por medio de sus filamentos radiales y que poseen RNPs, por lo es muy probable que haya transcripción en estas asociaciones. Además, en dicho alineamiento se conserva una relación simétrica entre el par de micro-plumulados que participan en éste. **3)** en lo que se designó como la transición lepto—cigoteno (segunda sub-población), se observan ejes cromosómicos en formación y algunos de ellos llegan a presentar en sus extremos continuidad con estructuras micro-plumuladas. **4)** hay un alineamiento entre ejes cromosómicos en formación y que presentan continuidad con estructuras micro-plumuladas. Sin embargo nunca se observó la formación del complejo sinaptonémico a partir de ejes cromosómicos. **5)** en la tercera sub-población de espermatoцитos hay formación de complejos sinaptonémicos a partir de estructuras micro-plumuladas o alineamientos de éstas en *escaleras de doble cuerda*. **6)** Una banda que corre longitudinalmente entre cada elemento lateral y el elemento central del CS da positiva con la técnica de EDTA para evidenciar las ribonucleoproteínas. **7)** cuando el CS desaparece en la etapa de diploteno, los cuerpos de heterocromatina conservan la perforación que es la consecuencia directa de la exclusión de la heterocromatina que se produjo cuando el CS estuvo presente.

El apareamiento entre homólogos

Se han propuesto varios modelos para explicar la búsqueda y reconocimiento de homología entre cromosomas (Zickler y Kleckner, 1998) en los que se propone que las interacciones entre hebras sencillas de ADN promovidas por la configuración de 'bouquet', son las encargadas del alineamiento y apareamiento entre homólogos. Sin embargo, Sybenga (1999) postula que existen una serie de impedimentos por los cuales hebras sencillas de ADN son prácticamente inestables e inexistentes en los núcleos profásicos. Y más aún, la generación de hebras sencillas de ADN se produce por la intervención de SPO11 en el DSB, la cual sólo sucede en el momento del apareamiento de cromosomas, cuando los homólogos ya se han reconocido (Page y Hawley, 2004; Schuermann *et al.*, 2005).

La teoría de que las estructuras del tipo micro-plumuladas participan en el alineamiento, reconocimiento y apareamiento de cromosomas homólogos propone que estos eventos se inician desde una etapa pre-leptoténica y que además el ARN podría estar mediando estas interacciones (Ortiz, 2002a; Vázquez Nin *et al.*, 2003). Como ya se ha mencionado anteriormente, el presente trabajo demuestra la existencia de estructuras micro-plumuladas participando muy probablemente en estos eventos desde fases muy tempranas como el pre-leptoteno. Además, la presencia de RNPs como uno de los constituyentes tanto de los micro-plumulados como de las *escaleras de doble cuerda*, está de acuerdo con trabajos previos que resaltan la gran actividad transcripcional en los procesos de búsqueda y apareamiento entre homólogos (Sybenga, 1999; Cook, 1997, Ortiz, 2002a; Vázquez Nin *et al.*, 2003).

El establecimiento de *escaleras de doble cuerda* aquí observado antes de la transición de leptocigoteno, es un indicador de que el reconocimiento de homología se ha realizado previo al evento de 'bouquet', en caso de que este último existiese en *T. molitor*, puesto que en esta investigación nunca se pudo observar alguna organización polarizada de los telómeros y/ o ejes cromosómicos. Hay que mencionar que no se realizaron pruebas de mayor fineza para la evaluación de un posible estado de bouquet de los espermatoцитos primarios, como son las inmunolocalizaciones. No obstante, cuando se efectuaron reconstrucciones tridimensionales de espermatoцитos en paquiteno, no se observó orientación polarizada de los extremos de los CSs que indicara un estado previo de bouquet como sucede en otros insectos (Rasmussen, 1976; Fiil, 1978).

En todos los organismos donde han sido estudiadas sus células meióticas, se observa que el 'bouquet' se presenta como una característica común a éstas en el cigoteno (Zickler y Kleckner, 1998; Cowan *et al.*, 2001), además se le ha atribuido la función de acortar distancias para que exista un reconocimiento y final apareamiento entre cromosomas homólogos (Scherthan *et al.*, 1996; Zickler y Kleckner, 1998). La posible inexistencia del bouquet en *T. molitor* podría estar apoyando la idea de que el reconocimiento de homología entre cromosomas sea muy probablemente vía las *escaleras de doble cuerda* constituidas en una etapa previa al cigoteno.

Otro hecho, la correspondencia simétrica que en las escalerillas guarda un micro-plumulado con respecto al otro, puede ser un indicador de que las *escalerillas* están conformadas por regiones similares o quizás homologas de cada par de cromosomas que participan en éstas.

La presencia de alineamientos homólogos desde muy temprano en la profase, podría no ser un indicador tácito de que los cromosomas homólogos se encuentren alineados u ocupando dominios cercanos antes del inicio de la meiosis, puesto que se ha visto que las asociaciones entre cromosomas homólogos en etapas anteriores a la profase pueden ser alteradas por los movimientos relacionados con la formación del bouquet (Sybenga, 1999). No obstante, en cobayo el alineamiento de cromosomas homólogos previo al inicio de la meiosis no desaparece aún con la conformación de 'bouquet' (Ortiz, 2002a; Vázquez Nin et al., 2003). Las distancias que pudieran existir entre homólogos pre- alineados o no, bien podrían ser cubiertas por las asas radiales de los micro- plumulados (Ortiz, 2002a; Vázquez Nin et al., 2003) y la transcripción presente en ellas, participar de alguna manera en el reconocimiento de homología.

La formación de ejes cromosómicos en espermatocitos de *T. molitor* tiene lugar a partir de estructuras micro- plumuladas desde etapas de leptoteno. En dichos espermatocitos también se encontraron las *escalerillas de doble cuerda*, y ejes cromosómicos alineados. En todos los casos, se observó que los complejos sinaptonémicos se forman a partir de *escalerillas de doble cuerda*, en lo que corresponde a una etapa de leptoteno. Sin embargo, la existencia de ejes cromosómicos y la sinapsis encontrada entre pares de éstos abre otras dos posibilidades para la formación del CS: 1) muy probablemente esto indique que hay una formación de CSs a partir de ejes cromosómicos alineados, pero que es posterior al leptoteno; ó 2) en la ausencia de continuidad entre CSs y ejes cromosómicos, cabe la posibilidad que el paso eje cromosómico a elemento lateral del CS sea simultáneo con el desarrollo de los mismos ejes cromosómicos a partir de estructuras micro- plumuladas.

El complejo Sinaptonémico

El ADN de los elementos laterales del CS se encuentra arreglado en delgados filamentos que en ocasiones se extienden como asas hacia el nucleoplasma. Además pequeñas asas de cromatina se observan proyectándose de los ELs hacia la región central del CS. Esta región central no posee cromatina salvo las mínimas cantidades aportadas por dichas asas y quizás las correspondientes a los nódulos de recombinación. Las ribonucleoproteínas se encuentran formando parte de los elementos laterales. Estos resultados están de acuerdo con trabajos de distribución del ADN y ARN en mamíferos (Vázquez Nin y Echeverría, 1976; Ortiz *et al.*, 2002b) y aves (Vázquez Nin *et al.*, 1993). Sin embargo, en *T. molitor* se observó que la tinción de RNPs es mayor en el elemento central y en especial en sus dos bandas longitudinales.

Dada la presencia de RNPs desde muy temprano en la meiosis como un constituyente de los micro-plumulados y su permanencia en las *escalerillas de doble cuerda* (alineamiento), es claro entonces que la transcripción juega un papel fundamental en el proceso de búsqueda de homología que lleva a la formación del CS promoviendo la recombinación genética entre pares de homólogos.

Los CS maduros de los espermatoцитos paquítenicos de *T. molitor*, tienen una estructura tripartita clásica, con dos elementos laterales y un elemento central altamente organizado. Al igual que en *Blaps cribosa* (Coleoptera, Tenebrionidae) el elemento central en *T. molitor* está constituido por dos *elementos longitudinales* paralelos entre sí y filamentos transversos regularmente espaciados (figura 25c) que conectan a un elemento longitudinal con el otro (Schmekel *et al.*, 1993; Schmekel y Daneholt, 1998). De manera particular en *T. molitor* se logran observar dos bandas RNPs positivas en la región central del CS se observan, una a cada lado del elemento central, y que se extienden paralelas a los elementos laterales (figura 25 b y c). Trabajos recientes en *D. melanogaster* describen detalladamente las características de la región central del CS, encontrando que la proteína de los filamentos transversos C(3)G forma homo- dímeros, donde cada C(3)G se une con otra C(3)G a través de sus extremos amino terminales (Anderson *et al.*, 2005). Dichos sitios de unión, más las *proteínas pilares* de los elementos longitudinales, constituyen el elemento central del CS en la mosca de la

fruta, sin embargo, no se describe algún elemento más en la región central del CS que pudiera semejarse a las bandas presentes en *T. molitor*.

Muy recientemente en ratón, se encontró que existen dos proteínas específicas del elemento central del CS, SYCE1 y CESC1, siendo éstas las que propiamente conforman el elemento central y las cuales interactúan con los homo-dímeros de SYCP1 de los filamentos transversos. Únicamente en el grupo de los vertebrados se presentan ortólogos a las proteínas SYCE1 y CESC1 (Costa *et al.*, 2005). En el caso de las dos bandas RNPs positivas observadas en *T. molitor*, cabe la posibilidad de que, al igual que en los vertebrados, existan proteínas propias del elemento central o bien de la región central en los insectos.

8. Conclusiones

1.- La espermatogénesis en el escarabajo *Tenebrio molitor* posee una organización en quistes dentro de los folículos testiculares, en donde el número de células germinales contenidas en cada uno refleja un tipo celular particular de la onda espermatogénica.

2.- Las espermatogonias se encuentran contenidas en las poblaciones de quistes con 2, 4, 8 y 16 células.

3.- Los quistes que contienen espermatoцитos primarios, poseen 32 células que por sus características nucleares observables al nivel de la microscopía óptica, pueden ser divididas en tres sub-poblaciones, donde quedan contenidas las diferentes etapas de la profase meiótica I:

- a) Primera sub-población. La heterocromatina de los núcleos de estas células está cercana a la periferia nuclear. Además poseen cromatina laxa en forma de motas distribuidas en el nucleoplasma. Los espermatoцитos de esta sub-población se encuentran en las etapas de pre-leptoteno, leptoteno y la transición leptoteno-cigoteno.
- b) Segunda sub-población. La heterocromatina en los núcleos constituye cuerpos irregulares. Los cuerpos suelen presentar continuidades con heterocromatina de menor compactación en hilos que se extienden atravesando el nucleoplasma, estos también pueden estar interconectando un cuerpo de heterocromatina con otro(s). Los espermatoцитos de esta sub-población se encuentran en etapa de cigoteno.
- c) Tercera sub-población. Típicamente se observan cuerpos de heterocromatina que no presentan proyecciones de material hacia el nucleoplasma, es decir, constituyen cuerpos muy bien definidos. Además, la mayor parte de los cuerpos de heterocromatina contienen en su porción media un espacio claro sin heterocromatina. Los espermatoцитos de esta sub-población se encuentran en etapa de cigoteno avanzado, paquiteno y diploteno.

4.- Los espermátocitos secundarios constituyen los quistes con 64 de estas células. Los quistes con 128 células están formados por espermátidas y espermatozoides.

5.- Los núcleos de espermátocitos primarios en etapas pre-leptoténicas y leptoténicas presentan estructuras del tipo micro-plumuladas constituidas por un eje axial y asas radiales. Ambos componentes de estas estructuras poseen tanto ADN como RNPs. Por lo que la transcripción en estas estructuras puede estar jugando un papel importante en el proceso de búsqueda y apareamiento de cromosomas homólogos.

6.- Las estructuras micro-plumuladas en la etapa de leptoteno y cigoteno pueden estar alineadas constituyendo las *escaleras de doble cuerda*, que se observan como los ejes de crecimiento de los elementos laterales del complejo sinaptonémico.

7.- En los elementos laterales del complejo sinaptonémico hay presencia de ADN en delgados filamentos que constituyen asas que se proyectan tanto hacia el exterior como hacia la región central del CS. Las RNPs se encuentran presentes en los elementos laterales y además con mayor densidad en el elemento central del CS.

8.- En la región central del CS, entre cada EL y el elemento central se encuentra una delgada banda de RNPs. Ambas bandas, situadas una a cada lado del elemento central, se extienden paralelas en toda la longitud del CS. Estas bandas no se han observado en alguna otra especie.

10. Referencias Citadas

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. Molecular Biology of the Cell. Third edition. Gerten Science USA.
- Anderson L., Royer S.M., Page S.L., Mckim K.S., Lai A., Lilly M.A., Hawley S. 2005. Juxtaposition of C(2)M and the filament transverse protein C(3)G within the central region of *Drosophila* synaptonemal complex. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 102: 4482 – 4487.
- Bass H. W. 2003. Telomere dynamics unique to meiotic prophase: Formation and significance of the bouquet. Cell. Mol. Life Sci. 60: 2319- 2324.
- Bernhard W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. J Ultrastruct Res. 27: 250–265.
- Borde V., Goldman A. S., Lichten M. 2000. Science 290: 806- 809.
- Bogolyubov D., Alexandrova O., Tsvetkov A, Parfenov V. 2000. An immunoelectron study of karyosphere and nuclear bodies in oocytes of mealworm beetle, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Polyphaga). Chromosoma 109: 415- 425.
- Borror, D. 1982. An Introduction to the study of Insects. Saunders College Publishing. EUA. 875 pp.
- Carpenter A. T. 1975. Electron microscopy of meiosis in *Drosophila melanogaster* females II: The recombination nodule—a recombination- associated structure at pachytene?. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 3786- 3189.
- Chapman R. F. 1998. The insects structure and function. Cuarta edición. Cambridge university Press. EUA. 770pp.
- Cogliatti R., Gautier A.1973. Mise en évidence del ADN et des polysaccharides á l'aide d'un nouveau réactif de type Schiff. CR Acad. Sci. D 276: 1371-1374.
- Cook P.R., 1997. The transcriptional basis of chromosome pairing. J.Cell Sci. 110: 1033—1040.
- Costa Y., Speed R., Öllinger R., Alsheimer M., Semple C.A., Gautier P., Maratou K., Novak I., Höög, Benavente R. y Cooke H. J. 2005. Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the center of meiosis. J. Cell Sci. 118: 2755—2762.

- Cowan C., Carlton P., Cande Z. 2001. Polar arrangement of telomeres in interphase and meiosis. Rab1 organization and the bouquet. *Plant Physiology* 125: 532—538.
- De Almeida M. C. y Cruz- Landim C. 2000. Spermiogenesis in *Palembus dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae) with emphasis on the formation of mitochondrial derivatives. *Braz. J. Morphol. Sci.* 17: 75—80.
- De Cuevas M. y Spradling A. C. 1997. Germline cyst formation in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 31: 405- 428.
- Fiil Annelise. 1978. Meiotic chromosome pairing and synaptonemal complex transformation in *Culex pipiens* oocytes. *Chromosoma (Berl.)* 69: 381—395.
- Fuller, M. T. 1993. Spermatogenesis. 71 –147. En: Bate M. y Martínez A. A. The development of *Drosophila melanogaster*. Vol. I. Cold Spring Harbor laboratory Press. EUA.
- Gilbert F. S. 2000. *Developmental Biology*. 6ª Edición. Sinauer Associates, Inc., Publishers. EUA.
- Gruzova M. N. 1982. Ultrastructure of the karyosphere in darkling beetles (Tenebrionidae Coleoptera Polyphaga). *Monitore Zool. Ital. (N. S.)* 16: 231- 246.
- Gruzova M. N. Y Parfenov V. N. 1993. Karyosphere in Oogenesis and intranuclear morphogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 144: 1- 48.
- Gullan. 1994. *The Insects: An outline of Entomology*. Ed. Chapman and Hall. EUA.
- Hawley R. S., 2002. Meiosis: How male flies do meiosis. *Current Biology* 12: R660- R662.
- Hernández A. 2003. Formación del cuerpo XY durante las etapas iniciales de la profase meiótica I en espermátocitos de rata. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Hoekstra R. F. 2005. Why sex is good. *Nature* 434: 571- 573.
- Klein F, Mahr P, Galova M, Buonomo SB, Michaelis C, et al. 1999. A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* 98: 91- 103.
- Loidl J. y Scherthan H. 2004. Organization and pairing of meiotic chromosomes in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *J. Cell Sci.* 117: 5791- 5801.

- Lorenz A., Wells J. L., Pryce D. W., Novatchkova M., Eisenhaber F., McFarlane J., Loid J. 2004. *S. pombe* meiotic linear elements contain proteins related to synaptonemal complex components. *J. Cell Sci.* 117: 3343- 3351.
- Marec F. 1996. Synaptonemal complexes in insects. *Int. J. Insect Morphol. & Embryol* 25 (3): 205- 233.
- McLaren, A. (1999). Signaling for germ cells. *Genes Development.* 13: 373- 376.
- Mckee B. D. 1998. Pairing sites and role of chromosome pairing in meiosis and spermatogenesis in male *Drosophila*. 77- 115. En: Handel. Meiosis and gametogenesis. Academic Press. EUA.
- McKim K. S. y Hayashi-Hagihara A. 1998. Mei-W68 in *Drosophila melanogaster* encodes a Spo11 homolog: evidence that the mechanism for initiating meiotic recombination is conserved. *Genes & Development* 12: 2932- 2942.
- Menon M. 1969. Structure of the apical cells of the testis of the tenebrionid beetles: *Tenebrio molitor* and *Zoophobas rugipes*. *J. Morphol.* 127: 409--430.
- Miyazaki W. Y, Orr-Weaver T. L. 1994. Sister-chromatid cohesion in mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet* 28:167- 187.
- Moens P.B., 1994. Molecular perspectives of chromosome pairing at meiosis. *BioEssays* 16: 101—106.
- Moreira J. C., Brito P., Lino- Neto J. 2003. Morphology and number of spermatozoa per cyst in *Sceliphron sp.* And *Trypoxylon albitarse* (Hymenoptera: Sphecidae). 12, suplemento B: 569--570.
- Nation, L.J., 2002. *Insect physiology and biochemistry.* CRC Press 425—445.
- Ortiz R. 2002. Participación del ARN y ADN en el apareamiento de los cromosomas homólogos durante la profase meiótica. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Ortiz R., Echeverría O. M., Ubaldo E., Carlos A., Scassellati C., Vázquez Nin G. H. 2002. Cytochemical study of the distribution of RNA and DNA in the synaptonemal complex of guinea-pig and rat spermatocytes. *Eur. J. Histochem.*
- Page S. L. y Hawley R. S. 2001. c(3)G encodes a *Drosophila* synaptonemal complex protein. *Genes Dev.* 15: 3130- 3143.
- Page S. L. y Hawley R. S. 2004. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 525- 558.

- Paniagua G. P. Nistal M. M. 1983. Introducción a la Histología Animal Comparada. Labor Universitaria. España. 438 pp.
- Pawlowski W. P., Golubovskaya N. I. Cande W. Z. 2003 Altered nuclear distribution of recombination protein RAD51 in maize mutants suggests the involvement of the Rad51 in meiotic homology recognition. *Plant Cell* 15: 1807-1816.
- Pearlman R., Tsao N. y Moens P. 1992. synaptonemal complexes from Dnase-treated rat pachytene chromosome contain (GT)_n and LINE/ SINE sequences. *Genetics* 130: 865- 872.
- Pelttari, J., *et al.* 2001. A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. *Mol. Cell. Biol.* 21: 5667- 5677.
- Pigozzi M. I. Solari A. J. 2003. Differential immunolocalitation of a putative Rec8p in meiotic autosomes and sex chromosome of triatomine bugs. *Chromosoma* 112: 38- 47.
- Rasmussen S. W. 1976. The meiotic prophase in *Bombix mori* females analyzed by three-dimensional reconstructions of synaptonemal complexes. *Chromosoma (Berl.)* 54: 245—293.
- Reinholdt G. L., Gutierrez G. M., Krider H. M. 2002. Meiotic chromosome missegregation during apyrene meiosis in the gypsy moth, *Lymantria dispar*, is preceded by an aberrant prophase I. *Chromosoma* 111: 139- 146.
- Richardson C., Horikoshi N., Pandita T. K. 2004. The role of DNA double- strand break response network in meiosis. *DNA Repair* 3: 1149- 1164.
- Roeder G. S. 1997. Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev* 11: 2600- 2621.
- Santos J. L. 1999. The relationship between synapsis and recombination: two different views. *Heredity* 82: 1- 6.
- Schmekel K., Wahrman J., Skoglund U., Daneholt B. 1993. The central region of the synaptonemal complex in *Blaps cribosa* studied by electron microscope tomography. *Chromosoma* 102: 669- 681.

- Schmekel K., Meuwissen R., Dietrich A., Vink A., Van Marle J., Van Veen, Heyting C. 1996. Organization of SCP1 Protein Molecules within Synaptonemal Complexes of the Rat. *Experimental Cell research* 226: 20- 30
- Schmekel K. Daneholt B. 1998. Evidence for close contact between recombination nodules and the central element of the synaptonemal complex. *Chromosome Res.* 6: 155-159.
- Scherthan H., Weich S., Schwegler H., Heyting C., Harle M., Cremer T. 1996. Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J. Cell Biol.* 134: 1109—1125.
- Scherthan H., Elis R., Trelles-Stricken E., Dietsel S., Cremer T., Walt H., Jauch A. 1998. Aspects of three-dimensional chromosome reorganization during the onset of human male meiotic prophase. *J. Cell Sci.* 111: 2337- 2351.
- Schuermann D., Molinier J., Fritsch O., Hohn B. 2005. The dual nature of homologous recombination in plants. *Trends in Genetics* 21: 172- 181.
- Spector D. L. 2003. The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 573- 608.
- Solari A. J. 1999. *Genética humana. Fundamento y Aplicaciones en Medicina.* 2ª Edición. Panamericana. Argentina.
- Solari A. J. 2002. Primitive forms of meiosis: The possible evolution of meiosis. *Biocell* 26: 1- 13.
- Suja J. A., del Cerro A. L., Page J., Rufas J. S., Santos J. L. 2000. Meiotic sister chromatid cohesión in holocentric sex chromosomes of three heteropteran species is maintained in absence of axial elements. *Chromosome* 109: 35- 43.
- Sybenga J. 1999. What makes homologues chromosomes find each other in meiosis? A review and an hypothesis. *Chromosoma* 108: 209- 219.
- Sym, M., Engebrecht, J., Roeder, G.S. 1993. ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell* 72: 365- 378.
- Sym M. y Roeder G. S. 1995. Zip1-induced changes in synaptonemal complex structure and polycomplex assembly. *J. Cell Biol.* 128: 455- 466.

- Tarsounas M. M., Pearlman R. E. Moens P. B. 1999. Rad51 and Dmc1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *J Cell Biol* 147: 207- 219.
- Trelles-Sticken E., Dresser M. E., Scherthan H. 2000. Meiotic telomere protein ndj1p is required for meiosis-specific telomere distribution, bouquet formation and efficient homologue pairing. *J. Cell Biol.* 151: 95-106.
- Valdez J. M. 2001. Ultrastructure of the testis of the mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94: 251- 256.
- Vázquez Nin G. H. Y Echeverría O. M. 1976. Ultrastructural study of the prophase nucleus of rat oocyte. *Acta anatómica* 96: 218- 231.
- Vázquez Nin G. H., Flores E., Echeverría O. M., Merkert H., Wettstein R., Benavente R. 1993. Immunocytochemical localization of DNA in synaptonemal complexes of rat and mouse spermatocytes, and chick oocytes. *Chromosoma* 102: 457- 463.
- Vázquez Nin G. H. Echeverría O. M. 2000. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Facultad de Ciencias— Fondo de cultura económica. UNAM. México.
- Vázquez Nin G. H., Echeverría O. M., Ortiz R. Scassellati C., Martín T. E. Ubaldo E., Fakan S. 2003. Fine structural cytochemical analysis of homologous recognition, alignment, and pairing in guinea pig spermatogonia and spermatocytes. *Biology of Reproduction* 69: 1362- 1370.
- Viera A., Santos J. L., Page J., Parra M. T., Calvente A., Cifuentes M. Gómez R. Lira R., Suja j. A., Rufas J. S. 2004. DNA double-strand breaks, recombination and synapsis: the timing of meiosis differs in grasshoppers and flies. *EMBO* 5: 385- 391.
- Webber H. A., Howard L., Bickel S. E. 2004. The cohesion protein ORD is required for homologue bias during meiotic recombination. *J. Cell Biol.* 164: 819- 829.
- Weith A. 1985. The fine structure of euchromatin and centromeric heterochromatin in *Tenebrio molitor* chromosomes. *Chromosoma* 91: 287- 296.
- Wolf K. W. 1994. The unique structure of Lepidopteran spindles. *Int. Rev. Cytol.* 152: 1- 52.

- Wolf K. W. y Hellwage J. 1995. Spermatogenesis in *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae, Coleoptera): a fine structure and anti-tubulin immunofluorescence study. *Acta Zool.* 76: 267- 279.
- Wolf K. W. 1997. The structure of the XY_p chromosome complex in male meiosis of two beetles: *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae) and *Chrysolina graminis* (Chrysomelidae). *Cell Mol. Life Sci.* 53: 162- 167.
- Zacaro A. A., Almeida M. C., Cella D. M. 2003. Recombination nodules in coleopteran species: *Palembus dermestoides* (Tenebrionidae) and *Epicauta atomaria* (Meloidae). *Cytogen. Genome Res.* 103: 185- 191.
- Zhao G. Q. y Garbers D. L. 2002. Male germ cell specification and differentiation. *Develop. Cell* 2: 537- 547.
- Zickler D. y Kleckner N. 1998. The Leptotene-Zigotene transition of meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 32: 619- 697.
- Zickler D. y Kleckner N. 1999. Meiotic chromosomes: Integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* 33: 603- 754.