



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Estudio de la síntesis de DNA mediante la
incorporación de BrdU durante la
espermatogénesis de la rata”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

Israel Muñoz Velasco



DIRECTOR DE TESIS: DR. GERARDO HEBERT VÁZQUEZ-NIN

2012



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
UNIDAD DE ENSEÑANZA

OF. No. FCIE/CALB/U.E./0673/12

ASUNTO: Asignación de jurado

p/21-nov-12

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
P R E S E N T E

Por este medio, el Comité Académico de la Licenciatura en Biología informa a usted que el día 26 de octubre de 2012, aprobó que el alumno:

Israel Muñoz Velasco

con número de cuenta 305324690, presentará el trabajo titulado:

Estudio de la síntesis de DNA mediante la incorporación de BrdU durante la espermatogénesis de la rata

correspondiente a la opción de **Tesis**.

Asimismo, este comité informa a usted que el tutor y los sinodales autorizados para la dirección y revisión del trabajo arriba señalado son:

Presidente: Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Vocal: Dra. María del Carmen Méndez Herrera

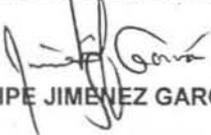
Secretario: Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin
Tutor

Suplente: Dr. Luis Felipe Jiménez García

Suplente: Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz

En consecuencia, este Comité solicita a usted se entregue al citado alumno la papelería que conforme a la normatividad aplicable, debe llenar, se proceda a la elaboración de los votos aprobatorios y se dé inicio al proceso de revisión de estudios correspondientes.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 6 de noviembre de 2012.
EL COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA


DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

LFJG/vgc*

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
EN BIOLOGÍA

“Estudio de la síntesis de DNA mediante la incorporación de BrdU durante la espermatogénesis de la rata”.

Alumno: Israel Muñoz Velasco

Director de Tesis: Gerardo Hebert Vázquez-Nin

Índice.

I. Resumen-----	pag. 9
II. Abreviaturas-----	pag. 11
III. Introducción-----	pag. 12
III.1 Importancia de la reproducción sexual-----	pag. 12
III.2 Espermatogénesis-----	pag. 12
III.3 Ciclo del epitelio seminífero-----	pag. 15
III.4 Onda espermatogénica-----	pag. 16
III.5 Ciclo celular-----	pag. 17
III.6 Regulación del ciclo celular-----	pag. 18
III.7 Meiosis-----	pag.19
III.7.1 Profase Meiótica-----	pag. 21
III.7.2 Leptoteno-----	pag. 21
III.7.3 Cigoteno-----	pag 22
III.7.4 Paquíteno-----	pag. 23
III 7.5 Diploteno-----	pag. 24
III.7.6 Diacinesis-----	pag. 25
III.7.7 Segunda división meiótica-----	pag. 25
III.8 Síntesis de ADN pre-meiótica-----	pag. 25
IV. Justificación del trabajo-----	pag.28
V. Hipótesis-----	pag. 29
VI. Objetivo general-----	pag. 29
VI.1 Objetivos particulares-----	pag. 29
VII. Material y métodos-----	pag. 30

VII.1 Material Biológico-----	pag. 30
VII.2 Incorporación de BrdU y extracción de tejido-----	pag. 30
VII.3 Deshidratación, pre-inclusión e inclusión de túbulos seminíferos e intestino de rata en parafina-----	pag. 30
VII.4 Corte del material biológico-----	pag. 31
VII.5 Desparafinar e Hidratar-----	pag. 31
VII.6 Tinción Hematoxilina y Eosina-----	pag. 31
VII.7 Inmunolocalización de la BrdU-----	pag. 32
VII.8 Observación de las preparaciones-----	pag. 33
VII.9 Conteo de células positivas-----	pag. 33
VIII. Resultados-----	pag. 37
VIII. 1 Incorporación de BrdU a 0 minutos-----	pag. 37
VIII. 2 Incorporación de BrdU a 30 minutos, 2 y 3 horas-----	pag. 38
VIII. 3 Incorporación de BrdU a 24 h-----	pag. 47
VIII.4 Conteo de células positivas a la BrdU-----	pag. 48
IX. Discusión-----	pag. 55
X. Conclusiones-----	pag. 62
XI. Perspectivas-----	pag. 64
XII. Anexo-----	pag. 65
XIII. Referencias-----	pag. 66

AGRADECIMIENTOS:

- Este trabajo fue apoyado por: PAPIIT IN-212912 y CONACyT 180525
- A CONACyT por la beca de “Ayudante del investigador SIN nivel III” con expediente N° 664, 6337. Duración 1 de agosto 2009- 31 de julio de 2012
- Al Dr. Gerardo Hebert Vázquez-Nin y a la Dra. Olga Echeverría por su invaluable apoyo, ayuda y confianza, ya que cuando más lo necesité, ellos me abrieron las puertas de su laboratorio y me ofrecieron con su ayuda la oportunidad de seguir adelante, significan mucho en mi formación académica, ya que “siempre hay que ser críticos con nuestro trabajo”.
- A la Dra. Rosario Ortiz por su apoyo técnico, constante guía y su gran amistad, porque una vez encausados en esta ardua tarea, jamás nos dimos por vencidos, y cuando necesité ayuda jamás se me negó.
- Dra. María Luisa Escobar (Luisa) por su gran apoyo técnico, moral y amistad sincera, ella entiende mis ganas de crecer, tanto académica como personalmente, el calor de su amistad siempre me cobijó y la dureza de su enseñanza me ha hecho aprender la importancia de ser constante.
- A mis compañeros de laboratorio:
 - Omar, un poco disperso pero con grandes ideas, gran malabarista de pipetas y matraces, poeta de protocolos y bitácoras, tengo la entera confianza de que al igual que yo, él cumplirá sus metas.
 - Sofía, compañera de taller, constante, aunque poco efusiva, siempre alerta a su trabajo, cumpliendo sus metas, suerte Sofi.

-Sandra, sabe que no es demasiado tarde para lograr metas y objetivos, con gran determinación todo se puede.

-Yunuen, ella sabe que aún sin ser brillantes siempre podemos crecer y ser mejores, constancia y una gran entrega es lo que necesitamos y de eso le sobra.

-Gerardo, esa manera tan peculiar de ver las cosas, nos ha arrancado una carcajada una que otra vez a todos en el laboratorio.

-Gethsemany, tienes una gran oportunidad, desarrollar la parte molecular de la muerte celular, aprovéchala, por cierto te ves mejor con los chinos que sin ellos.

-Betzabé, aunque te conozco poco, sé que acabarás tu especialidad con un buen trabajo, da lo mejor de ti siempre y el extra.

- A la M. en C. Ernestina Ubaldo por su amistad, apoyo técnico y esos consejos que me han servido de mucho en el corte, porque su experiencia aún no termina de asombrarme.
- A la M. en C. Silvia Juárez por su asistencia técnica y ayuda en mis inicios en el laboratorio.
- A todos mis amigos, que aunque pareciera que estamos lejos, siempre saben que contamos unos con otros, para lo que sea ya que ser familia no solo significa tener la misma "sangre", ¿verdad que si Juan Pablo?.
- A mi madre cuyos esfuerzos y sacrificios por mí y mis hermanos, ahora ven sus frutos, con esa fuerza que la caracteriza siempre me impulsó a ser mejor, te amo mamá.
- A mi hermano que en los momentos más difíciles sacó la casta y ahora es todo un hombre de bien, solo deseo que acabe de madurar algunas ideas que aún tiene difusas.

- A mi chaparra hermosa Brenda, espero que le guste tanto el estudio como a mí, sus te quiero hermanito significaron el nunca rendirme por más difícil que fuera la situación.
- Finalmente a difunto mi padre, quién me enseñó que el ser humilde no es sinónimo de ser pobre, que me enseñó a nunca darme por vencido por muy duro que sea, a dar siempre lo mejor de mí, él me enseñó a soñar, pero más importante, me enseñó que los sueños se hacen realidad con dedicación, esfuerzo y trabajo.
- A Edday Farfán, Martha Graciela Alvarez y Daniela Fernández y Fernández por su apoyo con las pruebas estadísticas realizadas.

Dedicatoria:

Este trabajo se lo dedico a mi familia: A mi padre (†), mi madre y mis hermanos Omar y Brenda, quienes no sólo me han brindado todo su apoyo, sino también y más importante, su amor y cariño, cosas que me han impulsado siempre.

¿Por qué nos caemos?, para aprender a levantarnos y mientras exista una razón para seguir adelante, me levantaré cuantas veces sea necesario.

Táctica y Estrategia.

 Mi táctica es
 mirarte
aprender como sos
quererte como sos.

 Mi táctica es
 hablarte
 y escucharte
construir con palabras
un puente indestructible.

 Mi táctica es
quedarme en tu recuerdo
 no sé cómo ni sé
 con qué pretexto
pero quedarme en vos.

 Mi táctica es
 ser franco
y saber que sos franca
y que no nos vendamos
 simulacros
para que entre los dos
 no haya telón
 ni abismos.

 Mi estrategia es
 en cambio
más profunda y más
 simple
mi estrategia es
que un día cualquiera
 no sé cómo ni sé
 con qué pretexto
por fin me necesites.

 Mario Benedetti.

I. Resumen

Se considera que el proceso meiótico se inicia desde la etapa del G1 del ciclo celular, y que las células que entrarán en meiosis pasan por una fase de síntesis de ADN singular, denominada fase S meiótica o fase S pre-meiótica.

Hasta el momento, la fase S pre-meiótica se ha investigado poco en mamíferos, de modo que su estudio es importante para poder realizar aportaciones a su entendimiento. En este estudio se realizaron ensayos *in vivo* de incorporación de Bromodesoxiuridina (BrdU) a diferentes tiempos (30 minutos, 2, 3 y 24 horas). La BrdU es un compuesto que tiene la característica de ser análogo de la base nitrogenada timina, estas características le confieren la capacidad de incorporarse durante la fase de síntesis al ADN, de forma tal que es posible evidenciar dicho proceso de manera espacio temporal durante la onda espermatogénica de la rata.

Los resultados revelan que la incorporación de la BrdU se presenta principalmente durante los estadios V-VI del ciclo espermatogénico (según la clasificación de Leblond & Clermont, 1952). En donde la marca se observa como cúmulos en la periferia del núcleo en forma de costras o "motas" adosadas a la envoltura nuclear que colocalizan principalmente con grumos de cromatina compacta.

Entre los estadios VIII-XI se observó una marca que ocupa todo el volumen nuclear en forma de "foci". Este tipo de marca se encuentra asociada tanto a cromatina laxa como a grumos de cromatina compacta. Finalmente entre los estadios XII-XIII la marca es polarizada, mostrándose como "grandes motas" que están asociadas a cromatina compacta y se encuentra únicamente en el tiempo de incorporación de 24 h

El número total de células marcadas por tubo es mayor en los estadios VIII-IX del ciclo espermatogénico, con respecto a los otros estadios. Este periodo en el que se revela una mayor cantidad de células marcadas, corresponde a los estadios en los cuales se presentan los espermatocitos en preleptoteno en fase S meiótica. Por la cantidad de células marcadas, el tipo de marca y el estadio

en el que se encuentran los patrones anteriormente descritos, podemos proponer que es posible distinguir los diferentes tipos celulares, ya sean espermatogonias tipo B (estadios V-VI), espermatocitos en etapa de preleptoteno (estadios VIII-IX) o espermatocitos en etapas tempranas de la profase meiótica I como leptoteno o incluso cigoteno (estadios XII-XIII).

II. Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
CDK's	Proteínas cinasas dependientes de ciclinas que regulan el ciclo celular.
γH2AX	Forma fosforilada de la variante de histona H2AX que marca rompimientos de doble cadena.
Spo11	Topoisomerasa que participa en los rompimientos de doble cadena de ADN.
CS	Complejo sinaptonémico. Estructura tripartita ADN-proteica, conformada por dos elementos laterales (EL) y un elemento central (EC).
EL	Elemento lateral del complejo sinaptonémico, conformados principalmente por las proteínas SYCP2 y SYCP3.
FT	Filamentos transversos que forman parte del complejo sinaptonémico, conformados por dímeros de SYCP1.
EC	Elemento central del complejo sinaptonémico, conformado por los filamentos transversos, y las proteínas SYCE1, 2 y 3 así como Tex12.
SYCP1	Proteína del complejo sinaptonémico 1, principal componente del elemento central, dicha proteína forma dímeros unidos por medio de sus regiones amino terminales y sus regiones carboxilo terminal se asocian con los elementos laterales.
SYCP2	Proteína del complejo sinaptonémico 2 que junto con SYCP3 forma los elementos laterales del complejo sinaptonémico, de los cuales salen asas de cromatina.
SYCP3	Proteína del complejo sinaptonémico 3, uno de los principales componentes de los elementos laterales junto con la proteína estructural SYCP2.
SYCE1, 2 y 3 TEX12	Cuatro proteínas de reciente descubrimiento, que forman parte del elemento central del complejo sinaptonémico.
Fase S	Fase de <i>síntesis</i> de ADN.
REC8	Cohesina específica del proceso meiótico.
BrdU	Bromodesoxiuridina. Nucleótido sintético que es capaz de incorporarse durante la fase S en las células que están replicando su material genético.
CF	Contraste de fases.
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole; Compuesto químico fluorescente que tiene gran afinidad por el ADN

III. Introducción

III.1 Importancia de la reproducción sexual

La reproducción sexual no es absolutamente necesaria para que un organismo pueda reproducirse. Tanto es así, que los organismos unicelulares normalmente se reproducen mediante divisiones mitóticas; muchas plantas pueden reproducirse vegetativamente e incluso en el reino animal existen organismos que son capaces de reproducirse asexualmente; la reproducción asexual es un proceso simple y directo, que origina organismos genéticamente idénticos a los progenitores (Alberts *et al.*, 2008).

La reproducción sexual se lleva a cabo en plantas, animales e incluso organismos unicelulares como las levaduras (Lodish *et al.*, 2005) y en contraste con la reproducción asexual, mezcla los genomas de dos organismos (Alberts *et al.*, 2008). La combinación al azar del ADN de un organismo con el ADN de otro de la misma especie da lugar a descendencia con un nuevo genoma, de este modo se da la variabilidad genética. Para que esto suceda, la clave es el proceso de división celular altamente especializado denominado meiosis (Zimmer, 2009).

En organismos eucariotas superiores la meiosis está estrechamente relacionada con la gametogénesis. En hembras durante la ovogénesis, toda la población inicial de ovogonias entra en meiosis de manera sincrónica en el ovario fetal; pero ésta no es completada, ya que después del nacimiento se para el proceso meiótico durante la profase meiótica I en el dictioteno y no es restaurado sino hasta la pubertad. En el caso de los machos, en la espermatogénesis, se incluye el proceso meiótico y este ocurre durante la pubertad y la etapa adulta del organismo (Handel & Schimenti, 2010).

III.2 Espermatogénesis

El proceso espermatogénico en el caso de mamíferos ocurre en la unidad funcional de los testículos, los túbulos seminíferos (Xia *et al.*, 2005). El testículo está cubierto por una cápsula fibrosa, la túnica albugínea, y tiene dos

componentes principales, el espacio intersticial y el compartimiento compuesto por los túbulos seminíferos; que están formados por una membrana basal que da soporte estructural al epitelio seminífero. En algunas especies como el humano, el testículo está dividido por septos de tejido conectivo (figura 1) (Ross & Pawlina, 2007; Russel *et al.*, 1990).

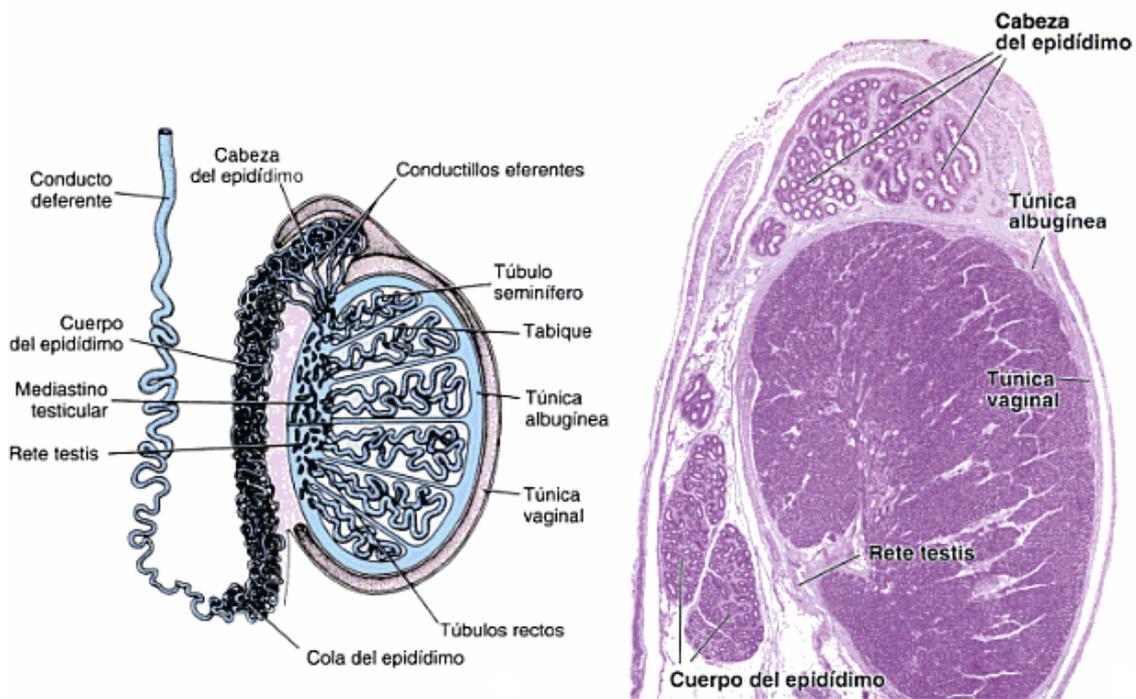


Figura 1. Arreglo morfológico del testículo humano. El esquema muestra a la izquierda, las estructuras anatómicas que conforman al testículo y un corte histológico del mismo a la derecha. Tomado de Ross y Pawlina (2008).

La espermatogénesis comprende la formación de espermatozoides a partir de células precursoras llamadas espermatogonias (Russell *et al.*, 1990). Durante ésta, ocurren una serie de complejos cambios estructurales y funcionales en las células germinales (Hermo *et al.*, 2010). Dicho proceso puede ser dividido en tres fases: 1) la proliferativa; en la cual las espermatogonias tienen rápidas divisiones mitóticas sucesivas, 2) la meiótica, que ocurre en los espermatocitos; durante este proceso complejo se da la recombinación y segregación del material genético; y por último 3) la de espermiogénesis, en la que las espermátidas sufren una serie de transformaciones abruptas, hasta convertirse en espermatozoides (Bellvé *et al.*, 1977; Russell *et al.*, 1990). Este proceso bien

definido y ordenado ocurre en los túbulos seminíferos de los testículos (Hermo *et al.*, 2010).

Las espermatogonias que se dividirán vía mitosis en la fase proliferativa, provienen de las células germinales primordiales (CPG), que migran hasta la gónada en desarrollo. Esto ocurre durante la embriogénesis del organismo, una vez que el organismo es sexualmente maduro, comienza la espermiogénesis (Alberts *et al.*, 2008).

La fase proliferativa se da en las células denominadas espermatogonias. En la rata existen seis sucesivas generaciones de diferentes tipos de espermatogonias: A1, A2, A3, A4, Intermedias y B (Hermo *et al.*, 2010). Estas células relativamente inmaduras sufren numerosas divisiones mitóticas y de este modo se obtiene una enorme población celular, que posteriormente, entrará en el proceso meiótico y finalmente se diferenciarán para así formar espermatozoides. De este modo se cubre la demanda de la cantidad de espermatozoides que necesitan la mayoría de los machos de todas las especies en etapa reproductora (Russell *et al.*, 1990).

La meiosis es esencial para la reproducción sexual, durante ésta, el número cromosómico diploide ($2n$), es reducido a la mitad (Kleckner, 1996). De modo que las espermatogonias más maduras, tipo B, se dividirán para dar lugar a espermatocitos primarios, que posteriormente entrarán en el proceso meiótico y formarán las espermátidas (Russell *et al.*, 1990).

Las espermátidas resultantes del proceso meiótico, se deshacen de gran parte de sus citoplasma en forma de cuerpos residuales, mismos que serán fagocitados por las células de Sertoli, además reordenan sus organelos y forman flagelos, para convertirse en espermatozoides. A este proceso se le conoce como espermiogénesis y se subdivide en cuatro fases: de Golgi, de cubierta, de acrosoma y de maduración (Gartner & Hiatt, 2001). En la rata, tienen que pasar alrededor de tres semanas para que el proceso espermiogénico se complete, este proceso ocurre sin necesidad de ninguna división celular, y es considerado una de las más sorprendentes transformaciones celulares que tienen lugar en un organismo adulto (Russell *et al.*, 1990).

La duración de la espermatogénesis varía de acuerdo al organismo; siendo de 35 días en el ratón, de 50 días en la rata y de 64 días en el humano (Adler, 1996; Guraya, 1987).

III.3 Ciclo del epitelio seminífero.

Cada túbulo seminífero, en el caso del humano, tiene una extensión de entre 30 y 70 cm de largo, son tubos que tienen un diámetro de entre 150 y 250 μm . Divididos en los dos testículos hay alrededor de 1000 túbulos seminíferos (Gartner & Hiatt, 2001). Cada túbulo está altamente enrollado y sus dos extremos finales se conectan con el inicio de la red testicular, los túbulos seminíferos se arreglan en el testículo de tal forma que si se realiza un corte histológico transversal es posible observarlos cortados de través (Russell *et al.*, 1990).

En cada túbulo cortado transversalmente se puede observar un arreglo celular bien definido, en el caso de la rata a lo largo del túbulo seminífero, si se realizan cortes seriados, es posible reconocer 14 diferentes arreglos (figura 2 y anexo 1), mismos que se repiten de manera cíclica (Hermo *et al.*, 2010; Leblond & Clermont, 1952). Históricamente a esta serie de cambios que se dan en el epitelio de los túbulos seminíferos se les ha denominado ciclo del epitelio seminífero; el cual ocurre en un tiempo determinado (Leblond & Clermont, 1952).

Se ha podido determinar que en el caso del ratón, hay 12 estadios; mientras que en el humano son 6. La duración del ciclo del epitelio seminífero es constante en cada especie, dura alrededor de 13 días en la rata, 8.65 días en el ratón, entre 10 y 11 días en los primates y unos 16 días en humanos (Hermo *et al.*, 2010).

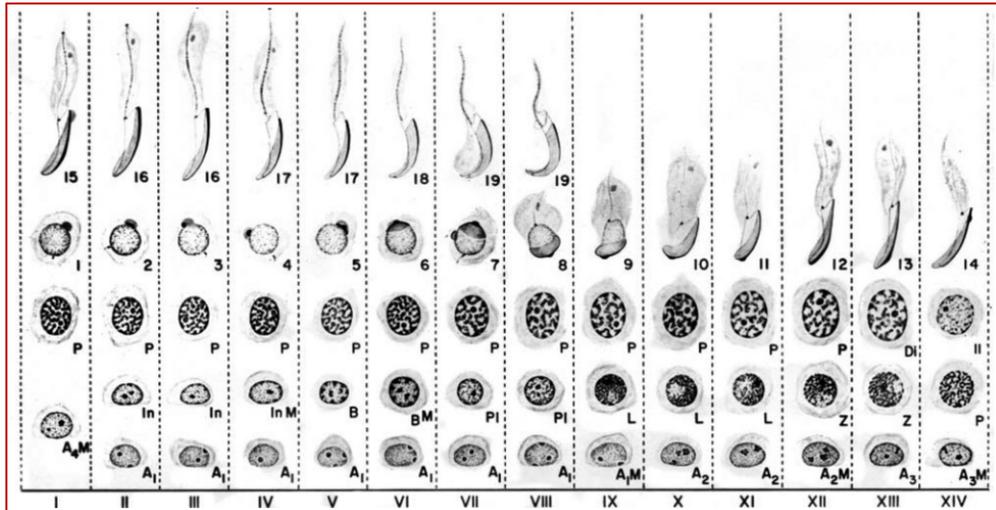


Figura 2. Esquema de los 14 diferentes estadios del ciclo del epitelio seminífero de rata. Cada estadio es representado con números Romanos I-XIV, las columnas verticales indican los tipos celulares que es posible identificar en cada uno de los estadios. Tomado y modificado de Hermo *et al.* (2010).

III.4 Onda espermatogénica

A lo largo del túbulo seminífero se repite el ciclo del epitelio seminífero; a la distancia entre dos etapas idénticas del epitelio seminífero se le conoce como onda del epitelio seminífero u onda espermatogénica, es decir, es la distancia que toma encontrar dos estadios idénticos del ciclo del epitelio seminífero (Gartner & Hiatt, 2001). La onda también puede ser definida como la distancia en el túbulo seminífero, que abarca el conjunto de estadios adyacentes, que incluyen las 14 posibles etapas del ciclo del epitelio seminífero (figura 3) (Hermo *et al.*, 2010; Russell *et al.*, 1990).

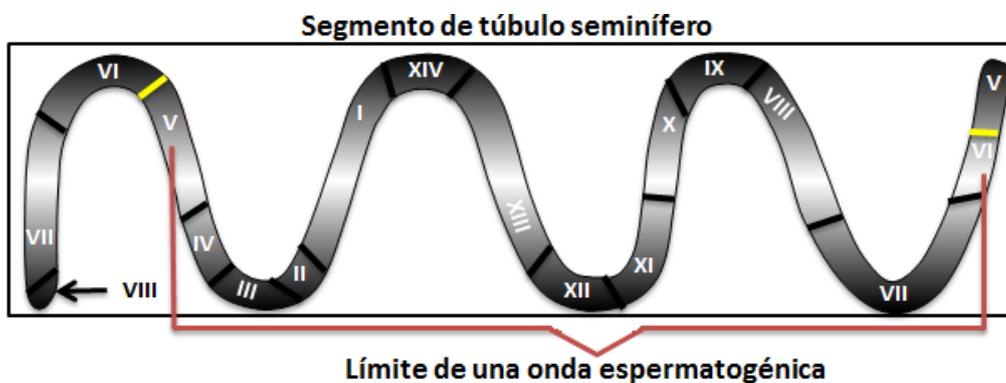


Figura 3. Estadios sucesivos de una onda espermatogénica mostrados a lo largo de un túbulo seminífero. Las líneas rojas representan los límites. Tomado y modificado de Russell *et al.* (1990).

III.5 Ciclo celular

Toda célula surge de una célula preexistente y se reproduce mediante la duplicación de su contenido y una posterior división celular (Csikász-Nagy *et al.*, 2011); al ciclo de interfase y división celular se le denomina ciclo celular (Imoto *et al.*, 2011), este mecanismo es esencial para que todos los seres vivos se reproduzcan. En especies unicelulares cada división produce un nuevo organismo completo; sin embargo, en especies pluricelulares, largas y complejas secuencias de divisiones celulares son necesarias para que un organismo sea funcional (Alberts *et al.*, 2008). Los organismos están conformados por colecciones de células que individualmente desempeñan funciones específicas únicas; cada célula eucariótica forma parte de una estructura compartimentalizada bien definida (Bernard, 1990).

Para que una célula pueda dividirse, deben suceder una serie de pasos coordinados en los cuales los componentes celulares internos se duplican, para que posteriormente, éstos se separen entre las dos células hijas resultantes de la división (Csikász-Nagy *et al.*, 2011).

El típico ciclo celular eucariótico puede ser dividido en cuatro diferentes fases: un G1, una fase de síntesis de ADN denominada fase S, un G2 y finalmente una fase M (figura 4) (Imoto *et al.*, 2011). Tanto la duplicación de las grandes cantidades de ADN contenidas en el núcleo, como su correcta segregación a las células hijas, definen las dos más importantes y complejas fases del ciclo celular, la fase S y la fase M (Alberts *et al.*, 2008).

En el ciclo celular hay dos períodos fundamentales, la interfase y la mitosis o división celular. La interfase se divide en tres períodos la fase gap 1 (G1) que sigue a la finalización de la mitosis (M) y es previa a la fase de síntesis de ADN (S); mientras que el G2 sucede entre la fase S y la fase M. La mayoría de las células requieren de mucho tiempo para crecer y duplicar su cantidad de proteínas, así como el número de organelos citoplasmáticos que contienen, esto ocurre durante el G1 (Lodish *et al.*, 2005).

Las fases gap también proveen a la célula de tiempo, para que ésta monitoree los factores ambientales, tanto internos como externos, en especial la fase de

G1 es importante en este sentido, ya que en caso de que las condiciones no sean favorables o de que la célula no esté preparada para seguir con el proceso de división, el ciclo celular es arrestado y la célula entra a una fase especializada de descanso denominada G0, esta fase puede durar días, semanas o incluso años enteros. Así cuando las condiciones ambientales vuelven a ser favorables, la célula sale del G0 y prosigue con el ciclo celular en un punto del G1 que es denominado inicio (en levaduras) o punto de restricción (en mamíferos), una vez que la célula pasa de este punto, está comprometida a pasar a la fase S y llevar a cabo la replicación de ADN incluso si las condiciones ambientales cambian de ser favorables a ser desfavorables (Alberts *et al.*, 2008; Csikász-Nagy *et al.*, 2011).

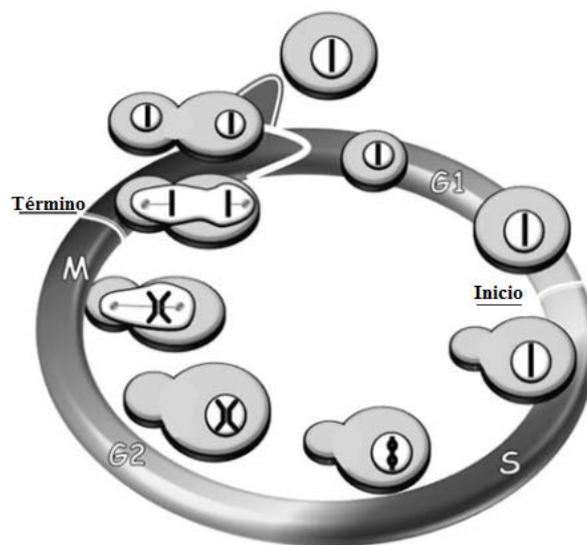


Figura 4. Ciclo celular típico. Este consta de 4 fases; dos fases gap denominadas G1 y G2, una fase de duplicación de ADN denominada fase S y una fase M. Tomado y modificado de Csikász-Nagy *et al.* (2011).

III.6 Regulación del ciclo celular

Las proteínas conocidas como cinasas dependientes de ciclina (CDK's, por sus siglas en inglés) son los principales componentes del sistema de control del ciclo celular. Estas proteínas producen cambios cíclicos en la fosforilación de proteínas intracelulares que se encargan de iniciar o regular los principales eventos del ciclo celular (Ej. condensación de los cromosomas, rompimiento de

la envoltura nuclear, ensamble del huso, etc.), los cambios cíclicos en la actividad de las CDK's, son regulados por las proteínas denominadas ciclinas, originalmente llamadas así debido a que son sintetizadas y degradadas en cada ciclo celular; como su nombre lo indica, si una proteína cinasa dependiente de ciclina no tiene unida a esta última, simplemente no posee actividad de cinasa (Alberts *et al.*, 2008).

En eucariontes superiores se tiene registro de aproximadamente 20 proteínas CDK's y de cuatro clases mayores de ciclinas (tipos A, B, D y E) en mamíferos, esto permite inferir que la regulación de los eventos del ciclo celular ocurren debido a complejas combinaciones de CDK's y ciclinas (Satyanarayana & Kaldis, 2009), En el caso de la meiosis, son múltiples los mecanismos que operan en la regulación del ciclo celular, entre los cuales se encuentran las actividades de tanto CDK's como ciclinas, algunas de ellas específicas del proceso meiótico (figura 5) (Marston & Amon, 2004).

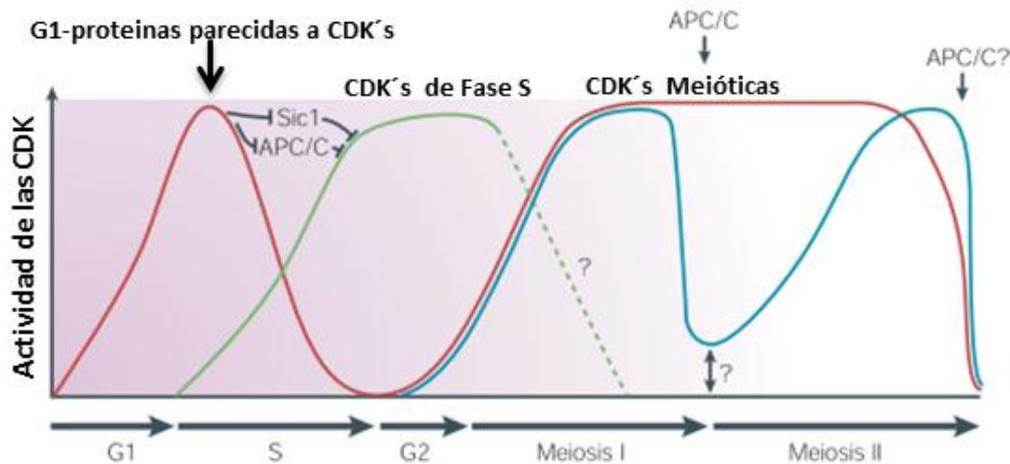


Figura 5. Regulación del ciclo celular meiótico por medio de proteínas cinasas dependientes de ciclinas. Algunas de estas proteínas CDK's son meiosis específicas. Tomado y modificado de Marston & Amon (2004).

III.7 Meiosis

La meiosis es el proceso de división celular altamente especializado y caracterizado por tener una ronda de replicación de ADN, seguida de dos divisiones nucleares, denominadas meiosis I y meiosis II (Cha *et al.*, 2000; Zickler & Kleckner, 1998), también es la vía de especialización y diferenciación celular por la cual un organismo diploide genera gametos haploides. Proceso

que es indispensable para la reproducción sexual (Jaramillo-Lambert *et al.*, 2007), durante la meiosis se lleva a cabo la recombinación de material genético entre cromosomas homólogos (recombinación entre cromosomas paternos y maternos), fenómeno que junto con la segregación cromosómica al azar, es fuente importante de la diversidad genética (Cohen *et al.*, 2006). De una célula diploide que entra al proceso de división celular denominado meiosis, se producen un total de cuatro células con el número cromosómico reducido a la mitad (haploides) (Zickler & Kleckner, 1998). Durante la primera división meiótica, los cromosomas homólogos se separan y migran hacia polos opuestos y es durante la segunda división meiótica que el número cromosoma se divide a la mitad ya que las cromátidas hermanas se separan una de otra y se generan gametos haploides (figura 6) (Lee & Amon, 2001).

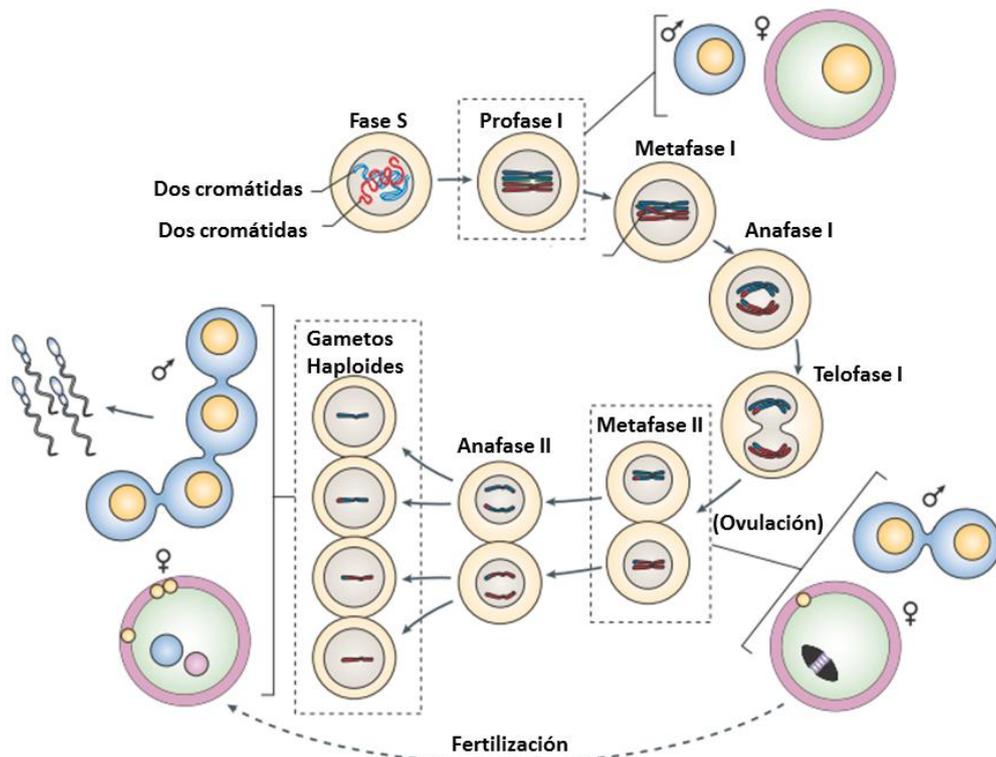


Figura 6. Esquema del proceso meiótico en mamíferos. De una célula diploide, se generan cuatro células haploides en machos y una en hembras. En la meiosis I se separan los cromosomas homólogos, mientras que en la meiosis II son las cromátidas hermanas las que se separan. Tomado y modificado de Handel & Schimenti (2010).

III.7.1 Profase meiótica:

La primera división meiótica está caracterizada por tener una profase I de larga duración, misma que se divide en 5 etapas: leptoteno, cigoteno, paquíteno, diploteno y diacinesis, durante dichas etapas se da una serie de abruptos cambios conformacionales de la cromatina, indispensables para el correcto alineamiento, apareamiento y sinapsis entre cromosomas homólogos (Hernández-Hernández *et al.*, 2009; Zickler & Kleckner, 1998; Russell *et al.*, 1990).

III.7.2 Leptoteno:

Durante la etapa de leptoteno, los cromosomas son visiblemente individualizados como estructuras delgadas filamentosas (Zickler & Kleckner, 1998), estas estructuras se condensan pero no presentan aún señales de un alineamiento homólogo (Page & Hawley, 2004). Las cromátidas hermanas se organizan y forman estructuras denominadas elementos axiales y la mayoría de los cúmulos de cromatina compacta son disociados (Hernández-Hernández *et al.*, 2009; Zickler & Kleckner, 1998).

Durante el leptoteno medio, la proteína Spo11 participa en las rupturas de doble cadena; esto trae como consecuencia el reclutamiento de proteínas relacionadas con la reparación de dichos rompimientos, mismas que estabilizan la asociación entre cromosomas homólogos, y a su vez esta asociación, es de vital importancia para una correcta formación del complejo sinaptonémico en estadios posteriores al leptoteno (Longhese *et al.*, 2009; Keeney *et al.*, 1997).

Los rompimientos de doble cadena producidos por Spo11 traen como consecuencia la fosforilación de la variante de histona H2AX (γ H2AX), esta modificación de histona permanece en cromosomas autosómicos desde leptoteno tardío hasta cigoteno; sin embargo γ H2AX en estadios posteriores como el paquíteno ya no es observada sobre los cromosomas autosómicos y su distribución se ve limitada a una región de cromatina condensada, en la que los cromosomas sexuales se encuentran apareados, el cuerpo XY. La función de esta modificación de histona, es la de marcar al ADN dañado, para así reclutar enzimas de reparación y recombinación (Fernandez-Capetillo *et al.*,

2004; Hernández-Hernández *et al.*, 2009; Keeney *et al.*, 1997; Longhese *et al.*, 2009).

III.7.3 Cigoteno:

Durante esta etapa de la profase, los cromosomas se visualizan más cortos y anchos; hay indicaciones de que los homólogos se encuentran más cercanos, tales como la formación del “bouquet” (figura 7), en donde las regiones teloméricas de los cromosomas tienen un arreglo especial; que se caracteriza por que todos los extremos terminales de los cromosomas están unidos a la cara interna de la envoltura nuclear y se localizan agrupados en un área limitada (placa de adhesión) (Zickler & Kleckner, 1998).

Se ha sugerido que la formación del “bouquet” está implicada en el proceso de reconocimiento de homología y el posterior apareamiento de los cromosomas homólogos, debido a que se acercan y se alinean las partes finales de los cromosomas (Harper *et al.*, 2004); en diversos organismos el bouquet persiste hasta etapas tempranas del paquíteno (Zickler & Kleckner, 1998; Harper *et al.*, 2004).

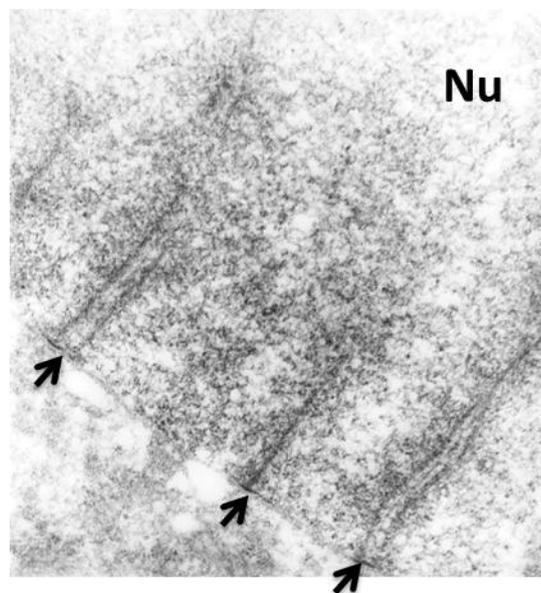


Figura 7. Micrografía electrónica de una célula germinal en etapa de cigoteno en donde se muestran el núcleo (Nu). Los telómeros de los cromosomas están adheridos a una pequeña zona de la envoltura nuclear formando el bouquet (flechas). Esta proximidad de las regiones teloméricas de los diferentes

cromosomas facilita el apareamiento de los cromosomas homólogos. Imagen cortesía de Rosario Ortiz Hernández.

III.7.4 Paquíteno:

En esta etapa los cromosomas se hacen más cortos y la asociación establecida se fortalece con la formación del complejo sinaptonémico (CS). Esta asociación es visible como una estructura tripartita ADN-proteica, misma que consiste en 2 elementos laterales (EL) apareados, que se unen mediante filamentos transversos (FT), que se encuentran acomodados de manera perpendicular a los EL. Un elemento central (EC) corre paralelamente a los EL y perpendicular a los FT, por el espacio que se dibuja en la parte central (zona de exclusión de cromatina) que se encuentra entre los dos EL (figura 8) (Hernández-Hernández *et al.*, 2009).

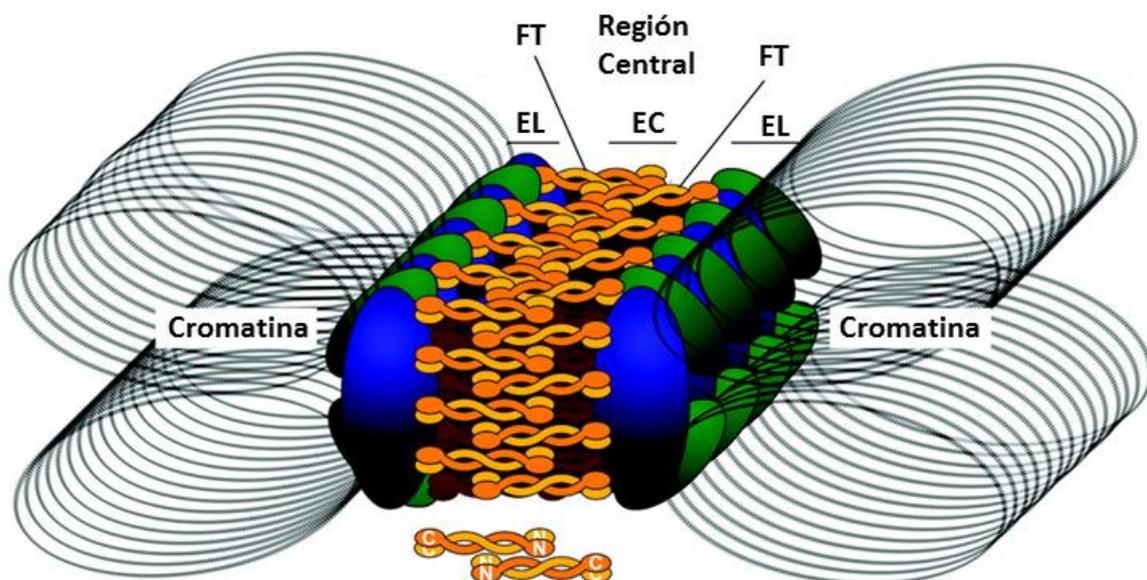


Figura 8. Representación de complejo sinaptonémico conformado por dos elementos laterales (EL) de los cuales salen asas de cromatina y un elemento central (EC) conformado por los filamentos transversos. Tomado y modificado de Page & Hawley (2004).

Cada elemento lateral está conformado por las proteínas SYCP2 y SYCP3, de los cuales salen asas de cromatina (figuras 8 y 9); el elemento central está constituido por los filamentos transversos que tienen como principal componente a la proteína SYCP1, la cual forma dímeros que se unen por medio de sus regiones amino terminales, de modo que las regiones carboxilo

terminal se asocian con los elementos laterales. Otras proteínas de reciente descubrimiento se ha observado que constituyen parte del elemento central, ellas son: SYCE1, SYCE2, SYCE3 y TEX12 (figura 9) (Fraune *et al.*, 2012).

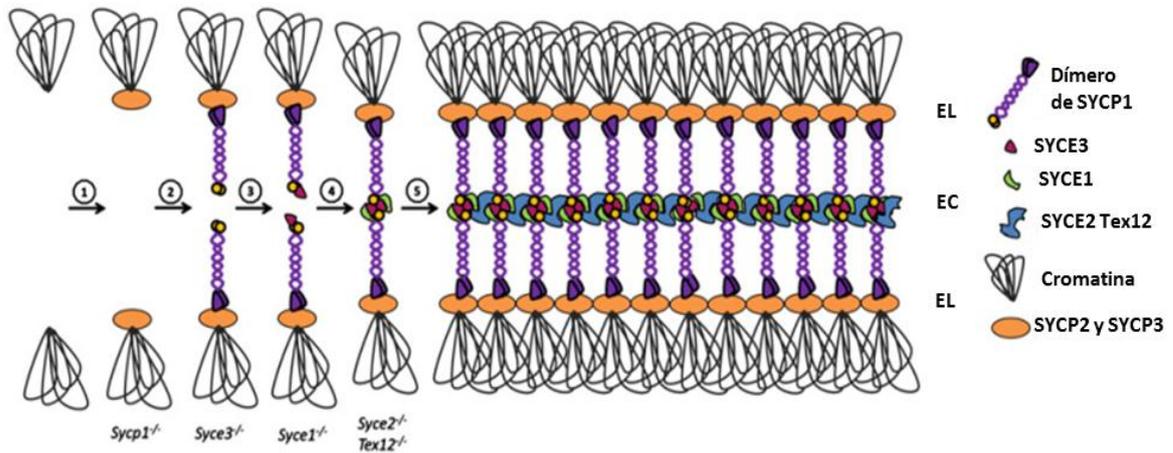


Figura 9. Representación de las proteínas que constituyen el complejo sinaptonémico. Los elementos laterales están conformados por las proteínas SYCP 2 y SYCP3; mientras que el elemento central está constituido principalmente por dímeros de SYCP1, así como por SYCE1, SYCE2, SYCE3 y TEX12. Tomado y modificado de Fraune *et al.* (2012).

III.7.5 Diploteno:

Desde la etapa de paquíteno, los cromosomas homólogos sufren una decondensación gradual que dura hasta la etapa de diploteno (Hernández-Hernández *et al.*, 2009), en esta última etapa también ocurre el desensamble del complejo sinaptonémico, los cromosomas homólogos se separan, excepto en los quiasmas, éstos mantienen juntos a los cromosomas homólogos y son observados hasta etapas tardías de la profase meiótica I. Los quiasmas son la manifestación física de los eventos de recombinación recíproca entre cromosomas homólogos (figura 10) (Page & Hawley, 2004). En hembras la profase meiótica es arrestada en el diploteno, en un estado especial denominado estado dictiado, esta detención puede durar meses en el caso de ratones de laboratorio o incluso años como en el caso del humano (Handel & Schimenti, 2010).

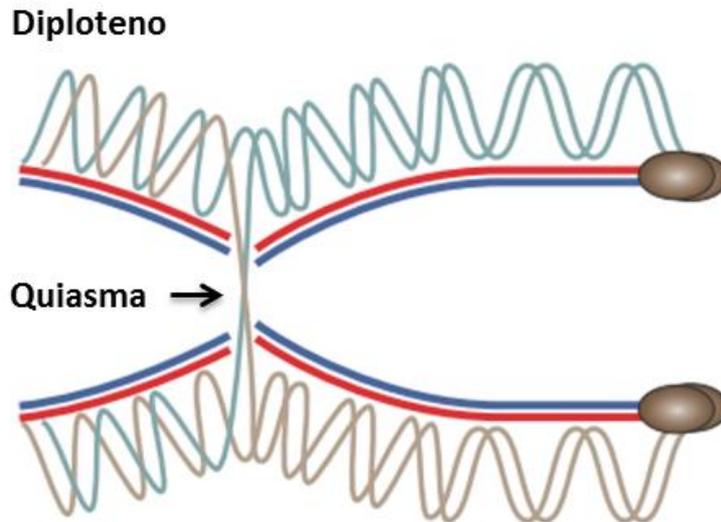


Figura 10. Representación de un quiasma. El quiasma es la evidencia de que se llevó a cabo el intercambio de material genético (recombinación) entre cromosomas homólogos. Tomado y modificado de Handel & Schimenti (2010).

III.7.6 Diacinesis:

Durante la diacinesis, los cromosomas sufren una última etapa de condensación, justo antes de la disociación de la envoltura nuclear y el posterior inicio de la metafase I (Harper *et al.*, 2004).

III.7.7 Segunda división meiótica:

La segunda división meiótica se lleva a cabo sin una previa replicación de ADN, esta ocurre de manera rápida y se asemeja más a una división mitótica. En la cual se separan las cromátidas hermanas y posteriormente son segregadas, para así producir células haploides, por cada célula diploide que experimenta el proceso meiótico, se producen un total de cuatro células hijas con carga cromosómica haploide, cada célula hereda una copia de cada uno de los cromosomas ya sea paterno o materno, conformados por un sola cromátida (figura 6) (Alberts *et al.*, 2008).

III.8 Síntesis de ADN pre-meiótica

Se considera que el proceso meiótico se inicia desde la etapa del G1 del ciclo celular, y que las células que entrarán en meiosis pasan por una fase de síntesis de ADN singular, denominada fase S pre-meiótica (Watanabe *et al.*, 2001). En todos los organismos la fase S pre-meiótica es sustancialmente más larga que la fase S pre-mitótica (Callan, 1972; Lee & Amon, 2001).

Estudios en levaduras sugieren que la duración de la fase de síntesis meiótica está involucrada con los productos de ciertos genes, tales como *SPO11*, ya que la delección de este gen acorta significativamente la duración de la fase S pre-meiótica, así como la delección del gen *REC8*, se traduce en un aumento en la duración de la fase de síntesis de ADN pre-meiótica, los productos de ambos genes se consideran importantes para integrar las relaciones interhomólogas y relaciones intercromátidas hermanas, con la replicación de ADN en curso (Cha *et al.*, 2000).

Otros resultados sugieren que la síntesis de *novo* de ADN durante la fase S pre-meiótica es fundamental para procesos dependientes de la proteína Rec8 durante etapas posteriores de la meiosis (Watanabe *et al.*, 2001). Diversos reportes señalan que los complejos de cohesinas específicos de la meiosis son establecidos durante la fase de síntesis de ADN y disociados posteriormente en la etapa de G2, al menos en levaduras (Uhlmann & Nasmyth, 1998).

En ratón la fase de síntesis de ADN pre-meiótica dura aproximadamente 20.6 h, en el caso de la rata tiene una duración de 84.1 h y en el humano dura alrededor de 62.4 h (tabla 1) (Adler, 1996). Se cree que una fase S tan larga en estos casos, es requerida para establecer relaciones que serán necesarias para la recombinación y la correcta segregación de los cromosomas homólogos en etapas posteriores, conforme avance el proceso meiótico (Lee & Amon, 2001).

Los primeros estudios para el análisis del ciclo celular y la síntesis de ADN en espermatogonias y espermatocitos de ratón, incluían el marcado de células que estaban en proceso de replicación de ADN con compuestos radioactivos tales como la timidina tritiada, lo que permitía posteriormente poner de manifiesto la

incorporación del nucleótido marcado con la ayuda de técnicas autoradiográficas, que proporcionan la ventaja de tener un poder de resolución muy alto, pero la desventaja de que lleva mucho tiempo obtener los resultados (Monesi, 1962a). Estudios parecidos utilizando también incorporación de timidina tritiada y la posterior detección con ayuda de técnicas autoradiográficas fueron realizados en rata (Clermont, 1962).

Tabla 1. Duración de la fase de *Síntesis* meiótica (recuadro rojo), así como de los estadios de la profase I (leptoteno, cigoteno, paquíteno y diploteno) y de la primera y segunda división meiótica. Los valores se dan en horas y entre los paréntesis en días. Tomado y modificado de Adler (1996).

	Ratón	Rata	Humano
Preleptoteno (última fase S)	20.6 (<1.0)	84.1 (3.5)	62.4 (2.5)
Leptoteno	44.0 (2.0)	21.3 (1.0)	134.4 (5.5)
Cigoteno	32.7 (1.5)	49.9 (2.0)	26.4 (1.0)
Paquiteno	193.7 (8.0)	270.1 (11)	355.2 (15)
Diploteno	21.4 (<1.0)	17.6 (<1.0)	-
Primera y Segunda división meiótica	20.8 (<1.0)	14.1 (>0.5)	26.4 (1.0)
Total	333.2 (14)	457.1 (19)	604.8 (25)

Posteriormente se desarrollaron métodos no radioactivos, mediante la incorporación de BrdU, la cual es una desoxiuridina halogenada; compuesto que tiene características químicas y moleculares muy parecidas a las de la base nitrogenada timina, lo cual la convierte en su análogo, estas características sirven para que se incorpore durante la fase S en las células que están replicando su material genético, la BrdU puede ser inmunolocalizada gracias a que se crearon anticuerpos especiales para detectarla, esto brinda la ventaja de no utilizar técnicas autorradiográficas por lo cual se puede realizar la detección en menos tiempo y con mayor resolución (Rosiepen *et al.*, 1994); de este modo es posible evidenciar la síntesis de ADN de manera espacio temporal.

IV. Justificación del trabajo:

La profase meiótica I por su larga duración y por la serie de sucesos que ocurren durante ésta, como el reconocimiento, apareamiento y recombinación entre cromosomas homólogos, es la etapa de la meiosis a la cual se le ha puesto mayor atención, es también la más ampliamente estudiada y de la que se tiene más información.

De modo que se han dejado de lado etapas anteriores a la profase I, como lo es la fase de síntesis de ADN denominada fase de síntesis meiótica o fase de síntesis pre-meiótica, de la cual se tienen muchas incógnitas, por ejemplo, su larga duración con respecto a la fase de síntesis de ADN mitótica. Más aún, de los pocos estudios que centran su atención en ésta fase, la mayoría están realizados en levaduras y son de carácter bioquímico (Cha *et al.*, 2000; Uhlmann & Nasmyth, 1998). Por lo que representa una de las grandes incógnitas para aquellos que estudiamos el proceso meiótico, por tanto, este trabajo busca aportar información sobre el entendimiento de la fase de síntesis pre-meiótica en mamíferos, específicamente en la línea germinal de rata macho.

V. Hipótesis:

- Empleando diferentes tiempos de exposición de BrdU, se podrán observar diferentes disposiciones en cuanto al arreglo de la cromatina que incorporó BrdU, lo que se reflejará en cambios morfológicos entre el tipo de marca de las células en fase S mitótica con respecto al de las células en fase S meiótica. Las células marcadas a los distintos tiempos de incorporación corresponderán a diferentes tipos celulares de la línea germinal de rata macho.

VI. Objetivo General:

- Caracterizar el patrón de la disposición de la cromatina, mediante incorporación de BrdU aplicada a diferentes tiempos de exposición en células de la línea germinal, que estén llevando a cabo procesos de replicación de ADN.

VI.1 Objetivos particulares:

- Analizar el arreglo espacial de la cromatina que incorporó BrdU en células que estén llevando a cabo síntesis de ADN (fase S).
- Definir si la disposición de la cromatina que incorporó BrdU nos permite detallar diferencias entre las células que están llevando a cabo fase S.
- Relacionar el arreglo de la cromatina que llevó a cabo incorporación de BrdU con los estadios del ciclo espermatogénico en los cuáles se encuentren las células en fase S.

VII. Material y Métodos

VII.1 Material biológico.

Se utilizaron 3 ratas Wistar adultas por cada uno de los tiempos de incorporación de BrdU realizados (30 minutos, 2, 3 y 24 horas), estas ratas fueron proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

VII.2 Incorporación de BrdU y extracción de tejido.

Se realizó la incorporación de BrdU *in vivo* mediante inyección intraperitoneal, la cantidad de BrdU inyectada es de 60 mg de BrdU por Kg (peso de la rata) como lo describe el protocolo del "kit" Roche (Catálogo N° 1,296,736). Después de la inyección intraperitoneal, se esperó el tiempo planeado (entre 0 minutos, 30 minutos, 2, 3 y 24 horas), y minutos antes de concluir el lapso de incorporación, se procedió a inyectar el anestésico pentobarbital a razón de 1 mL por cada 2.5 Kg de peso. Una vez anestesiado el animal y concluido el tiempo requerido de incorporación de BrdU, se procedió a extraer el material biológico (en este caso los testículos e intestino), finalmente se sacrificó al animal.

VII.3 Deshidratación, pre-inclusión e inclusión de túbulos seminíferos e intestino de rata en parafina.

Las muestras de testículo e intestino se fijaron en paraformaldehído al 4% por 24 horas, posteriormente se procedió a deshidratar las muestras en alcoholes graduales desde etanol al 30% (30 min), etanol al 50% (30 min), etanol al 60% (30 min), etanol al 70% (toda la noche), etanol al 80% (30 min) etanol al 90% (30 min), etanol al 96% (30 min), 2 cambios de etanol absoluto (de 30 min cada cambio), etanol absoluto-xilol (30 min), aceite de cedro-xilol (30 min), xilol (solo un enjuague de 5 min). Una vez concluida la deshidratación y aclarado, se pasó a la pre-inclusión que consistió en pasar las muestras por parafina-xilol (1

hora), parafina 1 (1 hora), parafina 2 (1 hora) y finalmente el material se incluyó, en este caso sin una orientación determinada.

VII.4 Corte del material biológico.

Una vez incluido el material biológico se procedió a realizar cortes histológicos de un espesor de alrededor de 5 μm , esto con ayuda de un micrótopo para realizar cortes en parafina, los cortes hechos fueron montados en portaobjetos cubiertos con Poli L-lisina, compuesto químico aniónico que por medio de carga eléctrica ayuda a mantener adheridos los cortes al portaobjetos, para que en manipulaciones posteriores, tales como tinciones o inmunolocalizaciones, éstos no se desprendan.

VII.5 Desparafinar e hidratar.

Para poder utilizar el material incluido en parafina, para tinciones generales o para inmunolocalizaciones, fue necesario después del corte, desparafinar e hidratar para lo cual se colocan los portaobjetos con el material biológico 10 min. Posteriormente se colocaron en una estufa a 60° C, Xilol 5 min, etanol absoluto 5 min, etanol 90% 5 min, etanol 70% 5 min, etanol 50% 5 min, etanol 30% 5 min y finalmente agua bidestilada por 5 min. Posteriormente, se procedió con las técnicas histológicas o inmunohistológicas que se necesitaba realizar.

VII.6 Tinción hematoxilina y eosina (H y E).

Con el objetivo de evaluar la calidad del tejido obtenido, después del procesamiento, la inclusión y el corte, se realizaron tinciones generales de hematoxilina y eosina, este material de igual manera sirvió para ilustrar los diferentes estadios de la onda espermatogénica en los cuales se encontró marca (figuras 17, 18 y 21), para lo cual primero se desparafinó e hidrató el tejido.

Una vez hidratado el tejido, se tiñó con hematoxilina de Harris 10 min, se lavó 10 min en agua corriente y se enjuagó con agua bidestilada. Después se deshidrató con etanol al 30% 3 min, luego a etanol 50% 3 min, etanol 70% 3 min, eosina 3 min, luego etanol 80% solo enjuague, etanol 90% solo enjuague, etanol absoluto solo enjuague, xilol-etanol absoluto 1:1 por 5 min, xilol 10 min y finalmente se montó con la ayuda de resina sintética y un cubreobjetos.

VII.7 Inmunolocalización de la BrdU.

Una vez analizado el tejido mediante la técnica de H y E, y en vista de que el material era apto para el estudio, es decir, que estaba bien fijado y por tanto tenía una buena preservación estructural, se procedió a realizar la inmunolocalización de la BrdU, para lo cual se utilizó un “kit” de detección de la marca Roche (Nº de catálogo 1,296,736), mismo que incluye en su buffer enzimas desnaturadoras de la doble hebra de ADN, por lo que no es necesario realizar desnaturación con HCl, esto evita alteraciones en la morfología celular.

Para realizar la inmunolocalización, primero se desparafinó e hidrató el tejido (tanto testículo como intestino), ya hidratado el tejido se colocó en buffer PBS por 5 min, pasado este tiempo se realizó la recuperación antigénica con buffer de citratos y con ayuda de un horno de microondas (3 min en potencia 10 y 6 min en potencia 3, en baño maría), se dejó enfriar por 30 min. Pasado este tiempo se procedió a realizar un bloqueo de epítopes inespecíficos, para esto se utilizó glicina a una concentración de 0.1 M diluida en PBS, lo que se realizó a temperatura ambiente (TA) por un periodo de 1 hora.

Terminado el bloqueo, se procedió a colocar el anticuerpo primario, el cual se diluyó en el buffer del “kit” a una concentración de [1/100] y se dejó incubar por 1 hora a 37 °C (ya que esta es la temperatura óptima para que las enzimas desnaturalicen el ADN) en cámara húmeda. Terminado el tiempo de incubación del anticuerpo primario, se lavaron las preparaciones con TBST por 5 min y posteriormente con PBS también por 5 min.

Después de los lavados, se procedió a colocar el anticuerpo secundario acoplado a rojo Texas (RT) a una concentración de [1/200] diluido en PBS, se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y protegido de la luz; posteriormente se lavaron las preparaciones con TBST por 5 min y luego con PBS también por 5 min. Después de los lavados, se procedió a teñir las preparaciones con DAPI, lo que permite la observación del DNA; se dejó solo 1 minuto en DAPI, se lavó el material con PBS por 5 min y finalmente se le colocó medio de montaje VectaShield, un cubreobjetos y esmalte para sellar ya que el fluorocromo que trae acoplado el anticuerpo secundario (en este caso RT) es propenso a perder intensidad con el tiempo, pero más aún con la oxidación.

VII.8 Observación de las preparaciones.

La observación de las inmunofluorescencias se llevó a cabo con un microscopio Nikon. La obtención de las imágenes se realizó con ayuda de la cámara Nikon Digital Camera DXM1200F. Las imágenes obtenidas fueron procesadas en un software Nikon ACT-1. Finalmente, la edición de las imágenes se realizó con un software Adobe Photoshop CS5.

VII.9 Conteo de células positivas.

Por células positivas nos referimos, en este trabajo, a todas las células que presenten marca en Rojo Texas después de realizar la inmunolocalización contra el compuesto químico BrdU (como previamente se describe), en cortes por parafina. Y por células "*posiblemente marcadas*" se hace referencia a todo tipo celular, con marca o no, pegado a la membrana basal (espermatogonias A y B, preleptotenos, espermatoцитos primarios en leptoteno y cigoteno) anterior a la fila de células en paquíteno y que no fueran células de Sertoli o células peritubulares.

Para realizar el conteo de células se tomaron fotografías a túbulos seminíferos individuales a aumentos de 40X de la siguiente manera:

En cada uno de los tiempos de incorporación, se fotografió cualquier túbulo seminífero que tuviera marca positiva para la BrdU (en Rojo Texas), sin importar su tamaño u orientación del corte (corte longitudinal, transversal u oblicuo), incluso si esto significaba tomar muchas fotografías para el caso de túbulos muy grandes y/o cortados de manera longitudinal u oblicua o pocas fotografías para los pequeños y/o cortados de manera transversal. Cada túbulo fotografiado en rojo Texas también fue fotografiado en DAPI. Este procedimiento fue el mismo para cada tiempo, para cada tipo de marca y para cada animal, hasta completar un total de 30 túbulos seminíferos por tipo de marca y por cada tiempo, esto se ejemplifica de mejor manera en las siguientes tablas:

Tabla 2. Manera en que se contaron los túbulos seminíferos para lo que en este trabajo fue denominado marca tipo 1.

	Número de túbulos contados por tiempo de incorporación de la BrdU			
Rata	30 min	2 horas	3 horas	24 horas
1	10 túbulos	10 túbulos	10 túbulos	10 túbulos
2	10 túbulos	10 túbulos	10 túbulos	10 túbulos
3	10 túbulos	10 túbulos	10 túbulos	10 túbulos
Total	30 túbulos	30 túbulos	30 túbulos	30 túbulos

Tabla 3. Manera en que se contaron los túbulos seminíferos para lo que en este trabajo fue denominado marca tipo 2.

	Número de túbulos contados por tiempo de incorporación de la BrdU			
Rata	30 min	2 horas	3 horas	24 horas
1	10 túbulos	10 túbulos	10 túbulos	10 túbulos
2	10 túbulos	10 túbulos	10 túbulos	10 túbulos
3	10 túbulos	10 túbulos	10 túbulos	10 túbulos
Total	30 túbulos	30 túbulos	30 túbulos	30 túbulos

Tabla 4. Manera en que se contaron los túbulos seminíferos para lo que en este trabajo fue denominado marca tipo 3.

Rata	Número de túbulos contados por tiempo de incorporación de la BrdU
	24 horas
1	10 túbulos
2	10 túbulos
3	10 túbulos
Total	30 túbulos

Para tener una estimación del número de células marcadas y cómo es que éste variaba entre un tipo de marca y otro, en cada túbulo seminífero con ayuda del DAPI se contaron todas las células “*posiblemente marcadas*” (ver explicación de la figura 11A) que fueran de interés para este estudio, es decir, espermatogonias A, espermatogonias B, preleptotenos, espermátocitos primarios en leptoteno y espermátocitos primarios en cigoteno, que están pegadas a la membrana basal y por lo tanto se localizan más cerca de la basal que la fila de células en etapa de paquíteno. Se excluyeron a todas las células somáticas (células peritubulares y células de Sertoli) y todas las células germinales en etapa de paquíteno, diploteno y en espermiogénesis como son espermátidas redondeadas y elongadas (ver figuras 11A y 11B).

Posteriormente, con ayuda del Rojo Texas, se procedió a contar el número de células marcadas en el mismo túbulo seminífero, que se realizó con ayuda del programa informático manejador de imágenes Image J. Con esto se estimó un **índice de marcado**, para cada túbulo seminífero, dado por la relación del número de células marcadas (contadas en las fotografías de Rojo Texas) dividido entre la suma del número de células marcadas más las células que podrían estar marcadas pero que no lo estaban (contadas con ayuda del DAPI). Dicho índice de marcado varía en el rango de cero a uno. Donde cero sería igual a ninguna célula marcada y uno significaría que todas las células posiblemente marcadas mostraron marca (ver resultados y figura 11C).

Adicionalmente se estimó el promedio del **índice de marcado** de los túbulos seminíferos analizados por cada tiempo, así como su desviación estándar,

también se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) a los promedios del **índice de marcado** comparando tiempos de incorporación de BrdU, para conocer la existencia de diferencias significativas entre los datos muestreados, a los datos que mostraron diferencias se les realizó una prueba de rangos múltiples (Duncan), para localizar dicha diferencia.

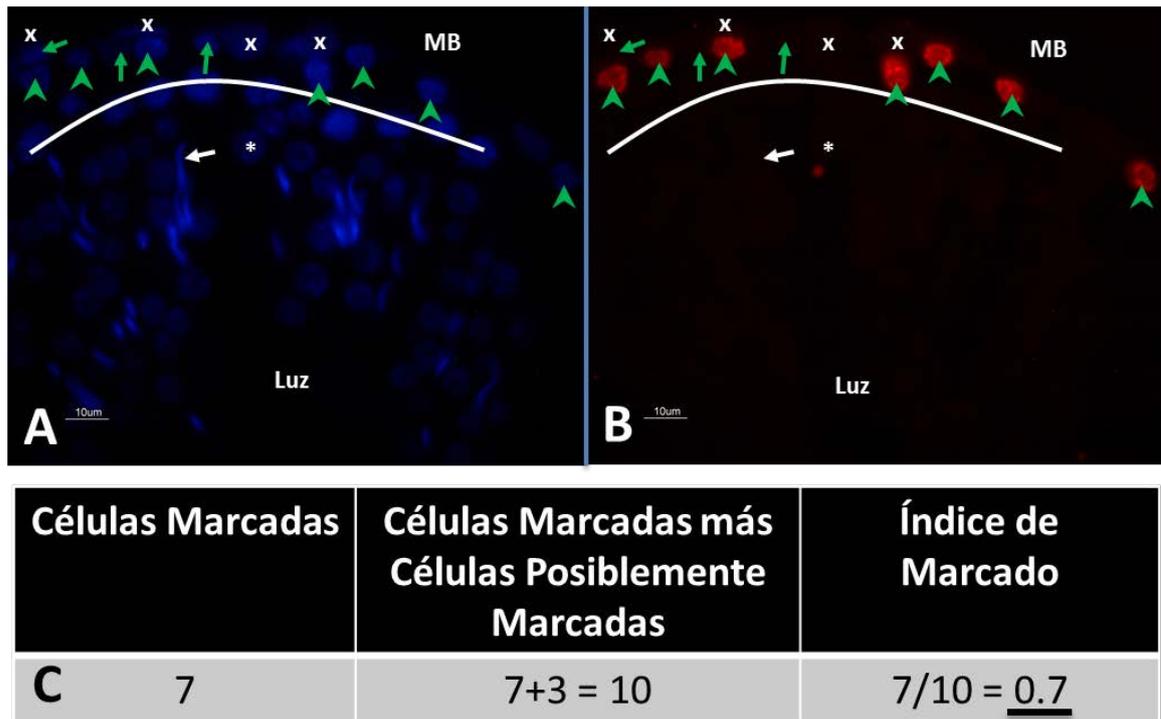


Figura 11. Representación de la manera en que se realizó el conteo de células positivas. En A se muestra el DAPI. La curva de color blanco pasa justamente por la capa de células germinales en etapa de paquíteno; las células germinales que se encuentran por encima de la línea mencionada, pegadas a la membrana basal (MB), fueron analizadas para realizar el conteo. Las cabezas de flecha verdes señalan células positivas a la BrdU, esto se puede corroborar en la figura B marcadas con rojo Texas. Las flechas verdes representan a las células que no son positivas, pero que también fueron analizadas y tomadas como “*posiblemente marcadas*”. Las células somáticas (peritubulares y de Sertoli), marcadas con una x de color blanco fueron excluidas en el conteo. Por debajo de la línea de células en etapa de paquíteno, hacía la luz del túbulo (Luz), se observan espermatogonias redondeadas (asterisco blanco) y espermatogonias elongadas (flecha blanca), células en etapa de espermiogénesis que tampoco fueron tomadas en cuenta para el conteo. En C se ejemplifica el **índice de marcado** para A, dado por la relación entre las células marcadas y la suma de las células marcadas más las posiblemente marcadas; en este caso el valor es de 0.7.

VIII. Resultados:

VIII.1 Incorporación de BrdU a 0 minutos.

La incorporación de BrdU a 0 minutos, se realizó con la finalidad de tener un control negativo de la técnica, por lo que se inyectó intra-peritonealmente a la rata con la BrdU a la misma razón de peso/volumen (ver material y métodos) que a las demás e inmediatamente después de inyectarla se procedió a anestésarla, a extraer el tejido y a procesarlo. Como era de esperarse, los resultados muestran que ninguna célula germinal de ningún túbulo seminífero incorporó BrdU (figura12).

Con esto se aseguró que ni el material biológico, ni cualquier compuesto químico utilizado en el procesamiento, causaran inespecificidad en alguna de las reacciones de inmunolocalización realizadas.

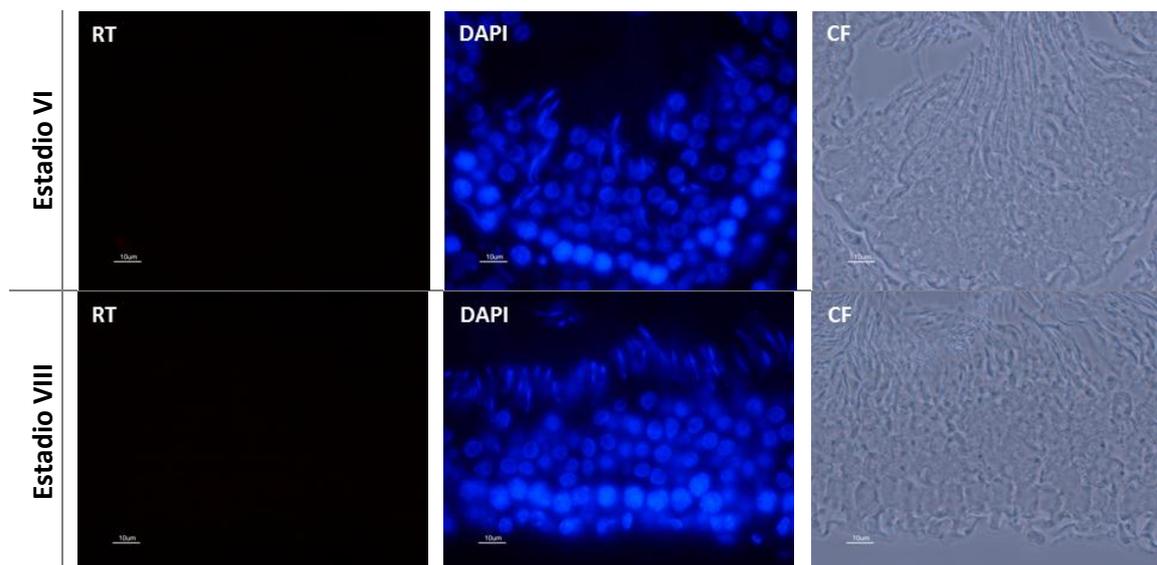


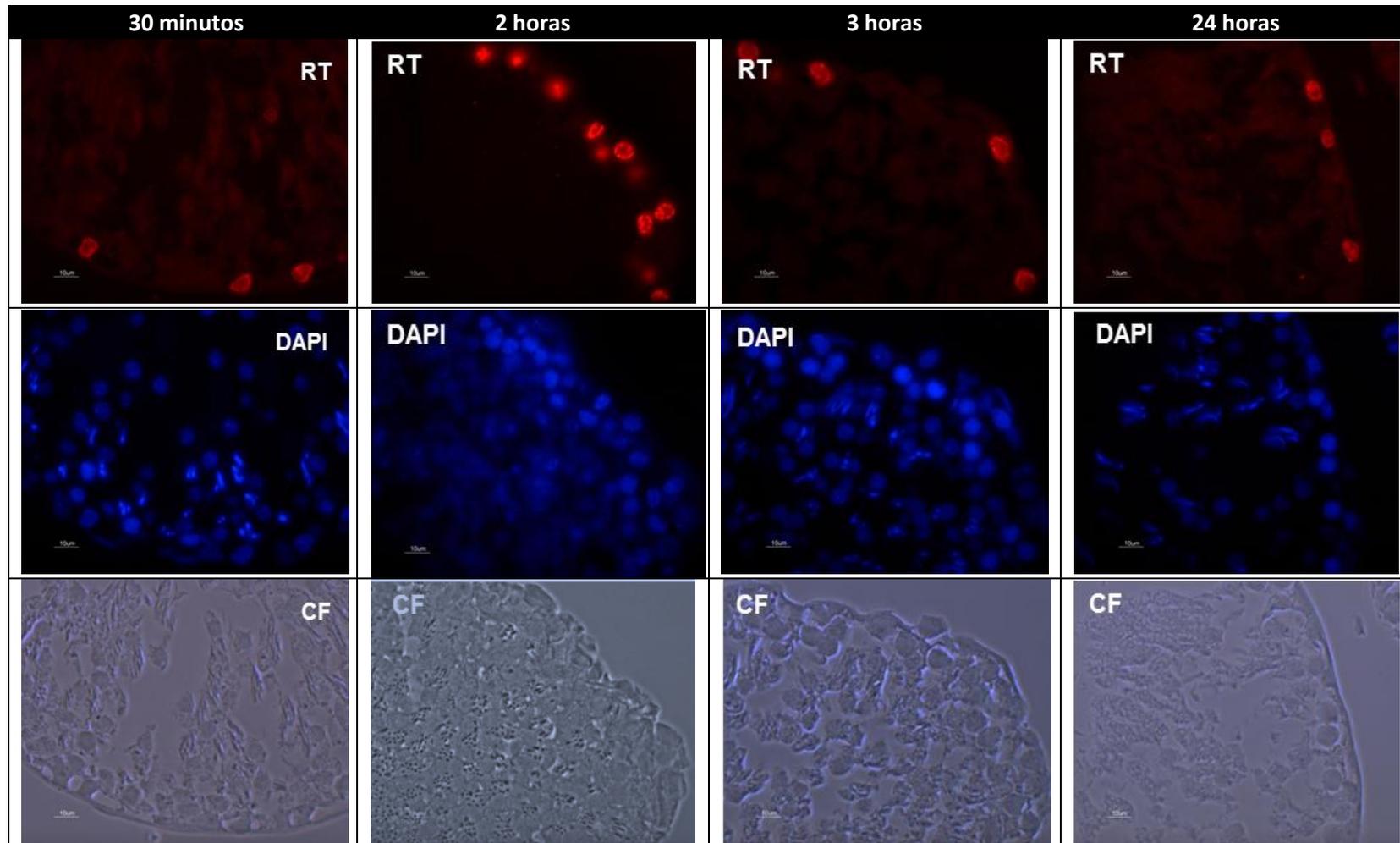
Figura 12. Inmunolocalización de la BrdU en ratas con tiempo de incorporación de 0 minutos, como se esperaba, ninguna célula presenta marca positiva (RT). Los estadios ilustrados son los estadios VI y VIII, dos de los estadios que normalmente muestran marca a todos los tiempos de incorporación de BrdU. Barra de calibración de 10 µm.

VIII.2 Incorporación de BrdU a 30 minutos, 2 y 3 horas.

Los resultados nos muestran que a treinta minutos de administrada la BrdU, las células que presentan marca, están muy pegadas a la membrana basal (figuras 13 y 15), incluso es posible observar al menos dos diferentes tipos de incorporación, que se denominarán **marca tipo I** y **marca tipo II** y se discutirán más adelante, éstos se distinguen claramente por la manera en que se distribuye la cromatina que incorporó BrdU en el núcleo de las células positivas (figuras 14 y 16).

A treinta minutos de incorporación se observa el primer tipo de marca (**marca tipo I**), que está caracterizado por presentar "*motas*" localizadas principalmente hacia la periferia del núcleo. En los aumentos digitales de las células marcadas (figura 14), es posible destacar los sitios de incorporación de la BrdU; la marca se encuentra principalmente sobre grumos de cromatina compacta adosados a la envoltura nuclear e incluso en algunas células se distingue incorporación en los cúmulos de cromatina que se encuentran en la parte central del núcleo. Al esquematizar los sitios donde hubo incorporación de BrdU en la figura 14, es posible apreciar de una mejor manera la disposición espacial de la cromatina de los núcleos de las células positivas.

Analizando otros túbulos seminíferos (figura 15) se puede distinguir un segundo tipo de incorporación que se caracteriza por presentar una marca en forma de "*foci*" o pequeños puntos (**marca tipo II**), distribuida en todo el volumen nuclear.



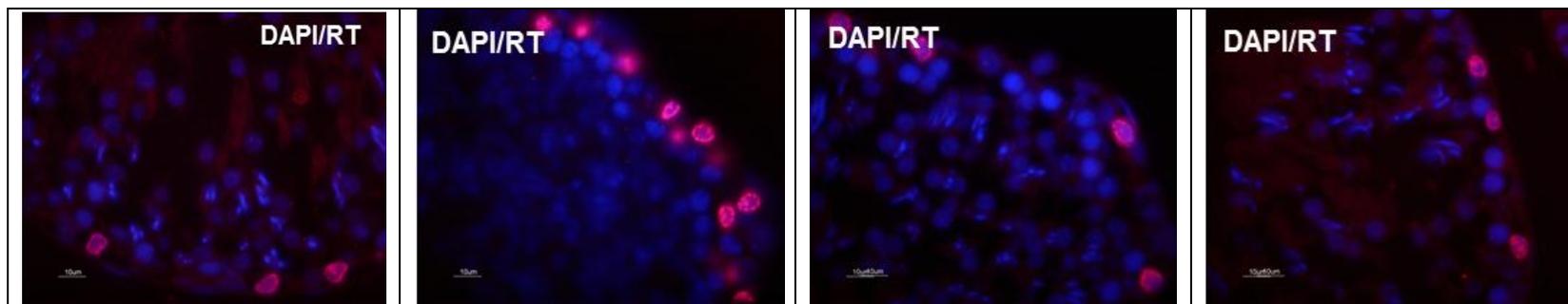
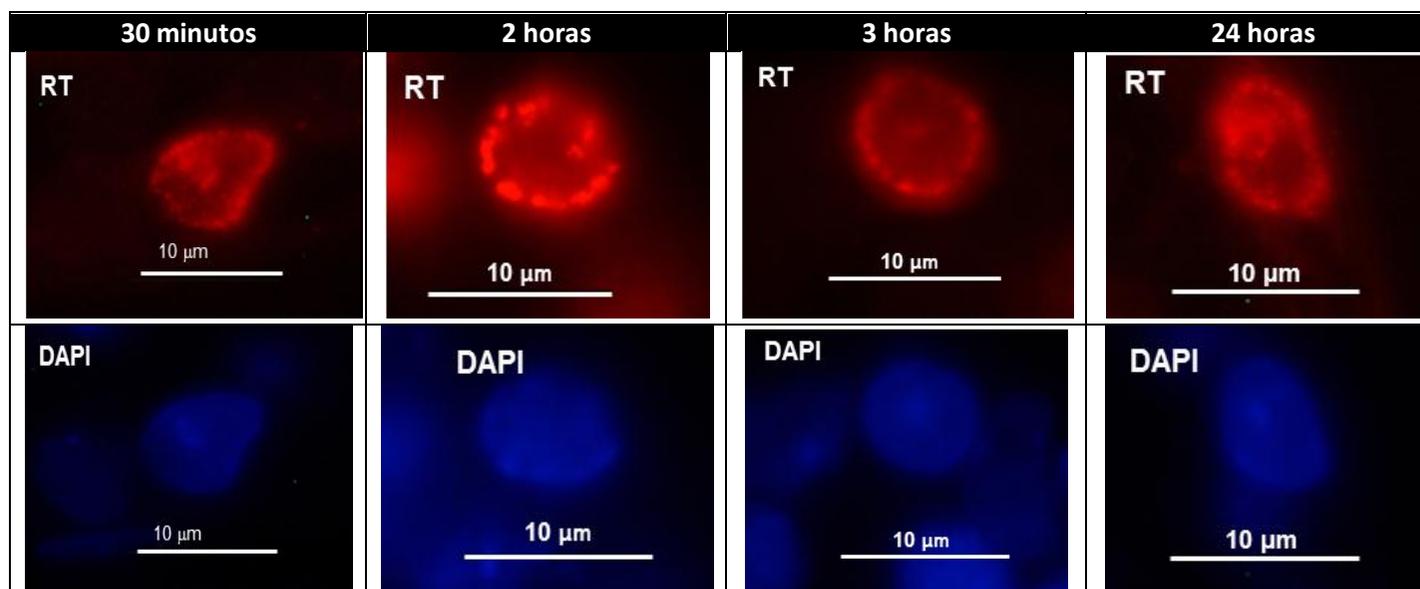


Figura 13. Micrografías ópticas, donde se inmunodetectó a la BrdU y se observa el primer tipo de marca caracterizado en este trabajo (**marca tipo I**), el cual presenta “motas” asociadas a grumos de cromatina compacta adosados principalmente a la envoltura nuclear. Este patrón se encuentra en todos los tiempos de incorporación estudiados. Las células marcadas están muy pegadas a la membrana basal del túbulo seminífero y son principalmente frecuentes en los estadios V y VI de la onda espermatogénica de la rata.



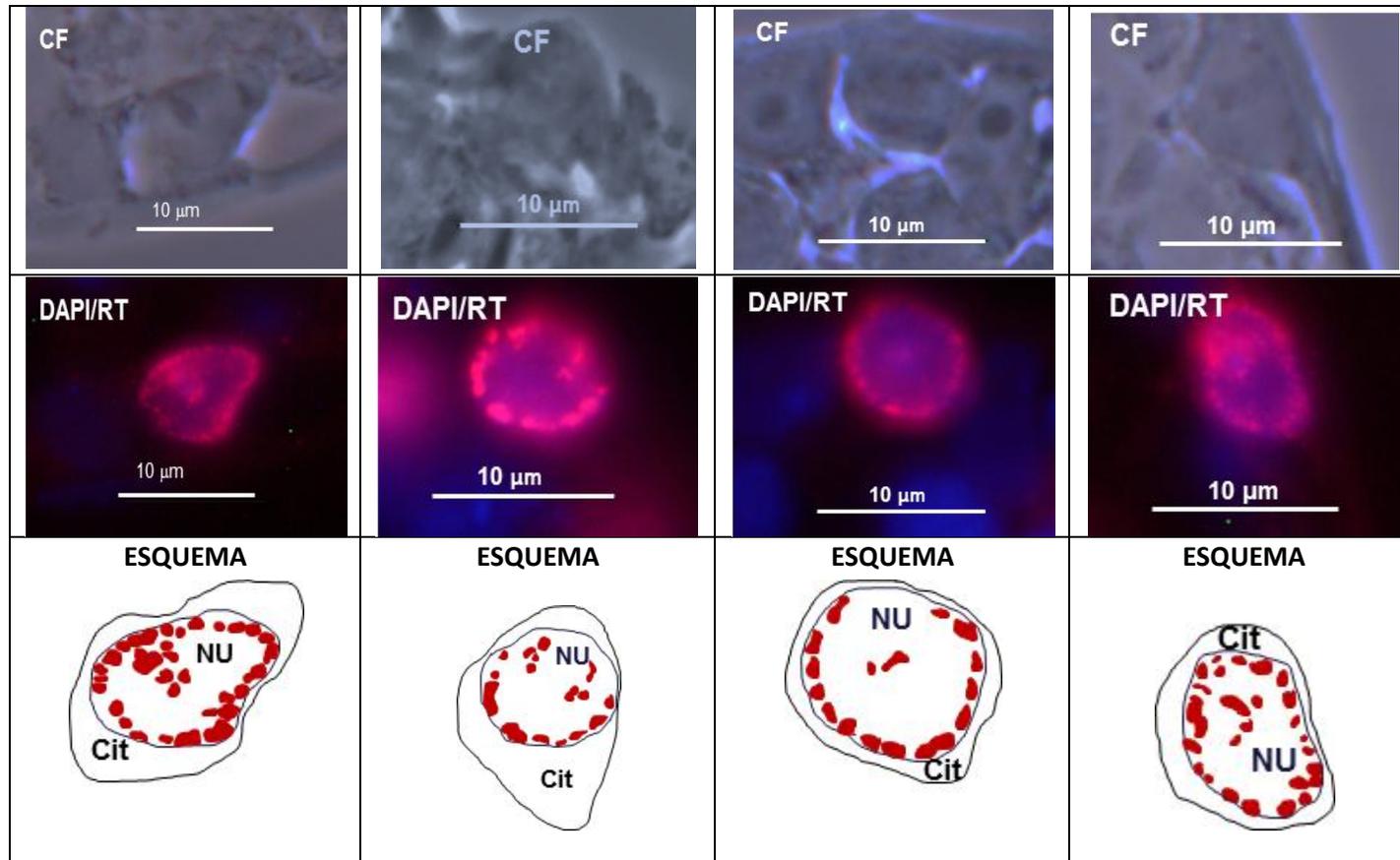


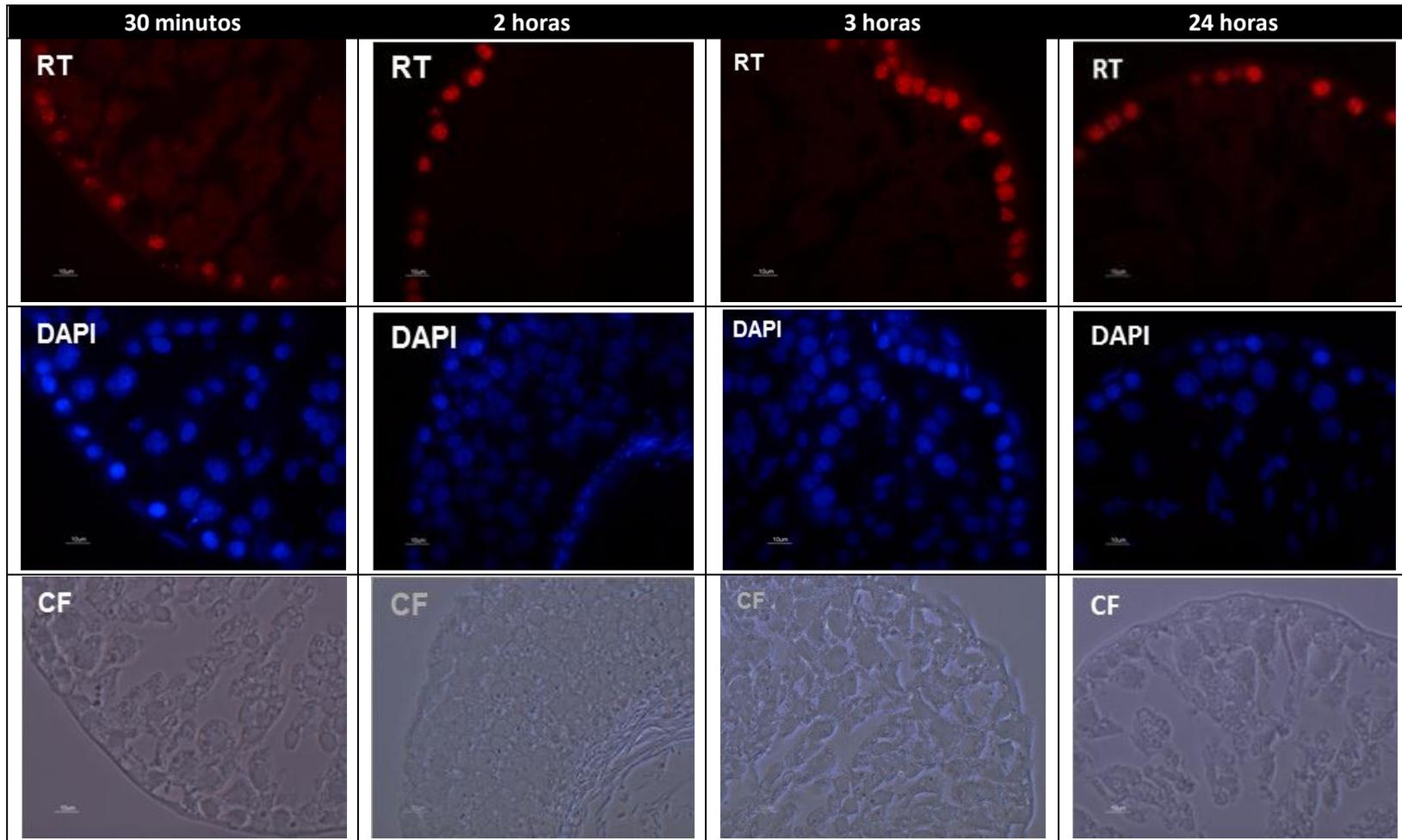
Figura 14. Aumentos digitales de células marcadas en la figura 2, en los cuales se muestran los sitios de incorporación de la BrdU en los que es posible visualizar la marca en forma de “motas” que se encuentran asociadas a grandes grupos de cromatina compacta adosados a la envoltura nuclear, y en ocasiones a grupos que se localizan en la parte central del núcleo. Los esquemas representan los sitios de incorporación de la BrdU con respecto a la arquitectura nuclear.

La **marca tipo II**, a diferencia de la **marca tipo I**, se encuentra generalmente asociada tanto a cromatina laxa como a grumos de cromatina compacta; esto puede apreciarse mejor en los aumentos digitales que se muestran en la figura 16. En la misma figura también es posible observar esquemas en donde se ilustra mejor el segundo tipo de incorporación.

A las dos y tres horas de incorporación (figuras 13 a 16), también se puede observar dos tipos distintos de marca, que al igual que en treinta minutos, están caracterizadas una por presentar "*motas*" localizadas principalmente hacia la periferia del núcleo, muy pegadas a la envoltura nuclear (figuras 13 y 14), que parecen corresponder también a grumos de cromatina compacta, esto puede ser corroborado observando, en ambos tiempos de incorporación, el traslape de Rojo Texas (RT) con DAPI en la figura 14.

El otro tipo de marca que se presenta a los 30 minutos tanto a 2 como a 3 horas de incorporación (figuras 15 y 16), está caracterizado por presentar "*foci*" o puntos localizados en todo el volumen nuclear, tanto en cromatina laxa como compacta (esquemas de la figura 16).

El primer tipo de marca presente en estos tres primeros tiempos de incorporación de BrdU puede ser observado principalmente en los estadios V y VI (figura 17). Mientras que el segundo tipo de marca caracterizada por presentar "*foci*" se encuentra en los estadios VIII y IX (figura 18) del ciclo del epitelio seminífero en los cuales es posible encontrar células en preleptoteno, que históricamente eran denominadas células en estado "resting" (Leblond & Clermont, 1952).



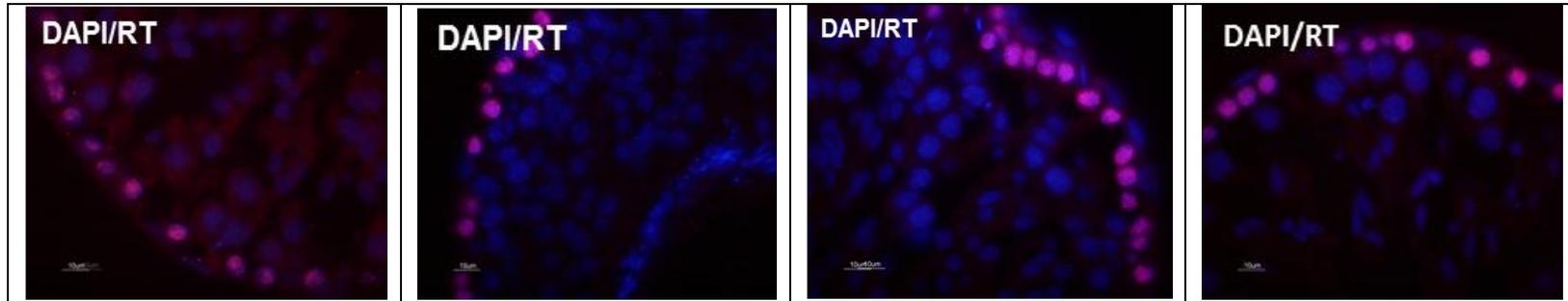
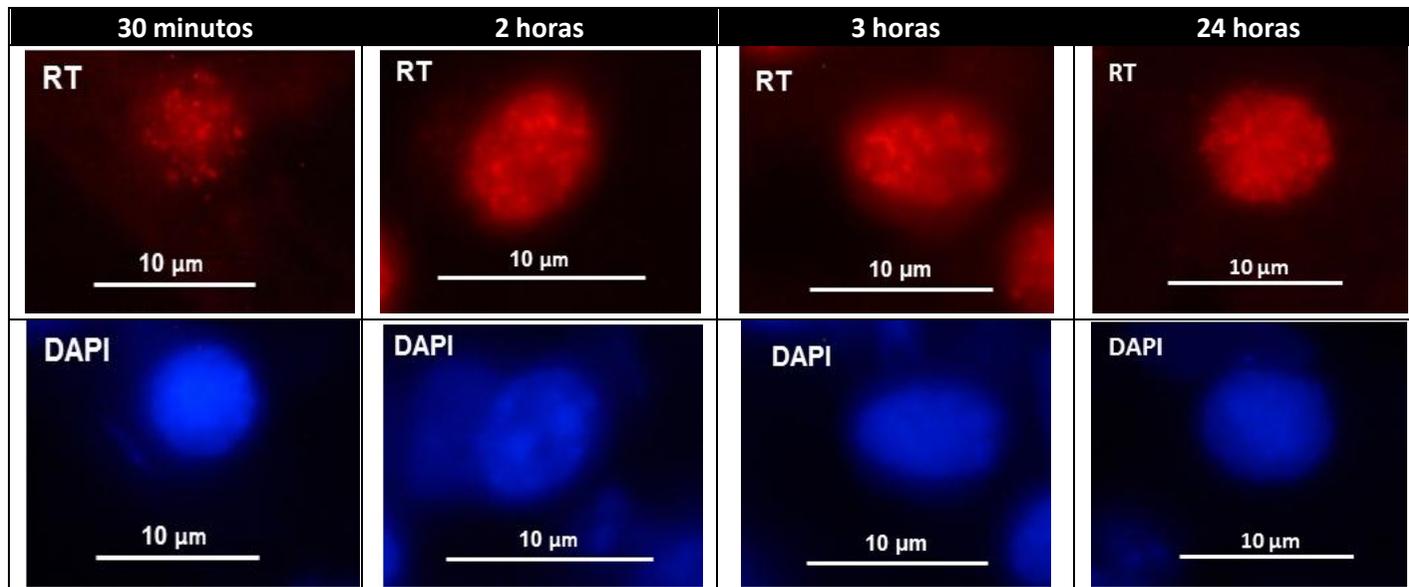


Figura 15. Micrografías ópticas, donde se inmunodetectó a la BrdU, y se observa el segundo tipo de marca caracterizado en este trabajo, marca en forma de “foci” esparcida en todo el volumen nuclear, tanto en cromatina laxa como compacta. Este tipo de marca se puede observar en todos los tiempos de incorporación y se presenta al igual que el tipo de marca anterior, en células muy pegadas a la membrana basal, principalmente en los estadios VIII y IX de la onda espermatogénica de la rata.



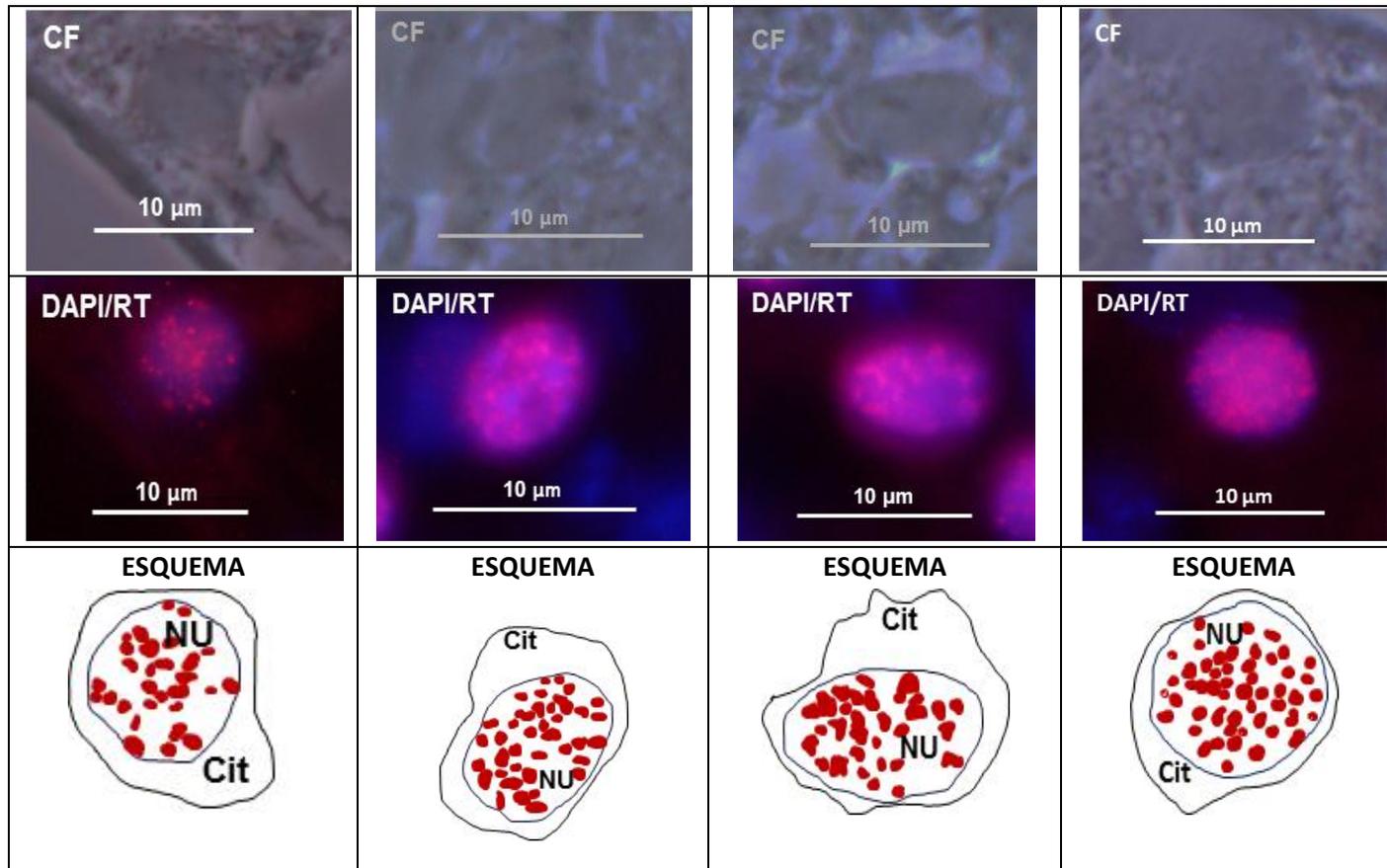


Figura 16. Aumentos digitales de células marcadas en la figura 4, en los cuales se muestran los sitios de incorporación de la BrdU lo que hace posible observar la marca en forma de “foci” que se encuentra asociada tanto a cromatina laxa como compacta. Los esquemas representan los sitios de incorporación de la BrdU con respecto a la arquitectura nuclear. Lo que hace posible destacar que este tipo de marca no se ve regionalizada, sino que se distribuye por todo el volumen nuclear.

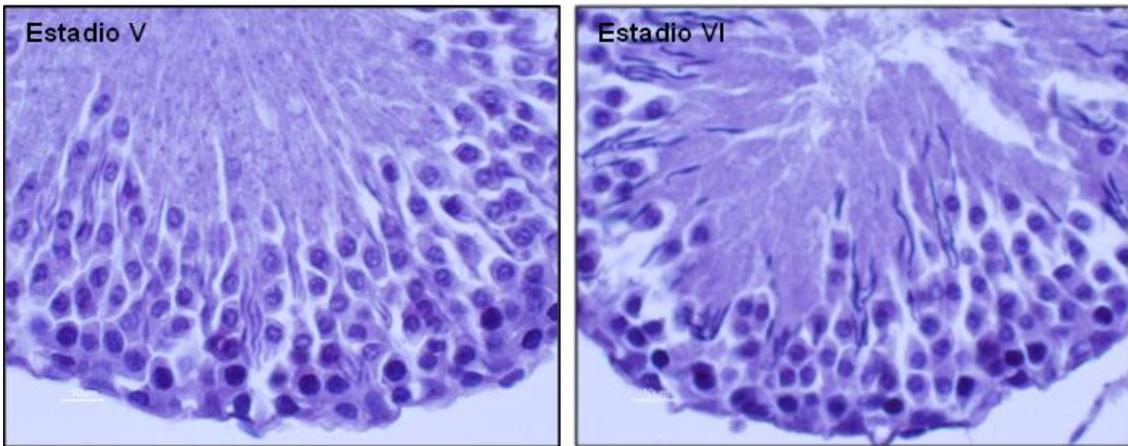


Figura 17. Hematoxilina y eosina de los estadios V (izquierda) y VI (derecha) de la onda espermatogénica de la rata, estadios en los cuales se observa la marca tipo I. La posición de las espermatidas elongadas con respecto a la membrana basal marca la diferencia entre un estadio y otro.

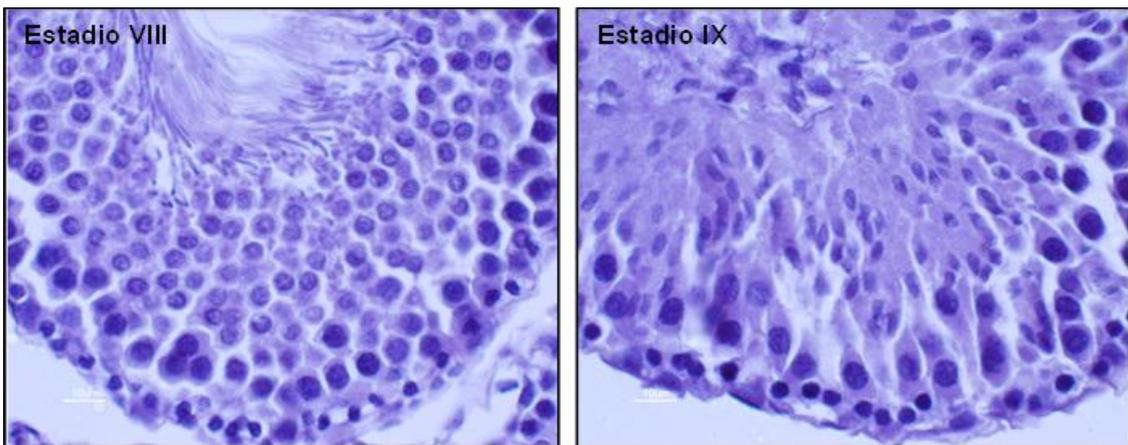


Figura 18. Hematoxilina y eosina de los estadios VIII (izquierda) y IX (derecha) de la onda espermatogénica de la rata, estadios en los cuales se observa la marca tipo II. En el estadio VIII la posición de las espermatidas elongadas marca la diferencia entre estadios previos a éste; en el estadio IX solamente hay presentes una generación de espermatidas.

VIII.3 Incorporación de BrdU a 24 h

A las 24 horas de incorporación de BrdU, al igual que en todos los tiempos anteriores en los que encontramos marca (30 minutos, 2 y 3 horas), éstas se muestran en forma de “motas” adosadas a la envoltura nuclear (Figuras 13 y 14), en células pertenecientes a los estadios V y VI (figura 17). Las marcas en forma de “foci” esparcidos por todo el volumen nuclear (figuras 15 y 16) están presentes principalmente en células pertenecientes a los estadios VIII y IX (Figura 18) del ciclo del epitelio seminífero. El primer tipo de marca está asociada a cromatina compacta (Figura 14) y el segundo tanto a cromatina compacta como a cromatina laxa (Figura 16).

Pero además de los dos tipos de incorporación descritos para 30 minutos, 2 y 3 horas, únicamente a las 24 horas se presenta un tercer tipo de marca (**marca tipo III**). Este tipo de marca está caracterizado por presentar grandes “motas” en el núcleo (Figuras 19 y 20), mismas que se pueden observar asociadas principalmente a cromatina compacta (figura 20); esto puede visualizarse mejor en el esquema de la figura 20. Las células que presentan el tercer tipo de marca también se encuentran muy pegadas a la membrana basal del túbulo seminífero principalmente en los estadios XII y XIII (figura 21) del ciclo del epitelio seminífero.

Cabe destacar que a este tiempo de incorporación de 24 h, en el estadio XII (figura 21), además de observarse células con marca tipo III también ocasionalmente es posible encontrar, aunque con menor frecuencia, células con un patrón de marcado muy parecido al tipo II (figuras 22 y 25). Estos resultados muestran que a las 24 h de incorporación, en algunos túbulos seminíferos es posible distinguir dos distintos tipos de incorporación juntos (marca tipo II y marca tipo III), siempre presentes en células pegadas a la membrana basal, es decir con una posición más externa que la fila de células en etapa de paquíteno (figura 22).

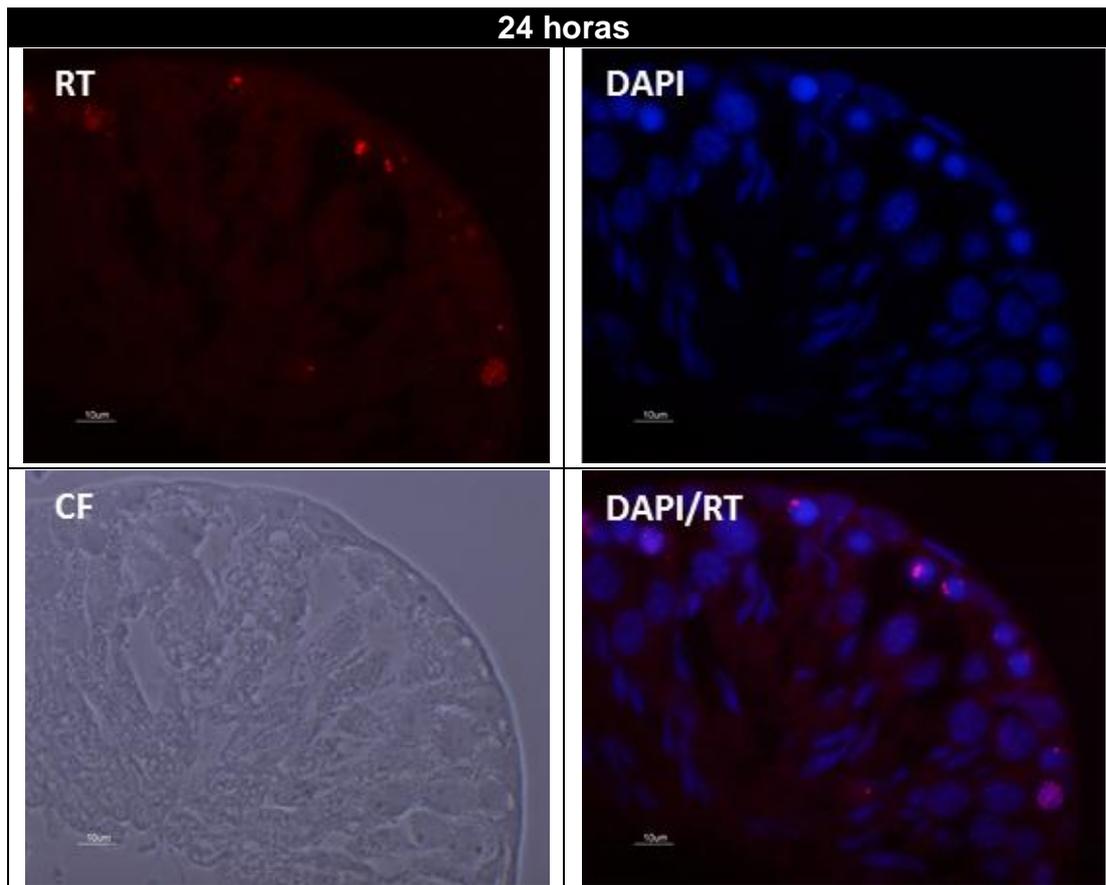


Figura 19. Micrografías ópticas, donde se observa el tercer tipo de marca (**marca tipo III**), la que se distribuye en forma de grandes grumos o motas. Este tipo de marca sólo se puede observar a las 24 h de incorporación de BrdU, principalmente en los estadios XII y XIII de la onda espermatogénica de la rata.

VIII.4 Conteo de Células positivas a la BrdU

Para poder evaluar con mayor claridad, de manera cuantitativa y no sólo cualitativa, las diferencias entre los distintos tipos de marcas observados a los distintos tiempos de incorporación, se llevó a cabo un conteo de las células marcadas en 30 túbulos seminíferos por cada tiempo de incorporación (30 minutos, 2, 3 y 24 horas) con cada tipo de marca (marca tipo 1, tipo 2 y tipo 3) y se calculó un **índice de marcado** por túbulo seminífero. Dicho índice de marcado mostró un panorama del número de células marcadas (que incorporaron BrdU) con respecto al número de células no marcadas, esto se explica de manera detallada en material y métodos, posteriormente, los resultados de los distintos túbulos seminíferos se promediaron y se graficaron (figuras 23, 24 y 25).

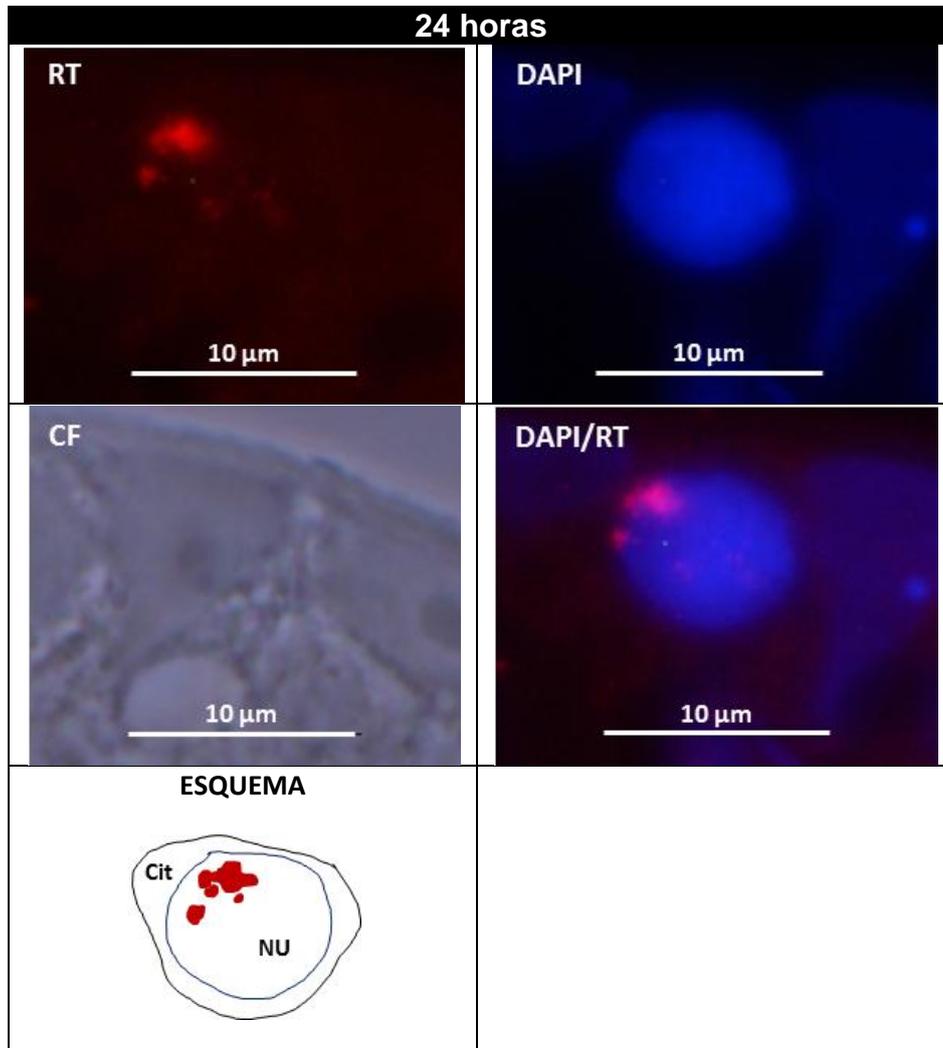


Figura 20. Aumentos digitales de células marcadas en la figura 19, en los cuales se muestran los sitios de incorporación de la BrdU y es posible observar la marca en forma de grandes “motas” que corresponden a cromatina compacta. El esquema muestra los sitios de incorporación de la BrdU con respecto a la arquitectura nuclear y destaca que este tipo de marca ve regionalizada.

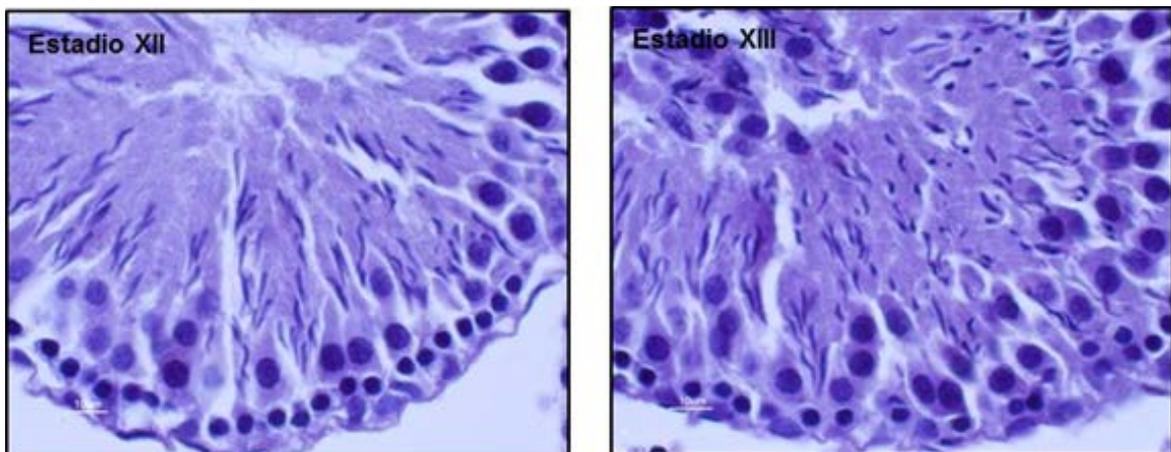


Figura 21. Estadios de la onda espermatogénica en donde se encuentra el tercer tipo de marca caracterizado en este trabajo, en ambos casos solamente hay una generación de espermátidas en proceso de elongación.

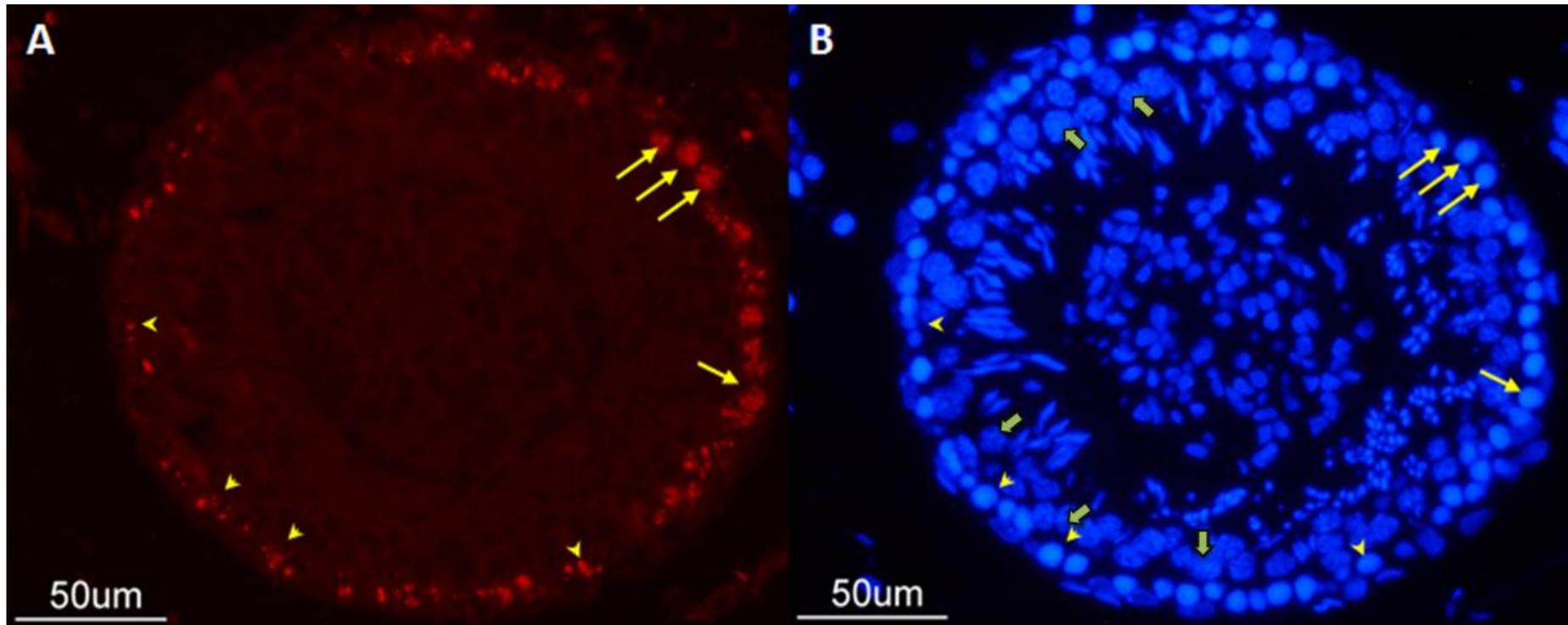


Figura 22. Túbulo seminífero en estadio XII de la onda espermatogénica con incorporación de BrdU de 24 h En A se puede observar dos distintos tipos de incorporación juntos, la **marca tipo II** (flechas amarillas) y la **marca tipo III** (cabezas de flechas amarillas). En B se muestra con la técnica DAPI que las células marcadas siempre están más pegadas a la membrana basal (flechas y cabezas de flechas amarillas), los paquítenos están marcados con flechas verdes.

Los resultados promediados muestran una clara diferencia, en cuanto el número de células marcadas, entre la **marca tipo I** y la **marca tipo II** encontrada en todos los tiempos de incorporación de BrdU, así como la **marca tipo III**, que solo fue encontrada a las 24 horas. Para el caso de la **marca tipo I**, el promedio del índice de marcado de los 30 túbulos contados por cada tiempo de incorporación es menor que 0.5 en todos los casos, incluso está por debajo de 0.4 a las 3 horas (figura 23A). Esto demuestra que solamente la mitad o menos de la mitad de las células que podrían estar marcadas, presentan marca.

Para la **marca tipo II**, el promedio de los 30 túbulos contados por cada tiempo, muestra un índice de marcado superior a 0.8 en todos los casos (figura 23B) incluso la diferencia es tan pequeña que solamente puede observarse en el rango de 0.875 a 0.9 (figura 24), donde sólo hay 0.025 de diferencia, en la escala de 0 a 1.

El análisis de varianza (ANOVA) realizado muestra que, en la **marca tipo I** entre los diferentes tiempos de incorporación, hay diferencias estadísticas, ya que la significancia (valor de P) es de 0.891, de modo que al realizar la prueba post hoc (Duncan), el **índice de marcado** a las 3 horas difiere de los demás tiempos situándolo en un grupo distinto (figura 23A).

Para el caso de la **marca tipo II**, el análisis de varianza muestra una significancia de 0.000, de modo que no hay diferencias estadísticamente significativas, y por tanto no fue necesario realizar el análisis de rangos múltiples y los datos pueden ser agrupados en uno solo (figura 23B).

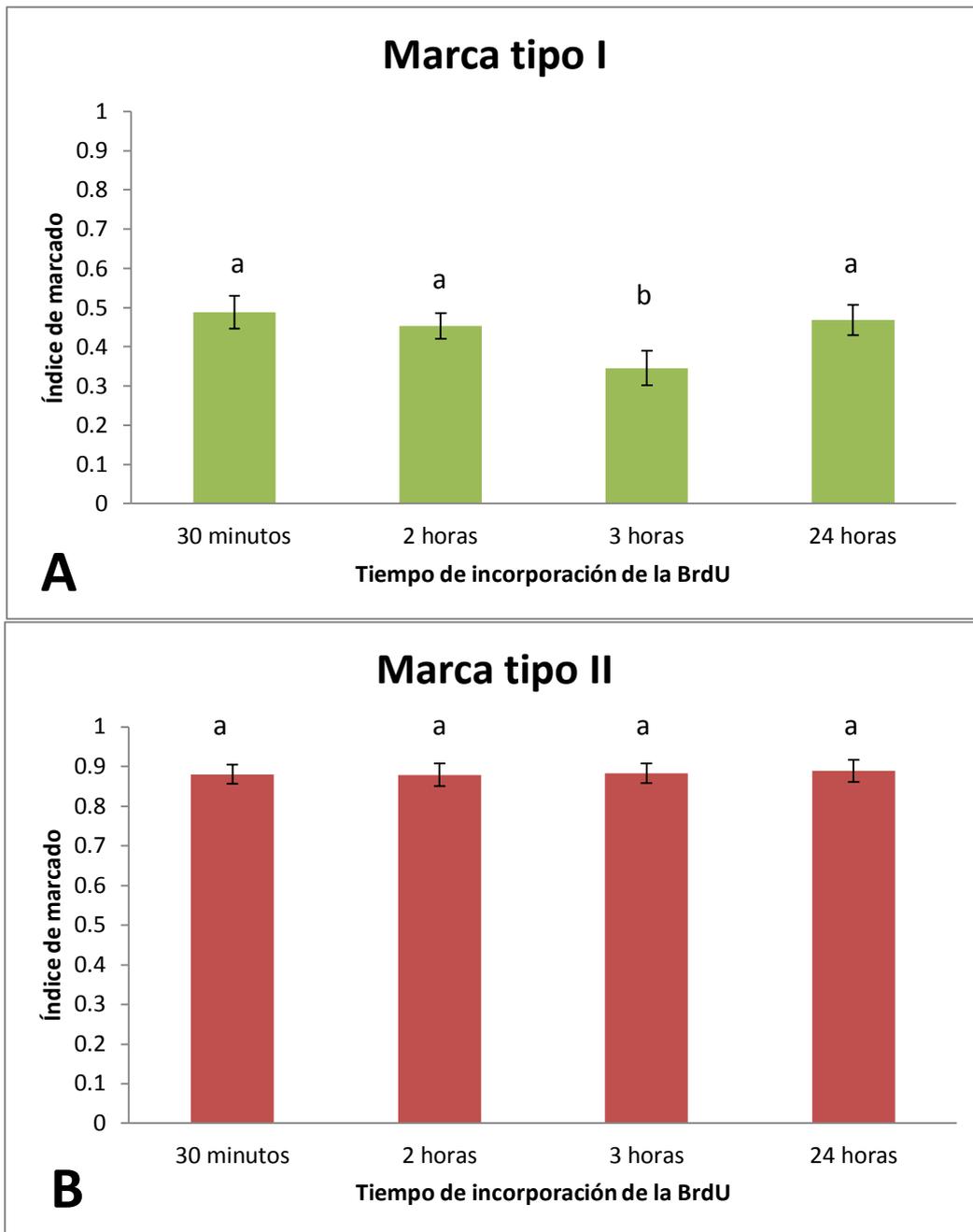


Figura 23. Promedios del índice de marcado en todos los tiempos de incorporación utilizados en este trabajo. En A se muestra el promedio para la **marca tipo I**, en donde es posible observar que dicho índice de marcado no sobrepasa el valor 0.5 en ninguno de los tiempos de incorporación, lo cual es indicio de que la mitad o menos de las células que podrían estar marcadas, presentan marca, a las 3 horas hay una diferencia estadísticamente significativa, por lo cual es posible reconocer dos distintos grupos de datos, el a y el b. Por otro lado, en B se muestran los promedios para la **marca tipo II**, en donde los valores sobrepasan el índice de marcado de 0.8, lo cual indica que más de la mitad de las células que podrían presentar marca positiva, la muestran, en este caso no hay diferencias estadísticas por lo que se pueden agrupar los datos en uno solo, el grupo a.

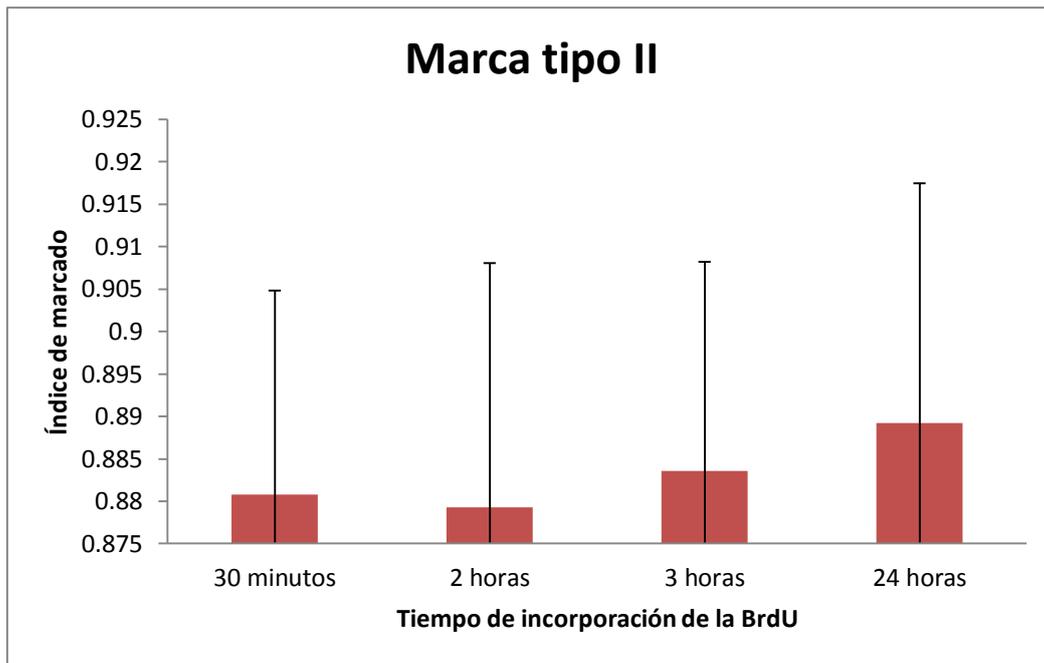


Figura 24. Aumento de la figura 23B para ejemplificar la diferencia entre los promedios de los índices de mercado para la **marca tipo II** a todos los tiempos de incorporación, la diferencia es tan pequeña que solo puede ser observada en un rango de 0.875 a 0.925 en una escala de 0 a 1. Las desviaciones estándar no se observan por completo ya que se salen del rango ilustrado.

Para el tercer tipo de marca, los resultados del conteo muestran que el promedio de los túbulos contados a las 24 horas de incorporación no tienen un índice de mercado mayor a 0.4 (figura 25), también es posible destacar que a este tiempo de incorporación y en los estadios en donde es posible observar la **marca tipo III** (figura 21), también encontramos células que presentan una marca que se asemeja mucho a la **marca tipo II** (figuras 15 y 16), con un índice de mercado apenas superior a 0.3 (figura 25). Si se realiza la suma de los índices de mercado de ambos tipos de marca, es posible observar que este es mayor a 0.7 (figura 26).

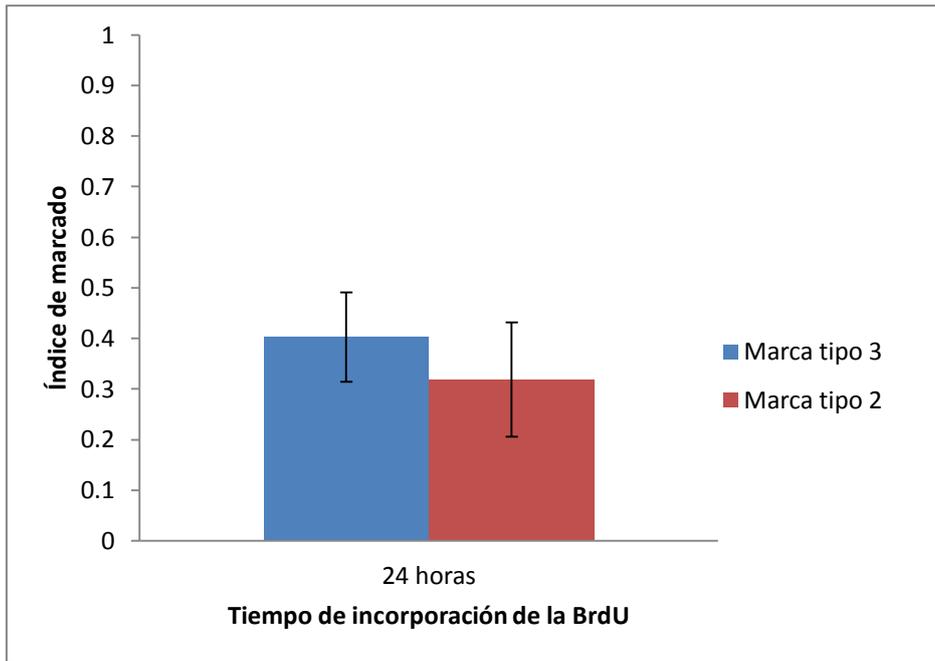


Figura 25. Índice de marcado para los dos tipos de marca encontrados a las 24 horas de incorporación; para la **marca tipo III**, el índice de marcado tiene un valor apenas superior a 0.4, mientras que la **marca tipo II** tiene un índice de marcado arriba de 0.3.

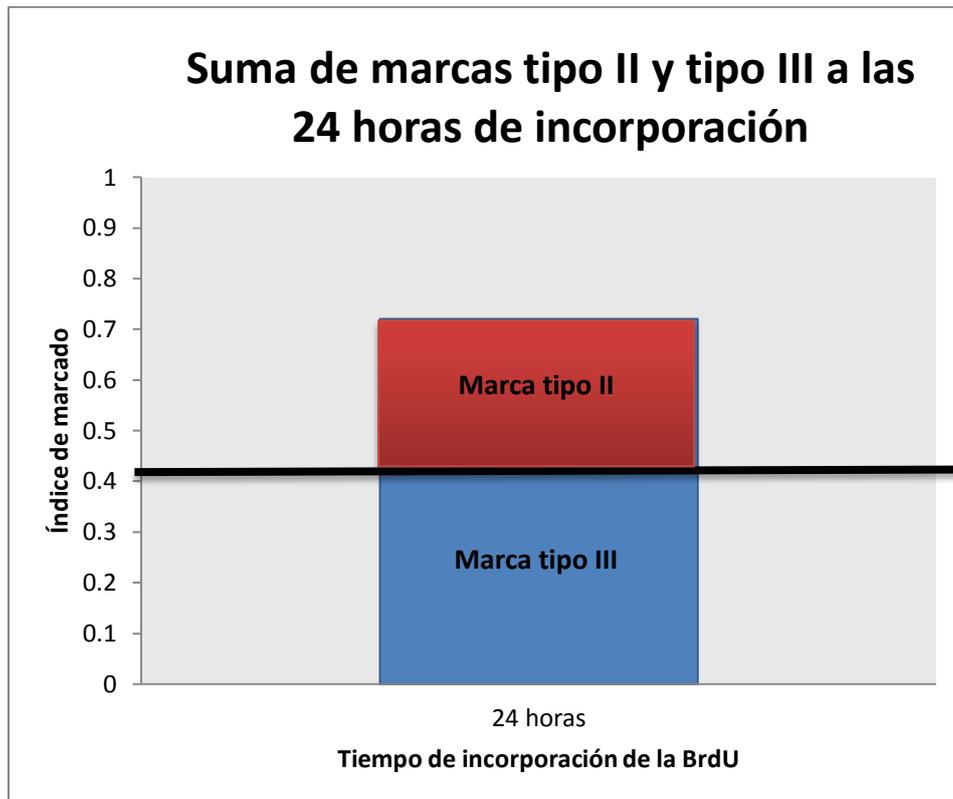


Figura 26. Suma de los índices de marcado correspondientes a las **marcas tipo II** y **tipo III** encontradas a las 24 horas de incorporación. La suma sobrepasa el valor de 0.7, por lo cual en este trabajo se propone que las células que muestran la **marca tipo III** son células que en algún momento presentaron **marca tipo II**.

IX. Discusión:

Este trabajo se utilizó el compuesto químico BrdU que se ha visto que se incorpora al ADN recién sintetizado de células en replicación (Indiana University, 1910); antes de que se usara la BrdU para marcar células en replicación, se empleaban compuestos radioactivos como la timidina tritiada, la cual se detectaba mediante métodos autoradiográficos. Los métodos autoradiográficos incluso han servido para la realización de trabajos que estudian el ciclo celular en espermatogonias y espermatoцитos en testículo de ratón (Monesi, 1962b).

Los trabajos que han utilizado a la BrdU como marcador de células en proceso de replicación se han centrado en diferentes aspectos de la replicación en levaduras (Borde *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2001) y en aspectos de la replicación de células de la línea germinal de mamíferos machos, los que han prestado una mayor atención a células no meióticas (espermatogonias) (Ehmcke *et al.*, 2005) o a la estimación de la duración de todo el ciclo del epitelio seminífero en ratas (Rosiepen & Weinbauer, 1994), e incluso en primates (Rosiepen *et al.*, 1997), sin poner especial énfasis en la síntesis de ADN pre-meiótica, de la cual se ocupa este trabajo.

Existen diferencias en cuanto al tipo de marcado que podrían correlacionarse con los tipos celulares que incorporan BrdU.

Los distintos tiempos de incorporación de BrdU que se usaron en este trabajo han dado indicios de que existen diferencias en cuanto a los tipos de marcas observados (figuras 14, 16 y 20). Dependiendo los estadios de la onda espermatogénica en los cuales se encuentran las células marcadas, así como de la morfología y posición de éstas con respecto a otros tipos celulares y al túbulo seminífero, se puede correlacionar el tipo de marca con los tipos celulares espermatogonia B (fase S mitótica) **marca tipo I** (estadios V-VI), células en preleptoteno (fase S meiótica) **marca tipo II** (estadios VIII-IX) y finalmente células en profase meiótica temprana (leptoteno o cigoteno) **marca tipo III** (estadios XII-XIII) (tabla 5).

En los primeros 3 tiempos de incorporación de BrdU (30 min 2 y 3 horas) básicamente se encontraron sólo dos tipos de marca, éstas son, en los estadios V y VI (**marca tipo I**) y en los estadios XIII y IX (**marca tipo II**). A las 24 horas es en el único tiempo en el cual se evidencia un tipo de marca adicional, ésta se nota en los estadios XII y XIII (**marca tipo III**) y no se puede observar a tiempos cortos de incorporación, lo que podría deberse a que a los tiempos cortos de incorporación no son suficientes para que la célula que incorpora la BrdU en la fase S meiótica anterior, en el preleptoteno transite hasta etapas de leptoteno tardío o cigoteno temprano (figura 27) y que la cromatina sufra el reacomodo espacial que dará lugar al tercer tipo de marca (figura 20), ya que durante la transición del leptoteno a cigoteno, los cromosomas están anclados a la cara interna de la membrana nuclear mediante sus secuencias teloméricas, en algo denominado placa de adhesión,

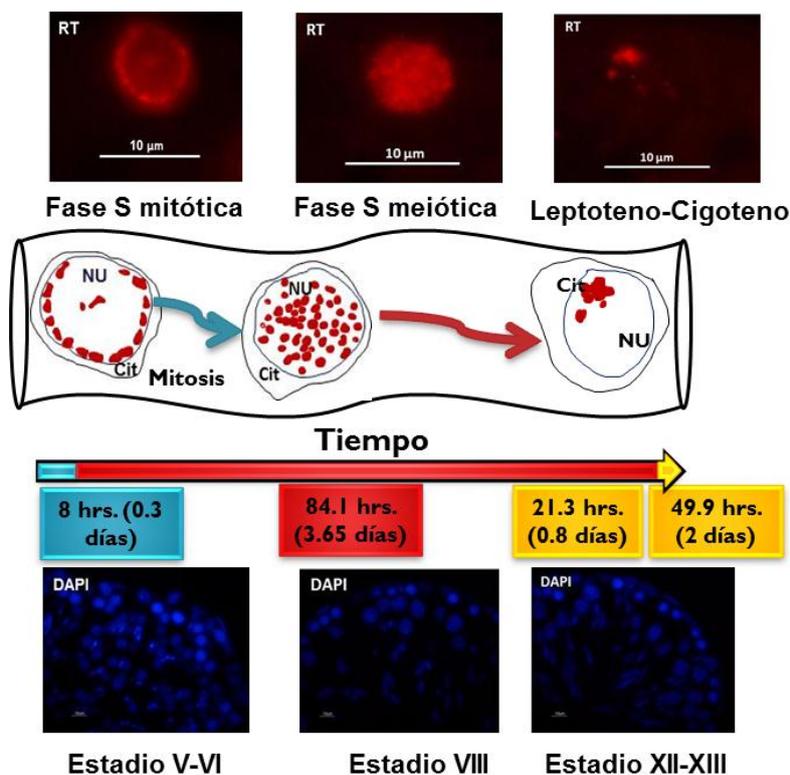


Figura 27. Esquema de los diferentes tipos de marca relacionados con el tipo de síntesis que podría estarse llevando a cabo. También se muestran los estadios en los cuales se observan los tipos de marca y el tiempo que dura la fase S mitótica (8 horas), la fase S meiótica (84.1 horas), el leptoteno (21.3 horas) y el cigoteno (49.9 horas) (Adler, 1996).

por medio de la cual los cromosomas se mueven y se colocan en extrema cercanía hasta que se forma un arreglo parecido a un ramo de flores, mejor

conocido como bouquet, este arreglo específico persiste durante todo el cigoteno e incluso ha sido observado en paquíteno, en etapas muy tempranas (Hernández-Hernández *et al.*, 2009; Pfeifer *et al.*, 2003; Zickler & Kleckner, 1998).

El tiempo de 24 horas de incorporación, es suficiente para que la célula en proceso de replicación meiótica incorpore BrdU muy al final de la fase de síntesis y transite hasta leptoteno tardío e incluso cigoteno temprano (figura 27), esta propuesta también es consistente con los tipos celulares descritos para los estadios XII y XIII de la onda espermatogénica (Herms *et al.*, 2010; Lagarrigue *et al.*, 2011; Leblond & Clermont, 1952), estadios en los cuales se encuentra la **marca tipo III** (figuras 20 y 22).

Tabla 5. Resumen de los estadios en los cuales pueden ser encontrados los distintos tipos de marcas a diferentes tiempos de incorporación de BrdU, así como los tipos celulares propuestos por tipo de marca.

Tipo Celular	Fase S	Tipo de Marca	Estadio	Tiempo de incorporación en los que se presenta
Espermatogonias B	Mitótica	I	V-VI	30 min, 2, 3 y 24 horas
Espermatocitos en preleptoteno	Meiótica	II	VIII-IX	30 min, 2, 3 y 24 horas
Espermatocitos en profase I meiótica	-----	III	XII-XIII	24 horas

La marca tipo I corresponde a fase S mitótica:

En este trabajo se propone que la **marca tipo I** corresponde a una marca mitótica. Ya que al igual que en testículo, en intestino podemos observar un patrón parecido a la **marca tipo I**, sin importar el tiempo de incorporación; el material que tuvo incorporación de BrdU durante 30 minutos se ve igual al que incorporó durante 24 horas (figura 28). Cabe destacar que en el intestino las células se dividirán constantemente, en las criptas, para renovar el epitelio, dichas divisiones comprenderán una fase de síntesis de ADN mitótica.

Este tipo de marca observada en testículo (figura 14) también puede ser correlacionado con la arquitectura de la cromatina en espermatogonias B, la que se dispone en grandes grumos y una gruesa capa compacta adosada a envoltura nuclear (Leblond & Clermont, 1952). Esta disposición es lo que causa que la BrdU produzca un marcado en forma de “*motas*” principalmente ubicadas hacia la periferia de la envoltura nuclear (figura 14).

Conteo de células.

El conteo de células positivas a la BrdU corrobora el hecho de que las células preleptoténicas son originadas debido a una división mitótica de las células espermatogonias B y nos da indicios de que las células que presentan **marca tipo II**, en todos los tiempos de incorporación utilizados en este trabajo, son más numerosas (figura 23B) con respecto a las que tienen la **marca tipo I** (figura 23A). Esto puede deberse a que las células que muestran la **marca tipo I** eventualmente darán origen a las células que presentan **marca tipo II** mediante una división mitótica, por lo que el número de células se duplicaría.

Por otro lado, el que el número de células que exhiben **marca tipo II** no sean exactamente el doble de las que tienen **marca tipo I**, puede deberse a que no todas las espermatogonias B que se dividen dan origen a células preleptoténicas, algunas dan origen a otras espermatogonias B (Herms *et al.*, 2010) y otras incluso sufren procesos de muerte celular programada (Bartke, 1995; Billig *et al.*, 1995).

El análisis de varianza realizado muestra que en la marca tipo I si hay diferencias significativas entre los tiempos empleados y la prueba de rangos múltiples ubica la diferencia a las 3 horas de incorporación, esto puede deberse a que algunas espermatogonias tipo B que presentaban **marca tipo I** en el tiempo de 2 horas, a las 3 horas ya hayan dado origen a espermatoцитos primarios en preleptoteno, y estos ahora presenten **marca tipo II**. El que a las 24 horas se restablezca el **índice de marcado** puede deberse a la división celular de algunas espermatogonias A que a las 24 horas dieron origen a más espermatogonias B que presentarán **marca tipo I**.

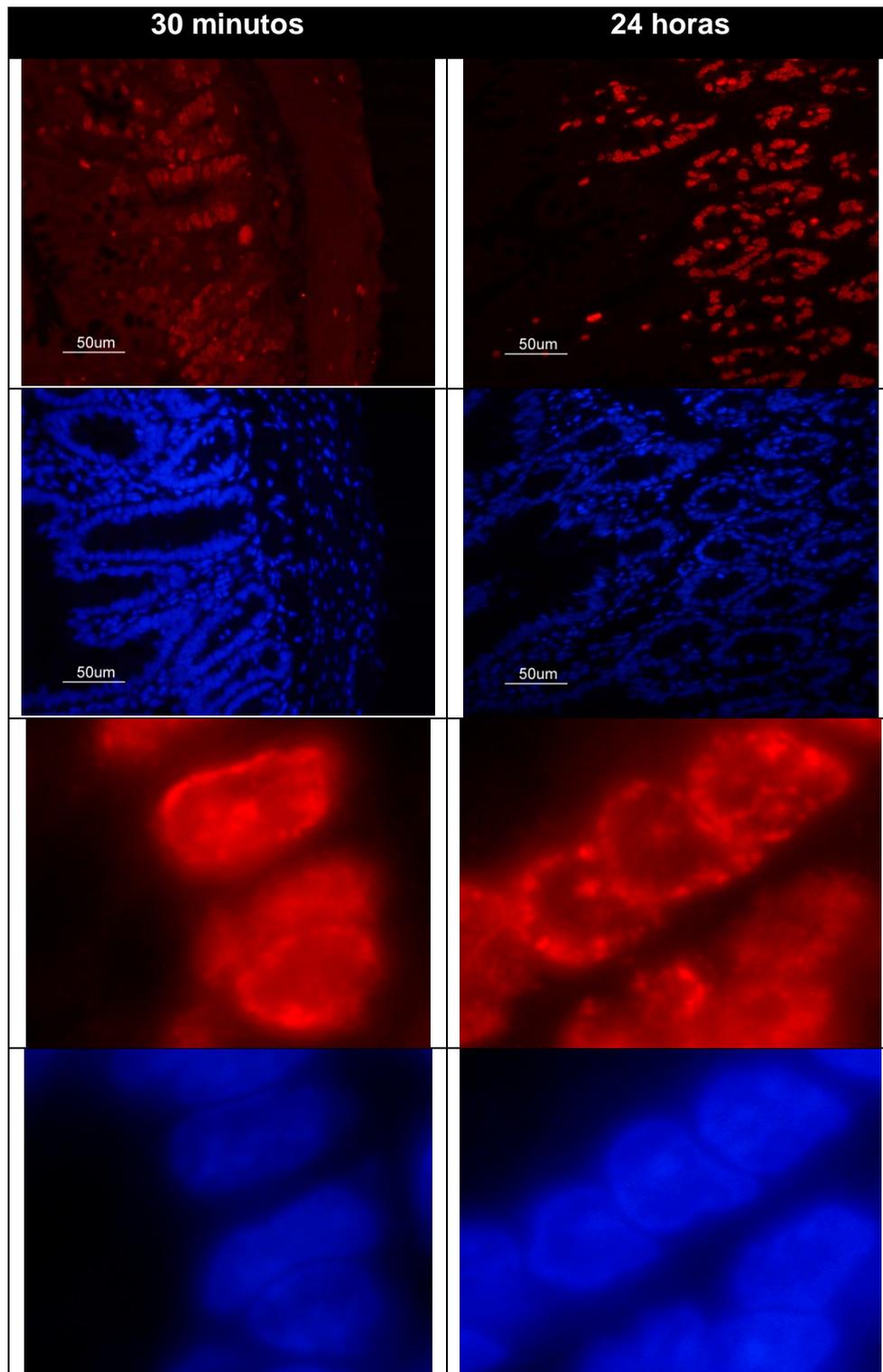


Figura 28. Incorporación de BrdU en intestino (en las criptas), a 30 minutos y 24 horas, en donde se observa un marcado muy parecido a la marca tipo I, observado en células de la línea germinal, específicamente en las células que proponemos que son espermatogonias tipo B.

Para la **marca tipo II** el análisis de varianza entre los tiempos de incorporación de BrdU, no muestra diferencias estadísticamente significativas, lo que es

indicio de que a todos los tiempos, en los estadios indicados (tabla 5), es posible observar casi la misma cantidad de espermatoцитos primarios en preleptoteno.

El conteo de células con incorporación de BrdU por 24 horas nos muestra un fenómeno típico, ya que el número de células con **marca tipo III** es incluso menor (figura 25) al de células con **marca tipo I** contadas en casi todos los tiempos de incorporación (figura 23A), esto podría deberse a que a las 24 horas no todas las células que incorporaron BrdU durante el preleptoteno alcanzaron a transitar hasta etapas de leptoteno tardío o cigoteno temprano, en donde ya es posible observar el arreglo especial de la cromatina denominado “bouquet” (Hernández-Hernández *et al.*, 2009; Pfeifer *et al.*, 2003; Zickler & Kleckner, 1998); por lo cual existen todavía, aunque en menor medida, células con una **marca tipo II** (figura 22).

Consistente con esta propuesta, al realizar la suma del índice de marcado de las células que presentan **marca tipo III** con el índice de marcado de las células que presentan una marca parecida a la **marca tipo II** a las 24 horas en los estadios XII y XIII (figura 26), es posible resaltar que la frecuencia de marcado resultante se parece más al índice observado en todos los tiempos de incorporación para la **marca tipo II** en los estadios XIII y IX (figura 23B).

Los resultados presentados en este trabajo muestran que el marcado con BrdU a diferentes tiempos podría servir como una herramienta útil para diferenciar distintos tipos celulares. Sobre todo los que llevan a cabo diferentes tipos de síntesis de ADN como lo son espermatogonias B (síntesis mitótica) y células en preleptoteno (síntesis meiótica) y de esta forma posteriormente trabajar sólo con el tipo celular de interés.

De igual modo se podría utilizar como una técnica adicional que permita al investigador trabajar con fracciones enriquecidas en las que el patrón de incorporación proporcione información del tipo celular que se tiene. Por ejemplo, si se usaran dispersiones, aunque no existan asociaciones celulares como en el túbulo seminífero, si se podrían tener los datos de los tipos de incorporación, de modo que esto incluye una característica adicional para la

determinación y clasificación de las células; además del posible empleo de marcadores de proteínas específicas de la meiosis.

El hecho de que en el preleptoteno se muestre un patrón característico (**marca tipo II**) ofrece una excelente ventaja para trabajar otros aspectos de la fase S meiótica.

X. Conclusiones:

- A tiempos cortos de incorporación de BrdU (30 min., 2 y 3 horas) se observan dos distintos tipos de marca, una caracterizada por presentar “*motas*” adosadas a la envoltura nuclear principalmente, denominada en este trabajo **marca tipo I**, que se puede correlacionar con células que están llevando a cabo síntesis mitótica, específicamente espermatogonias tipo B.

El segundo tipo de marca caracterizado por presentar “foci” esparcidos por todo el volumen nuclear, **marca tipo II**, puede ser correlacionado con células que estén llevando a cabo síntesis meiótica de ADN, es decir, células preleptoténicas.

- A las 24 horas de incorporación, se observa un tercer tipo de marca adicional (**marca tipo III**), caracterizada por presentar grandes “*motas*” en el núcleo, mismo que puede ser correlacionado con la formación del “bouquet” en células en etapa de transición entre leptoteno y cigoteno.
- En los estadios V y VI del ciclo del epitelio seminífero se encuentran células con **marca tipo I**.
- En los estadios VIII y IX, principalmente, se observan células con **marca tipo II**.
- En los estadios del ciclo XII y XIII del epitelio seminífero después de 24 horas de incorporación de BrdU, están presentes tanto células con **marca tipo III** como células con **marca tipo II**.
- Los índices de marcado del conteo celular permiten inferir que las espermatogonias B que muestran **marca tipo I**, mediante una división mitótica darán origen a células en preleptoteno que exhiben **marca tipo II**; mientras que las que presentan una **marca tipo III** (espermatoцитos primarios entre el leptoteno-cigoteno), son el resultado de la transición

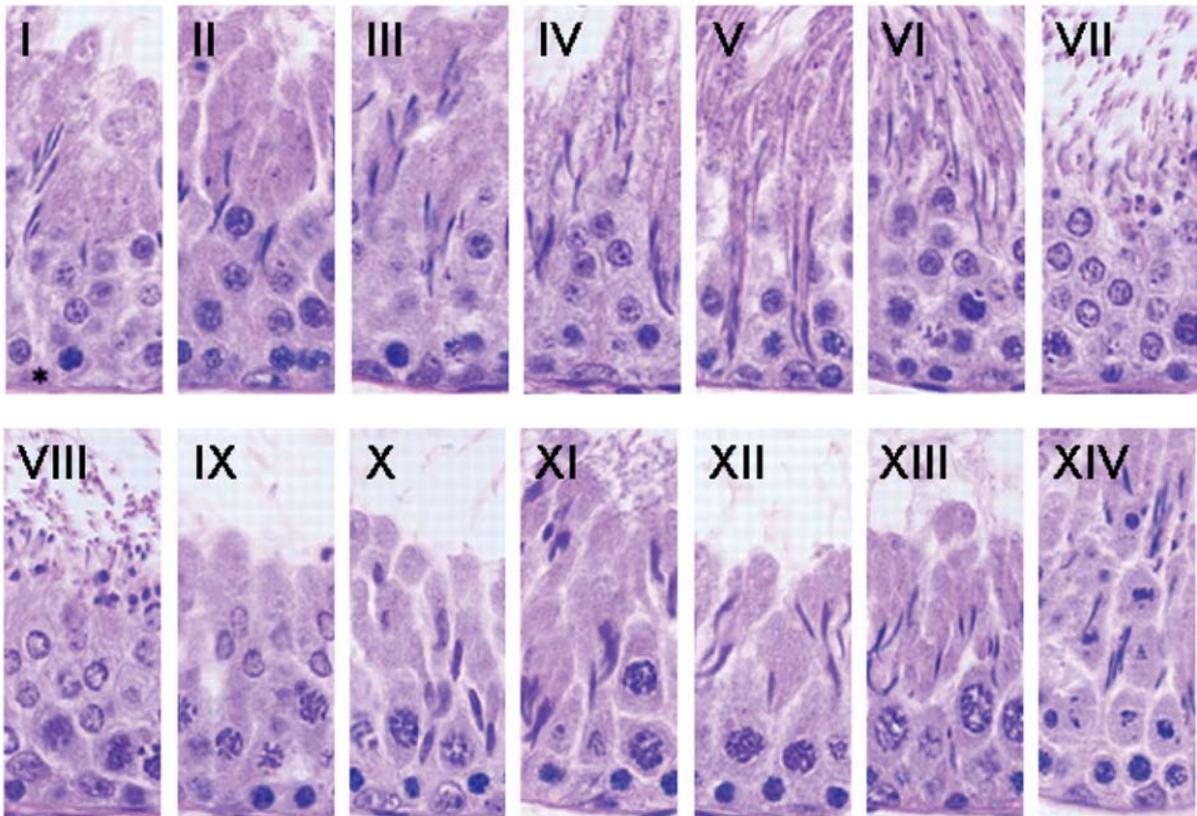
de sus predecesoras que presentan **marca tipo II** (células en preleptoteno).

- Los análisis de varianza entre los tiempos de incorporación y la prueba de rangos múltiples, muestran que hay diferencia estadística en la marca tipo I a las 3 horas. Mientras que en la el ANOVA no muestra diferencia estadística entre los tiempos de incorporación en la **marca tipo II**.
- La disposición espacial de la cromatina dentro del núcleo es característica de cada tipo celular analizado en este trabajo (espermatogonias B, espermatocitos en preleptoteno y espermatocitos primarios en leptoteno o incluso cigoteno) y esto puede ser evidenciado mediante el marcaje con BrdU.
- La técnica utilizada en este trabajo, puede ser usada en tiempos cortos de incorporación (30 min, 2 ó 3 horas), para diferenciar entre espermatogonias B (células mitóticas) y espermatocitos en preleptoteno (células meióticas), por medio del arreglo espacial de la cromatina al incorporar BrdU.
- La incorporación de BrdU de 24 horas, evidencia espermatocitos primarios en la última fase S meiótica que transitan hasta estadios tempranos de la profase meiótica I (leptoteno e incluso cigoteno).

XI. Perspectivas:

- Los resultados obtenidos en este trabajo podrían ser correlacionados con el tipo de cromatina (heterocromatina constitutiva o facultativa, así como eucromatina) que está incorporando a la BrdU.
- Observar el comportamiento tanto de telómeros como de centrómeros, para ver si es posible relacionarlo con la **marca tipo III** observada a las 24 horas de incorporación.
- También es posible realizar hibridaciones in situ para observar el comportamiento de los cromosomas durante el proceso de la replicación meiótica.
- Realizar incorporaciones de BrdU y trabajar con dispersiones para observar todo el volumen nuclear y de este modo corroborar nuestros resultados en los cuales trabajamos con cortes por parafina.
- Se podrían relacionar los diferentes tipos de marca de la BrdU con marcadores específicos de la meiosis para mejorar el entendimiento de los tipos celulares que están incorporando BrdU.
- Separar a las células que presentan **marca tipo II**, para poder realizar estudios bioquímicos con ayuda de proteínas específicas de la meiosis recién sintetizadas durante la fase S meiótica como hicieron con Rec 8 (Cha *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2001) o Spo11 (Cha *et al.*, 2000).

XII. Anexos



Anexo 1. Número de estadios en los cuales se divide el ciclo del epitelio seminífero de la rata, catorce en total, indicados con números romanos I-XIV, los cuales se utilizaron para clasificar los estadios en los cuales encontramos marca positiva para la BrdU, tomado de Lagarrigue *et al.*, 2011.

XIII. Referencias:

- Adler, I. D. (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mutation Research*, 352(1-2), 169–72. doi:10.1016/0027-5107(95)00223-5
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Molecular biology of the cell*. (M. Anderson & S. Granum, Eds.) (Fifth Edit., p. 1725). USA, NY: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Bartke, A. (1995). Apoptosis of male germ cells, a generalized or a cell type-specific phenomenon? *Endocrinology*, 136, 3–4. doi:10.1210/en.136.1.3
- Bellvé, A. R., Cavicchia, J. C., Millette, C. F., O'Brien, D. A., Bhatnagar, Y. M., & Dym, M. (1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse isolation and morphological characterization. *Cell*, 74, 68–85.
- Bernard, J. (1990). Introduction- multiplication and division. *Meiosis* (p. 396). New York, NY: Cambridge University Press.
- Billig, H., Furuta, I., Rivier, C., Tapanainen, J., Parvinen, M., & Hsueh, A. (1995). Apoptosis in testis germ cells: Developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology*, 136, 5–12.
- Borde, V., Goldman, A., & Lichten, M. (2000). Direct coupling between meiotic DNA replication and recombination initiation. *Science*, 290(5492), 806–809. doi:10.1126/science.290.5492.806
- Callan, H. G. (1972). Review Lecture : Replication of DNA in the chromosomes of eukaryotes replication of DNA in the chromosomes of eukaryotes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences.*, 181(1062), 19–41.
- Cha, R., Weiner, B., Keeney, S., Dekker, J., & Kleckner, N. (2000). Progression of meiotic DNA replication is modulated by interchromosomal interaction proteins, negatively by Spo11p and positively by Rec8p. *Genes & development*, 14, 493–503. doi:10.1101/gad.14.4.493
- Clermont, Y. (1962). Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: a revised model for the renewal of spermatogonia. *American Journal of Anatomy*, 111(2), 111–129.
- Cohen, P. E., Pollack, S. E., & Pollard, J. W. (2006). Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocrine Reviews*, 27(4), 398–426. doi:10.1210/er.2005-0017
- Csikász-Nagy, A., Palmisano, A., & Záborszky, J. (2011). Molecular network dynamics of cell cycle control: Transitions to start to finish. *Cell Cycle*

Synchronization Methods and Protocols (First., Vol. 761, pp. 277–291). Totowa, NJ: Humana Press. doi:10.1007/978-1-61779-182-6

- Ehmcke, J., Simorangkir, D. R., & Schlatt, S. (2005). Identification of the starting point for spermatogenesis and characterization of the testicular stem cell in adult male rhesus monkeys. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *20*(5), 1185–93. doi:10.1093/humrep/deh766
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., & Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair*, *3*(8-9), 959–67. doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.024
- Fraune, J., Schramm, S., Alsheimer, M., & Benavente, R. (2012). The mammalian synaptonemal complex: protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Experimental Cell Research*, *318*(12), 1340–6. doi:10.1016/j.yexcr.2012.02.018
- Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2001). *Texto y Atlas de Histología*. (Segunda Ed., p. 539). México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
- Guraya, S. S. (1987). *Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals* (First Edit., p. 413). Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Handel, M. A., & Schimenti, J. C. (2010). Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nature Reviews. Genetics*, *11*(2), 124–36. doi:10.1038/nrg2723
- Harper, L., Golubovskaya, I., & Cande, W. Z. (2004). A bouquet of chromosomes. *Journal of cell science*, *117*(18), 4025–32. doi:10.1242/jcs.01363
- Hermo, L., Pelletier, R., Cyr, D., & Smith, C. (2010). Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microscopy Research and Technique*, *73*(4), 243–278.
- Hernández-Hernández, a, Vázquez-Nin, G. H., Echeverría, O. M., & Recillas-Targa, F. (2009). Chromatin structure contribution to the synaptonemal complex formation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *66*(7), 1198–208. doi:10.1007/s00018-008-8584-2
- Imoto, Y., Yoshida, Y., Yagisawa, F., Kuroiwa, H., & Kuroiwa, T. (2011). The cell cycle, including the mitotic cycle and organelle division cycles, as revealed by cytological observations. *Journal of Electron Microscopy*, *60* (Supplement 1), S117–36. doi:10.1093/jmicro/dfr034
- Jaramillo-Lambert, A., Ellefson, M., Villeneuve, A. M., & Engebrecht, J. (2007). Differential timing of S phases, X chromosome replication, and meiotic prophase in the *C. elegans* germ line. *Developmental Biology*, *308*(1), 206–21. doi:10.1016/j.ydbio.2007.05.019

- Keeney, S., Giroux, C. N., & Kleckner, N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell*, *88*(3), 375–84.
- Kleckner, N. (1996). Review Meiosis: How could it work? *Chromosoma*, *93*(August), 8167–8174.
- Lagarrigue, M., Becker, M., Lavigne, R., Deininger, S.-O., Walch, A., Aubry, F., Suckau, D., et al. (2011). Revisiting rat spermatogenesis with MALDI imaging at 20-microm resolution. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *10*(3), M110.005991. doi:10.1074/mcp.M110.005991
- Leblond, C. P., & Clermont, Y. (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals New York Academy of Science*, *55*, 548–573.
- Lee, B., & Amon, A. (2001). Meiosis: how to create a specialized cell cycle. *Current opinion in cell biology*, *13*(6), 770–7.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L., et al. (2005). *Molecular Cell Biology*. (Fifth Edit.). Editorial médica panamericana.
- Longhese, M. P., Bonetti, D., Guerini, I., Manfrini, N., & Clerici, M. (2009). DNA double-strand breaks in meiosis: checking their formation, processing and repair. *DNA Repair*, *8*(9), 1127–38. doi:10.1016/j.dnarep.2009.04.005
- Marston, A. L., & Amon, A. (2004). Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *5*(12), 983–997. doi:10.1038/nrm1526
- Monesi, V. (1962a). Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. *The Journal of cell biology*, *14*, 1–18.
- Monesi, V. (1962b). Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. *The Journal of Cell Biology*, *14*, 1–18. Retrieved from <http://jcb.rupress.org/content/14/1/1.abstract>
- Page, S. L., & Hawley, R. S. (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *20*, 525–58. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111301.155141
- Pfeifer, C., Scherthan, H., & Thomsen, P. D. (2003). Sex-specific telomere redistribution and synapsis initiation in cattle oogenesis. *Developmental Biology*, *255*, 206–215. doi:10.1016/S0012-1606(02)00093-3
- Rosiepen, G., & Weinbauer, G. (1994). Duration of the cycle of the seminiferous epithelium, estimated by the 5-bromodeoxyuridine technique, in laboratory

- and feral rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, (100), 299–306. Retrieved from <http://www.reproduction-online.org/content/100/1/299.short>
- Rosiepen, G, Weinbauer, G. F., Schlatt, S., Behre, H. M., & Nieschlag, E. (1994). Duration of the cycle of the seminiferous epithelium, estimated by the 5-bromodeoxyuridine technique, in laboratory and feral rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100(1), 299–306.
- Rosiepen, Giesa, Arslan, M., & Clemen, G. (1997). Estimation of the duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the non-human primate *Macaca mulatta* using the 5-bromodeoxyuridine technique. *Cell and tissue Research*, (288), 365–369.
- Ross, M., & Pawlina, W. (2007). *Histología; Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular* (5ta ed., p. 975). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., SinhaHikim, A. P., & Clegg, E. D. (1990). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. (First Edit., p. 286). St. Louis, MO: Cache River Press.
- Satyanarayana, A., & Kaldis, P. (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, 28(33), 2925–2939. doi:10.1038/onc.2009.170
- Smith, K., Penkner A., Ohta K., Klein, F., & Nicolas, A. (2001). B-type cyclins CLB5 and CLB6 control the initiation of recombination and synaptonemal complex formation in yeast meiosis. *5 th European Meiosis Meeting*, (1), 1–2.
- Uhlmann, F., & Nasmyth, K. (1998). Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Current Biology*, 8(20), 1095–1102. doi:10.1016/S0960-9822(98)70463-4
- University, I. (1910). Bromodeoxyuridine. *Laboratory Safety Guideline*, 47405(812).
- Watanabe, Y., Yokobayashi, S., Yamamoto, M., & Nurse, P. (2001). Pre-meiotic S phase is linked to reductional chromosome segregation and recombination. *Nature*, 409(6818), 359–63. doi:10.1038/35053103
- Xia, W., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2005). Cytokines and junction restructuring during spermatogenesis--a lesson to learn from the testis. *Cytokine & growth factor reviews*, 16(4-5), 469–93. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.05.007
- Zickler, D., & Kleckner, N. (1998). The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annual review of genetics*, 32, 619–97. doi:10.1146/annurev.genet.32.1.619

Zimmer, C. (2009). On the origin of sexual reproduction. *Science*, 324(5932), 1254–1256.